

Test in piastra della sensibilità dei batteri al lisozima

a cura di G. Nappo e A. Maielli

Il lisozima è un piccolo enzima dotato di attività battericida. Esso agisce rompendo il peptidoglicano presente sulla parete dei batteri, provocandone la lisi. L'organismo generalmente utilizzato per saggiare l'attività del lisozima è *Micrococcus lysodeikticus*, un batterio Gram positivo appartenente alla famiglia Micrococcaceae. Per valutare in modo semiquantitativo la sensibilità al lisozima, si fa crescere su piastra *M. lysodeikticus* in presenza di concentrazioni crescenti di lisozima e si analizzano le dimensioni degli aloni di inibizione prodotti.

Obiettivo

Valutare la sensibilità del batterio *Micrococcus lysodeikticus* a concentrazioni crescenti di lisozima.

Procedimento

1. Pesare 20 mg di batterio *Micrococcus lysodeikticus*.
2. Aggiungere 10 ml di terreno di crescita LB per ottenere una sospensione batterica a 2 mg/ml.
3. Mescolare la soluzione invertendo più volte.
4. Prelevare 100 µl di sospensione batterica e distribuirla uniformemente sulla superficie di una piastra di terreno LB-Agar, aiutandosi con un'ansa a L sterile.
5. Porre la piastra a temperatura ambiente fino a quando le cellule non saranno cresciute formando colonie visibili ad occhio nudo (generalmente 24 ore).
6. Utilizzando uno stuzzicadente prelevare una singola colonia e stemperare le cellule raccolte in un tubo sterile contenente 10 ml di terreno di crescita LB.
7. Incubare a temperatura ambiente per una notte.
8. In una provetta sterile allestire la diluizione 1:10 della sospensione batterica: trasferire 20 µl di sospensione e 180 µl di terreno di crescita LB.
9. Seminare 100 µl di sospensione batterica diluita sulla superficie di una piastra di terreno LB-Agar e distribuirla uniformemente aiutandosi con un'ansa a L sterile. Lasciare asciugare qualche minuto.
10. Allestire le diluizioni del lisozima (5 mg/ml, 10 mg/ml e 50 mg/ml) in tre provette pulite nominate rispettivamente "5", "10" e "50".
11. Trasferire 100 µl di acqua nelle provette "50" e "5" e 160 µl di acqua nella provetta "10".
12. Aggiungere 100 µl di lisozima concentrato 100 mg/ml nella provetta "50" e mescolare.
13. Prelevare 40 µl di soluzione dalla provetta "50" e trasferirli nella provetta "10". Mescolare.
14. Prelevare 100 µl di soluzione dalla provetta "10" e trasferirli nella provetta "5". Mescolare.



Tempo previsto

- 1-2 giorni per la crescita della coltura pura
- 20 minuti per l'esperimento
- 1-2 giorni per la crescita

Materiale e Reagenti

- ✓ Piastre LB-agar (vedi protocollo 'Preparazione del terreno di coltura per i batteri')
- ✓ Terreno liquido LB (vedi protocollo 'Preparazione del terreno di coltura per i batteri')
- ✓ Guanti
- ✓ Provette
- ✓ Portaprovette
- ✓ Puntali
- ✓ Anse a L sterili
- ✓ Batterio *Micrococcus lysodeikticus*
- ✓ Lisozima commerciale (100 mg/ml)

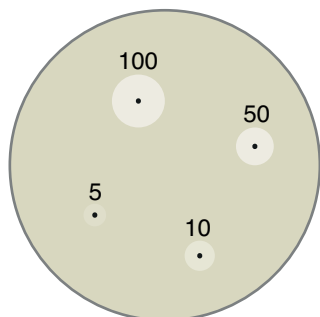
Strumentazione

- ✓ Micropipette
- ✓ Bilancia analitica

15. Con un pennarello indelebile disegnare 4 puntini sul fondo della piastra su cui è stato seminato *Micrococcus lysodeikticus*. Accanto a ciascun puntino scrivere le concentrazioni di lisozima da testare ("100", "50", "10", "5").
16. Depositare 10 μ l di enzima concentrato 100 mg/ml in corrispondenza del puntino "100".
17. Ripetere l'operazione per ciascuna diluizione di lisozima, depositando 10 μ l di enzima in corrispondenza del puntino.
18. Incubare la piastra a temperature ambiente per 18-24 h.
19. Analizzare i risultati misurando il diametro degli aloni di inibizione ottenuti.

Osservazioni

Analizzando la piastra dopo un'incubazione di circa una 24 ore a temperatura ambiente si osserva che i batteri crescono formando uno strato pressoché continuo sulla piastra, ad eccezione dei punti in cui la crescita è stata inibita dalla presenza del lisozima. Si nota inoltre che a concentrazioni di lisozima maggiori corrispondono aloni di inibizione di dimensioni maggiori. Ad esempio, il lisozima concentrato 100 mg/ml produce un alone di inibizione di diametro di circa 12 mm, mentre a 10 mg/ml l'alone è di soli 3 mm di diametro.



*Rappresentazione di una piastra di coltura di *Micrococcus lysodeikticus* in presenza di lisozima a diverse concentrazioni. Sulla piastra si notano gli aloni di inibizione di diametro differente.*