

Preparazione del terreno **Skim Milk Agar**

Obiettivo Preparare un terreno di coltura a base di latte per selezionare microrganismi con attività proteolitica.

Autore Liceo Scientifico Galileo Galilei di Catania
Primo classificato Mad for Science 2023
Progetto “Per un pugno di arance: i lieviti come microrganismi di biocontrollo contro l’insorgenza di muffe sugli agrumi”



Materiali e reagenti

- 2 spatole da laboratorio
- Latte scremato in polvere
- Agar
- Becher da 1 L
- Acqua distillata
- Cilindro graduato da 1 L
- Ancoretta magnetica
- Bottiglia da 1 L resistente al calore
- Pennarello indelebile
- Nastro adesivo da autoclave
- Etanolo 70%
- Piastre Petri sterili da 90mm
- Parafilm®



Strumenti

- Autoclave
- Bilancia analitica
- Piastra magnetica riscaldante
- Cappa a flusso laminare



Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Guanti per il calore



Tempo

Circa un'ora e mezza per la preparazione, la sterilizzazione in autoclave e il trasferimento del terreno nelle piastre Petri



Procedimento

- 1.** Con l'aiuto di 2 spatole, pesare con la bilancia analitica 100 g di latte in polvere e 20 g di agar. Trasferire le polveri in un becher da 1 L.
- 2.** Prelevare dell'acqua distillata con un cilindro graduato e trasferirla all'interno del becher insieme alle polveri, fino ad arrivare a 1 L.
- 3.** Porre il becher sulla piastra magnetica riscaldante (150-200 rpm), inserire un'ancoretta e scaldare la soluzione, fino quasi a ebollizione per sciogliere completamente l'agar. Mescolare fino alla completa dissoluzione delle polveri. Si otterrà una soluzione al 10% latte in polvere e 2% agar.
- 4.** Trasferire la soluzione in una bottiglia da 1 L resistente al calore precedentemente contrassegnata con il nome del terreno e la data di preparazione. Applicare il nastro adesivo da autoclave.
- 5.** Sterilizzare a 121°C per 10 minuti, assicurandosi che il tappo non sia chiuso ermeticamente.
- 6.** Al termine del processo, lasciare raffreddare la soluzione fino a circa 50°C, temperatura adeguata a maneggiare la bottiglia senza scottarsi e ad evitare la formazione di condensa e la solidificazione precoce del terreno.
- 7.** Accendere la cappa biologica a flusso laminare, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70% e preparare le piastre Petri, marcandole con il nome del terreno e la data.
- 8.** Sotto cappa biologica, versare circa 20-25 ml di terreno nel centro di ciascuna piastra Petri e distribuirlo in maniera uniforme. Lo spessore del terreno in piastra deve essere all'incirca di 4 mm. Si otterranno circa 40 piastre.
- 9.** Lasciare raffreddare le piastre a temperatura ambiente sotto cappa con il coperchio semichiuso per permettere all'agar di solidificare.
- 10.** Le piastre così preparate saranno impiegate per la semina di microrganismi isolati dal mosto d'uva, seguendo il protocollo "Isolamento di microrganismi da mosto d'uva" nella sezione "Biologia ambientale", per selezionare ceppi di lieviti con attività proteolitica. Se non utilizzate immediatamente, conservare le piastre a 4°C capovolte dopo averle sigillate con Parafilm®.

11. Terminata la preparazione, liberare la cappa biologica dal materiale utilizzato, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70%, chiudere il vetro e sterilizzare l'ambiente interno con la luce a raggi UV.

Note

- Lo Skim Milk Agar è un terreno differenziale non selettivo, sviluppato all'inizio del XX secolo nell'ambito della microbiologia lattiero-casearia per studiare la degradazione della caseina, la principale proteina del latte. La presenza di caseina conferisce al terreno un aspetto opaco. Quando questa viene degradata da enzimi extracellulari prodotti dai microrganismi (proteasi o caseinasi), compaiono zone di chiarificazione attorno alle colonie. Per questo motivo il terreno è ampiamente utilizzato per evidenziare l'attività proteolitica e confrontare la crescita di diversi microrganismi, tra cui batteri appartenenti ai generi *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Enterococcus* e *Staphylococcus*, lieviti come *Candida* e muffe filamentose quali *Penicillium* e *Aspergillus*.
- La formulazione classica dello Skim Milk Agar prevede:

• Latte scremato in polvere	28 g/L
• Idrolizzato enzimatico della caseina o triptone	5 g/L
• Estratto di lievito	2.5 g/L
• Destrosio	1 g/L
• Agar	15 g/L

Ha un pH finale di 7.0. In questo protocollo è proposta una variante semplificata del terreno, che consente comunque di evidenziare l'attività proteolitica dei microrganismi attraverso la degradazione della caseina. Qualora il tempo a disposizione fosse limitato, il terreno è disponibile sia come formulazione disidratata da ricostituire, quale ad esempio Skim Milk disponibile presso Liofilchem (codice prodotto: 610491), sia come piastre pronte all'uso, quali ad esempio Skim Milk Agar Plates fornite dalla Hardy Diagnostics (codice prodotto: G138).
- La piastra magnetica riscaldante facilita la dissoluzione delle polveri; in sua assenza, bisognerà mescolare manualmente la soluzione.
- Le procedure di dissoluzione delle polveri, sterilizzazione e trasferimento nelle piastre Petri descritte in questo protocollo possono essere applicate anche all'allestimento di terreni commerciali disidratati, quali Skim Milk Agar, Potato Dextrose Agar e Sabouraud Dextrose Agar, impiegati nell'esperienza "Isolamento di microrganismi da mosto d'uva" (sezione "Biologia ambientale"). Tuttavia, per le quantità di polvere da utilizzare e le condizioni di sterilizzazione, si raccomanda di seguire le indicazioni riportate dal fornitore, ad esempio Liofilchem:
 - **Skim Milk Agar:** preparare una sospensione al 10% (100 g/L) in acqua distillata e sterilizzare a 121°C in autoclave per 5-10 minuti. Tempi di sterilizzazione superiori possono causare la degradazione termica dei componenti del latte, con conseguente imbrunimento del terreno e possibile alterazione delle sue caratteristiche.
 - **Potato Dextrose Agar:** sospendere 42 g di prodotto in 1 L di acqua distillata e sterilizzare a 121°C in autoclave per 15 minuti.
 - **Sabouraud Dextrose Agar:** sospendere 65 g di prodotto in 1 L di acqua distillata e sterilizzare a 121°C in autoclave per 15 minuti.
- Una volta solidificato, lo Skim Milk Agar deve presentarsi omogeneo, opaco e di colore bianco-latte, senza bolle e con una consistenza compatta e uniforme. Eventuali bolle d'aria devono essere rimosse subito dopo il trasferimento in piastra, prima che il terreno solidifichi. La presenza di colonie, muffe o alterazioni cromatiche prima dell'inoculo indica una contaminazione del terreno e ne richiede l'eliminazione.
- Si raccomanda di effettuare la preparazione e il trasferimento del terreno in piastra in condizioni sterili. In assenza di una cappa biologica a flusso laminare, è possibile utilizzare un banco da laboratorio, precedentemente pulito con Etanolo 70%, e un becco Bunsen (fare attenzione al rischio incendio!), vicino al quale trasferire il terreno nelle piastre. Per mantenere la sterilità delle piastre Petri, aprire e chiudere la confezione sotto il flusso della cappa biologica o vicino alla fiamma del becco Bunsen.
- Nel lavorare sotto cappa biologica, occorre adottare alcuni accorgimenti funzionali al mantenimento della sterilità:
 - il piano di lavoro è reso sterile dal flusso dell'aria proveniente dalle griglie: non ostruire il passaggio dell'aria e posizionare il materiale nella porzione centrale del piano;
 - non sovraccaricare il piano di lavoro con troppo materiale;
 - disinfettare con Etanolo 70% tutto il materiale necessario allo svolgimento dell'attività, prima di inserirlo sotto cappa;
 - evitare di mantenere aperte le piastre di coltura oltre il tempo necessario alla semina e al prelievo del materiale biologico.