



Laurea Magistrale in Biologia Marina
AA 2012/2013

Relazione dell'attività svolta per il Tirocinio curriculare del Corso di
Laurea Magistrale in Biologia Marina

**“Densità Ottica e Citometria a Flusso: due metodi analitici per
quantificare e qualificare campioni di colture microbiche.”**

LabMET – *Laboratory of Microbiology, Ecology and Technology*

Giovanni Rossi

Gent (Belgium), 1/07/2013

1. CONTESTO DEL TIROCINIO:

Il presente tirocinio curricolare è stato svolto all'interno del contesto della mobilità internazionale sotto il progetto Erasmus Placement. In quanto all'interno del quadro Erasmus vi è il concetto di mobilità internazionale studentesca ai fini di collocamento e collegamento al mondo del lavoro permettendo agli studenti di avere accesso e visitare istituzioni o enti di alta formazione.

L'ente selezionata è stata LabMET (Laboratory of Microbiology, Ecology and Technology) facente parte della Facoltà di Bio-ingegneria dell'Università di Gent in Belgio. Lo svolgimento di tale tirocinio, durato dall'1° di Aprile 2013 fino al 1° di Luglio 2013, è stato possibile tramite l'accordo avvenuto tra l'Università di Bologna e l'ente ospitante sopracitato.

Durante questo periodo, sotto la supervisione del Dr. Ramiro Vilchez-Vargas, erano svolte alcune tecniche di microbiologia di base e adottati diversi approcci logici per la costruzione di disegni sperimentali su modelli di crescita batterica, poi utili per future ricerche sul campo dell'ecologia microbica in ecosistemi ingegnerizzati e naturali all'interno del progetto denominato: Microbial Resource Management (MRM)..

All'inizio di questa esperienza, è stato seguito anche un corso di sicurezza in laboratorio per ottenere il libero accesso alle strumentazioni presenti nei vari laboratori di LabMET.

Inoltre, era parte integrante del programma di tirocinio l'appuntamento settimanale (ogni martedì) con diversi seminari riguardanti i risultati di ogni altro collega di LabMET. In un contesto di interdisciplinarietà tra ingegneria applicata e microbiologia, strutturato in diversi "cluster", cioè gruppi di lavoro nel contesto del progetto sopracitato; il cluster assegnatomi era denominato "Ecology cluster".

L'obiettivo principale del programma di tirocinio a LabMET è stato perciò quello di imparare l'utilizzo di due tra le più utilizzate metodologie di laboratorio quali le analisi di densità ottica e di citometria a flusso. Col fine di produrre un alto numero di risultati sia quantitativi che qualitativi su differenti gradi di risoluzione. Quindi, dopo l'iniziale periodo di addestramento nella preparazione dei campioni e nel perfezionare le metodologie era svolta una analisi comparativa dei due metodi.

2. ATTIVITA' SVOLTE:

Una delle principali e basilari attività svolte consisteva nella preparazione dei campioni tramite diversi terreni di coltura. Quest'ultimi, vengono utilizzati in microbiologia per isolare, coltivare, identificare e mantenere nel tempo le specie batteriche campionate. Durante questo periodo erano, perciò, adoperate tre diverse tipologie di terreni: Lysogeny broth (LB; liquido), LB agar (solido), che sono terreni di coltura molto ricchi nutrizionalmente consigliati quando si vuole ottenere una crescita rapida della specie coltivata (almeno 24 ore di incubazione, anche se i tempi di crescita possono variare molto in quanto sono specie specifici), ed il terreno minimale (Minimal medium, MM) che originariamente non possiede al suo interno fonti di carbonio ma solo i nutrienti minimi per ottenere la crescita batterica, perciò utile se si vuole verificare la fonte di carbonio per la specie che vi crescerà.

Tutti i terreni e le soluzioni erano sempre adeguatamente sterilizzate a 120°C per 15 minuti in autoclave o filtrati con filtri sterili a 0.22µm, se qualche componente del terreno era termolabile.

Una volta allestiti i campioni in colture solide (LB agar) su piastre Petri, adeguatamente lavorate in ambiente sterile (cappa o "clean bench" con fiamma) e diluite tramite la tecnica dello streaking, che permette di isolare colonie batteriche in prestabiliti quadranti della piastra, queste erano poi trasferite in colture liquide LB broth utilizzati come inoculi e successivamente in MM utilizzando tre diverse fonti di carbonio tali che: glucosio, succinato e glicerolo. In seguito, tali campioni vennero processati prima mediante spettrofotometro (vd. Fig. 2) rilasciando valori di densità ottica (OD = Optical Density) e poi tramite citometria a flusso (Accuri c6 Flow Cytometer, vd. Fig. 2) rilasciando valori sia quantitativi in termini di conteggio cellulare che qualitativi in termini di percentuali di cellule vive e cellule morte effettivamente presenti nel campione (vd. Fig. 3).



Fig. 1 – Le due principali strumentazioni analitiche utilizzate durante il tirocinio: spettrofotometro (a sinistra) e citometro a flusso Accuri c6 (a destra).

3. RISULTATI:

Qui di seguito sono riportati solo alcuni esempi dei risultati ottenuti durante il periodo di tirocinio. Sono riguardanti nel primo caso, le tre curve di crescita ottenute mediante l'analisi della densità ottica delle colture in condizioni minimali di crescita, variando la relativa fonte di carbonio (blu = in glucosio, giallo = in succinato e nero = in glicerolo), del genere *Brachy bacterium* (vd. Fig. 2) e nel secondo caso i plots rilasciati dopo le analisi di flusso citometria degli inoculi in LB broth utilizzati sul genere *Pseudomonas* (vd. Fig. 3).

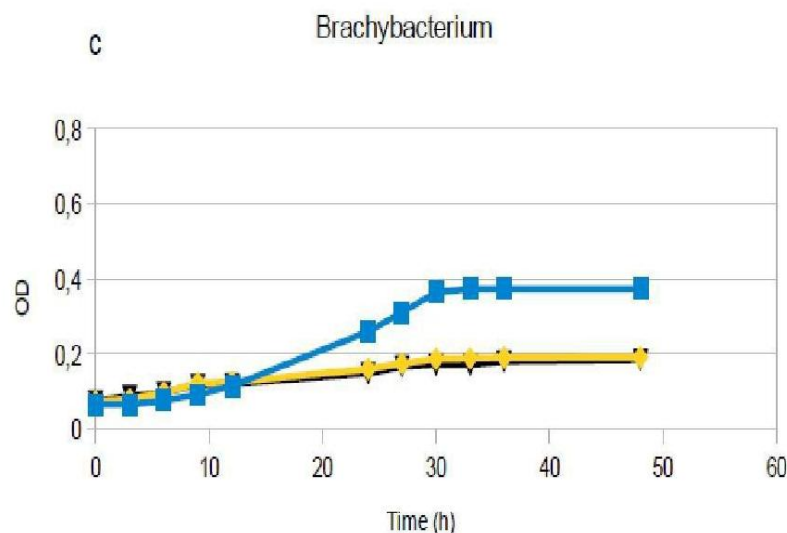


Fig. 2 – Curve di crescita del genere *Brachy bacterium* in terreno minimale variando la fonte di carbonio (blu = in glucosio, giallo = in succinato e nero = in glicerolo).

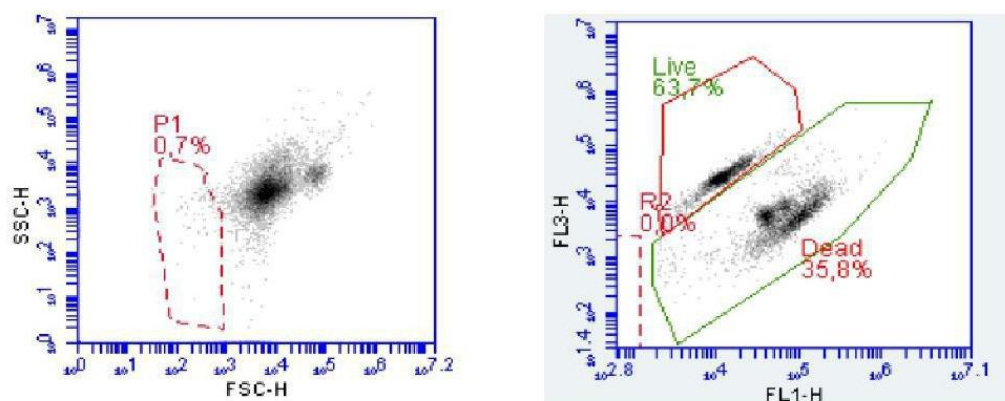


Fig. 3 – Plots rilasciati dopo l'analisi degli inoculi fatti per il genere *Pseudomonas* in LB broth. Il plot di sinistra indica il n. totale di cellule presenti nel campione, mentre il plot di sinistra è indicativo delle percentuali di cellule vive (area verde 63,7%) e cellule morte (area rossa 35,8 %) del campione.

4. CAPACITA' FORMATIVE ACQUISITE:

Le capacità formative acquisite durante tale esperienza sono state molteplici sia dal punto di vista professionale che umano. Essendo costantemente in contatto con esperti del settore microbiologico ed ingegneristico in un contesto realmente interdisciplinare dove ogni ruolo era di estrema importanza nell'integrazione di risultati scientifici, per ottenere una visione più dettagliata e completa degli argomenti affrontati all'interno MRM project.

Dal punto di vista professionale ho perfezionato le tecniche di analisi spettrofotometrica e approcciato a nuove metodiche come la citometria a flusso imparandone sia il concetto di base di funzionamento che di lettura dei dati emessi. Quindi è stata fatta molta pratica in termini di preparazione di colture batteriche sia solide che liquide, che liquido minimali, concentrandosi anche sulle metodiche a priori di sterilizzazione molto importanti per avere una ottimale risoluzione di dati.

In più, erano strutturati anche molti e diversi disegni sperimentali col fine di capire bene come viene impostato un esperimento scientifico destinato a pubblicazione.

Era svolta molta ricerca bibliografica per contestualizzare la meglio ogni azione che veniva svolta in laboratorio con l'apprendimento ed il perfezionamento di vari sistemi di ricerca bibliografica come ad esempio: NCBI (National Center for Biotechnology Information); l'utilizzo di programmi come mega 5 per la computazione di sequenze genomiche delle varie specie microbiche studiate e analizzate.

Inoltre, il perfezionamento dell'inglese dal punto di vista professionale in termini sia di speaking, avendo sostenuto la difesa orale del mio lavoro svolto davanti ad una commissione straordinaria dell'università di Ghent e molti meeting giornalieri per progettare i veri esperimenti, di writing avendo scritto una relazione scientifica di 30 pagine contestualizzata il giorno della difesa, e di listening dovendo capire spesso anche in tempi rapidi compiti da svolgere in ambito di laboratorio. Quindi dopo la difesa orale esaminata con risultato positivo sono stati ottenuti ulteriori 15 ETCS (European Transfer Credits System).

È doveroso in fine il ringraziamento al Professor Dr. Ir. Nico Boon capo del dipartimento di Biochimica e Bioingegneria dell'Univeristà di Ghent per avermi dato la possibilità di svolgere tale periodo della mia educazione nel LabMET. Il Dr. Ramiro Vilchez-Vargas, la Dr.ssa Patricia Reboleiro e la Dr.ssa. Varvara Tsilia per aver speso molto tempo e pazienza al mio fianco insegnandomi molte cose sul lavoro di laboratorio e di vita. Perciò anche tutto lo staff di LabMET per la loro disponibilità giornaliera e l'esempio professionale mostrato durante il lavoro.