

CONSERVAZIONE DI MICRORGANISMI - LE CEPPOTECHES -

I laboratori microbiologici utilizzano una vasta gamma di ceppi microbici per il controllo qualità dei terreni di coltura, per scopi di ricerca, per molteplici metodi standard di analisi e, non ultimo, per l'insegnamento.

Le normative di settore forniscono indicazioni sui ceppi da utilizzare.

Le colture di microrganismi sono chiamate con vari sinonimi, ad esempio ceppi di controllo, colture standard, ceppi di riferimento, ceppi per il controllo qualità ecc..

In commercio esistono ceppi microbici standardizzati pronti all'uso ma è anche possibile realizzare delle **ceppoteche interne** al laboratorio, volte a ottimizzare la disponibilità dei ceppi e l'economicità degli stessi. In questi casi, la sfida principale consiste nel mantenimento delle caratteristiche originali del ceppo, evitando le contaminazioni, l'invecchiamento delle colture, le variazioni fenotipiche e soprattutto genetiche.

Le collezioni di ceppi

I ceppi microbici puri di riferimento sono depositati in collezioni di colture microbiche presenti in tutto il mondo e che offrono, oltre ai microrganismi, anche servizi di mantenimento, conservazione, identificazione, classificazione, nomenclatura. Ci sono collezioni specifiche per batteri, funghi, lieviti, microalghe ecc.

Le principali collezioni sono **ATCC** (American Type Culture Collection Centre), **DSMZ** (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen), **NCTC** (National Collection of Type Culture), **BCCM** (Belgian co-ordinated collections of microorganisms), **MUCL** (Industrial Fungi and Yeast Collection- Mycothèque de l'Université catholique de Louvain, **CECT** (Colección Española de Cultivos Tipo), a cui seguono molte altre collezioni internazionali.

Le collezioni forniscono microrganismi in forma liofilizzata o vitale, da poter utilizzare come base per la propria ceppoteca, e in commercio esistono poi varie **aziende specialiste** che forniscono ceppi liofilizzati in formati di facile fruizione.

Occorre anche ricordare che esiste il catalogo **WDCM** (World Data Centre for Microorganisms) che raccoglie i ceppi delle collezioni, contrassegnandoli in modo da facilitare l'accesso ai microrganismi di riferimento elencati nella pubblicazione "Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology" (ISO TC 34 SC 9 Joint Working Group 5, Working Party on Culture Media of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH-WPCM).

In sostanza, ai ceppi è assegnato un numero WDCM che si aggiunge, fungendo da collegamento trasversale, ai codici identificativi che ogni ceppo ha nelle varie collezioni di riferimento.

I ceppi presenti in commercio - [clicca link interattivo](#)

Kairosafe è distributore esclusivo dei **ceppi del brand Mecconti**. Si tratta di ceppi liofilizzati in forma di pellet, disponibili in varie tipologie: titolati, titolati ad alto titolo oppure non titolati.

I principali vantaggi di questi ceppi sono la praticità d'uso, la confezione singola e la comoda conservazione in frigorifero.

Principali tecniche di conservazione di una ceppoteca

L'**obiettivo principale** dei metodi di conservazione consiste nel mantenere la vitalità e la stabilità genetica della coltura, rallentandone il metabolismo ed estendendo il periodo tra le subcolture.

- Subcolture regolari

Consiste nel trasferire periodicamente la coltura microbica su terreni freschi e consente di mantenerla vitale. La **frequenza dei passaggi** dipende dal tipo di microrganismo e si devono utilizzare terreni di coltura appropriati e corrette temperature di stoccaggio. Si preferisce un **terreno solido** rispetto a quello liquido per ridurre eventuali rischi di contaminazione e spesso vengono utilizzate le provette pronte all'uso con agar a becco di clarino. Questa tecnica presenta tuttavia degli svantaggi legati al **rischio** di incorrere in modifiche delle caratteristiche dei microrganismi, contaminazioni, errori nella manipolazione e perdita di vitalità della coltura.

- Paraffina o olio minerale

Si tratta di un metodo semplice ed economico per conservare batteri e funghi a T ambiente, in cui viene versata della paraffina liquida sterile o olio minerale nella provetta, ricoprendo l'agar a becco di clarino. Lo strato ottenuto previene la disidratazione e assicura le condizioni **anaerobiche**, riducendo le attività metaboliche del ceppo. In questo caso è fondamentale che l'olio sia di buona qualità, per non incorrere in fenomeni di irrancidimento o rilascio di sostanze tossiche alla coltura.

- Gel di Silice

Sia batteri che lieviti possono essere conservati nella polvere di silice gel a **basse temperature** per qualche anno. La polvere di silice gel sterile viene miscelata con una sospensione densa di cellule e conservata a basse temperature, favorendo l'essiccazione e la vitalità delle cellule per un lungo periodo.

- Refrigerazione

Le colture microbiche possono essere stoccate anche in frigorifero a T di 4°C. A questa temperatura l'**attività metabolica** si riduce notevolmente e non richiede grandi quantità di nutrienti. Si tratta però di una tecnica di conservazione a breve tempo, circa una settimana, in quanto lunghi periodi porterebbero all'accumulo di sostanze tossiche nocive alla vitalità del ceppo.

- Congelamento / Crio-conservazione

Il congelamento è un processo comune per la conservazione dei batteri: una densa sospensione microbica può essere congelata sotto i -20°C o in azoto liquido con riduzione quasi totale del suo metabolismo. Questo processo tuttavia comporta un certo stress osmotico per le cellule, pertanto si rende necessario l'utilizzo di **sostanze crio-preservanti**, che riducono il danno causato dai cristalli di ghiaccio. I più comuni sono il glicerolo (10-15%) o il dimetilsolfossido (5% DMSO), che consentono di conservare le colture nelle cryovials anche per svariati anni.

- Liofilizzazione

La liofilizzazione è la tecnica più utilizzata, soprattutto a livello industriale, per il mantenimento dei ceppi microbici. Le colture vengono inizialmente congelate molto rapidamente per bloccare l'attività metabolica e poi liofilizzate tramite la **sublimazione del ghiaccio**. I ceppi così ottenuti hanno il vantaggio di essere resistenti agli sbalzi di pressione e temperatura.

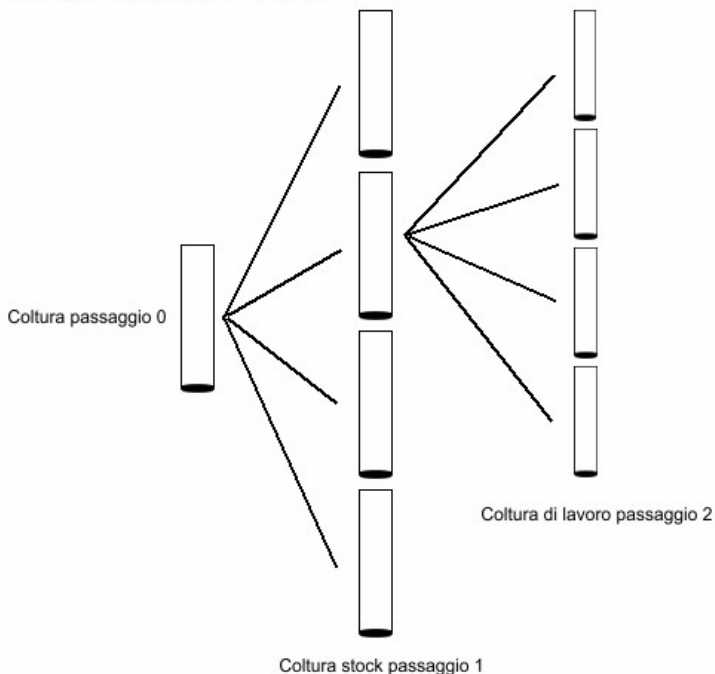
Seed Lot Technique

Questo termine è utilizzato nella USP, così come in altre normative e pubblicazioni. Si tratta di un **metodo utile e consigliato per la preparazione di una coltura di lavoro** pura e incontaminata e per il corretto mantenimento di una **ceppoteca**.

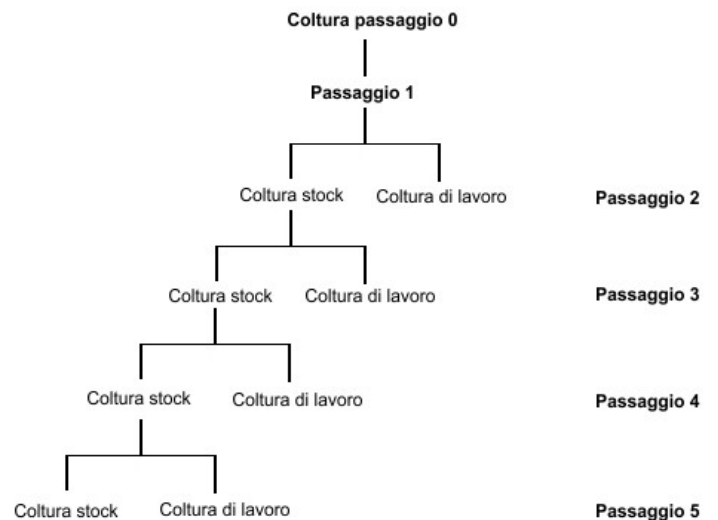
Uno dei punti fondamentali è che la coltura di lavoro non deve avere più di **5 passaggi**, ma cosa significa passaggio? Il passaggio è la **subcoltura del ceppo**, ossia la crescita su un nuovo terreno. Partendo dalla coltura di riferimento a passaggio zero, che proviene dalla collezione, essa viene rivitalizzata e fatta crescere. Questa crescita costituisce il primo passaggio. La coltura stock così generata può essere utilizzata per produrre altre colture stock, conservandole ad esempio in freezer, o colture di lavoro.

Il passaggio successivo si ha quando la coltura stock viene prelevata, ad esempio dal freezer, e strisciata per farla crescere.

Seed lot technique



Flow chart seed lot technique



Controllo Qualità delle ceppoteche interne

E' opportuno verificare la purezza e l'identità del ceppo prima di porre le colture in ceppoteca. È fondamentale applicare un programma di controllo qualità che assicuri la vitalità, la purezza e la stabilità fenotipica e genetica dei ceppi conservati.

Protect: Sistema per la crio-conservazione di ceppoteche



Protect Multiuso - [clicca link interattivo](#)

Per facilitare la **conservazione a lungo termine e a basse temperature** di tutti i ceppi microbici, si può utilizzare il sistema Protect, costituito da **perline di ceramica** porosa immerse in una soluzione crio-preservante, sviluppata per nutrire le cellule e prevenire i danni da congelamento. I microrganismi, messi a contatto con le perline, vi aderiscono saldamente e sono poi posti in freezer. Ogni provetta consente di ottenere circa 20-25 aliquote di microrganismi, che di per sé non sono un passaggio.

La **preparazione** è molto semplice: si preleva una densa ansata del ceppo microbico e la si introduce nella provetta Protect, si agita bene affinché i microrganismi aderiscano alle perline, si rimuove tutto il liquido crio-preservante e si pone nel freezer a -20°C , -70°C , -80°C o in azoto liquido.

In breve tempo si ottiene una ceppoteca ben identificabile grazie ai diversi colori dei tappi delle cryovials e delle perline.

Il **recupero** del microrganismo è altrettanto semplice: si estrae una cryovial dal congelatore e, con l'ausilio di un ago sterile, si preleva una perlina che viene direttamente strisciata su un terreno agarizzato o inserita in un brodo colturale.

Protect Select - [clicca link interattivo](#)

Protect Select nasce dalla specializzazione del Protect multiuso e offre all'utilizzatore la possibilità di rispondere a **esigenze particolari** nell'ambito della conservazione di microrganismi.

Protect Anaerobi, Caseari e Funghi/Lieviti forniscono formulazioni uniche, specifiche per il recupero ottimale di alcune categorie di microrganismi. Meat Free è privo di carne ed è accompagnato da documenti di sicurezza e tracciabilità TSE free, cruciali per i prodotti farmaceutici e biotecnologici.

Anaerobi

- Migliora la vitalità e le performance
- Riduce la permeabilità all'ossigeno
- Nutre e mantiene l'ambiente e riduce la perdita di cellule
- Può essere utilizzato anche per organismi esigenti diversi dagli anaerobi

Caseari

- Basato su formulazioni e raccomandazioni BSI/ISO
- Conservazione dedicata di microrganismi isolati dal latte e prodotti caseari, acque di risciacquo e campioni ambientali

Funghi e lieviti

- Semplifica la sospensione di spore fungine per mezzo di una formulazione cattura-spore
- Migliorata formulazione per il nutrimento di cellule fungine
- pH neutro per migliorare la stabilità cellulare

Meat Free

- Fornisce al settore farmaceutico e biotecnologico la garanzia BSE/TSE free
- Prodotto con ingredienti vegetali certificati
- Conservazione di microrganismi di valore utilizzati da produttori farmaceutici
- Adeguato per la conservazione di microrganismi trasformati/plasmidi

CEPPI MICROBICI

MicroSwab Plus: microrganismi non titolati al secondo passaggio. Sono ceppi liofilizzati in pellet, ideali per generare ceppoteche. Il pellet si trova all'interno di una provetta con tampone, quindi si può usare sia per ceppoteche che per lo striscio diretto. Mecconti (ATCC LICENSED DERIVATIVE*).

Collezioni DSMZ, BCCM, MUCL, CECT ecc: offrono ceppi liofilizzati in ampolla di vetro o in forma attiva su slant agar, al passaggio zero. Disponibili su richiesta (Kairosafe).

PROTECT MULTIUSO

Colore tappi / perline	Scatola criogenica cartonata, 80 pz	Scatola criogenica di PP, 100 pz	Scatola criogenica di PP, 100 pz + anse e aghi, 50+50 pz
	Codice	Codice	Codice
Colori misti	TS80-MX	TS71-MX	TS71-MX Plus
Blu	TS80-BL	TS71-BL	TS71-BL Plus
Verde	TS80-GN	TS71-GN	TS71-GN Plus
Rosso	TS80-RD	TS71-RD	TS71-RD Plus
Bianco	TS80-WH	TS71-WH	TS71-WH Plus
Giallo	TS80-YE	TS71-YE	TS71-YE Plus

PROTECT SELECT

Colore tappi / perline	Utilizzo	Scatola criogenica cartonata, 25 pz
		Codice
Arancione	Anaerobi	TS73-AN 25
Lilla	Caseari	TS73-DY 25
Nero	Meat Free	TS73-MF 25
Grigio	Funghi e Lieviti	TS73-YM 25

SISTEMINI PER IL MANTENIMENTO DEL FREDDO

Cryoblock (codice TS70-H): piastra di alluminio da 5 pozzetti per il mantenimento a bassa temperatura di cryovial fuori dal freezer.

TERRENI DI COLTURA

Terreni sia in polvere che già pronti in provette a becco di clarino (slant agar).

CRYOVIALS

Provette criogeniche in polipropilene, adatte alla conservazione da 4°C fino all'azoto liquido. Sono sterili, autoclavabili a 121°C per 20 min, certificate DNA-, DNase-, Pyrogen-, ATP-, Human DNA, e PCR Inhibitor Free, graduate, disponibili da 1,2 ml a 5 ml.

5110013 Cryovials 1.2 ml, filettatura femmina, self standing

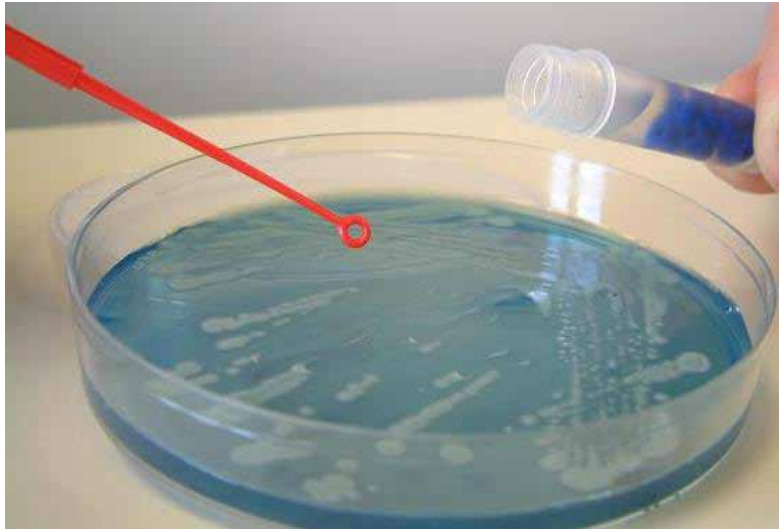
5110024 Cryovials 2 ml, filettatura femmina, self standing

5110122 Cryovials 2 ml, filettatura maschio, self standing

5110051 Cryovials 5 ml, filettatura femmina, self standing

5110021 Cryovials 2 ml, filettatura femmina, codice a barre 2D, self standing

5110121 Cryovials 2 ml, filettatura maschio, codice a barre 2D, self standing



BIBLIOGRAFIA

EP, USP

ISO 11133:2014 Microbiology of food, animal feed and water -- Preparation, production, storage and performance testing of culture media

www.wdcm.org

Practice and prospects of microbial preservation. Om Prakash, Yogesh Nimonkar & Yogesh S. Shouche

Journal of Hygiene Sciences Printed and published by D.G. Tripathi, Edited by Amrita Roy

European Pharmacopoeia 9 edizione

ASTM 1997 E1342-97 Standard Practice for Preservation by Freezing, Freeze-Drying, and Low Temperature Maintenance of Bacteria, Fungi, Protista, Viruses, Genetic Elements, and Animal and Plant Tissues

Bloomfield, S et al. 1995. Development of Reproducible Test Inocula for Disinfectant Testing. Intl Biodeter Biodegrad. pp. 311-331

Gilbert, P et al. 1987. Inocula for Antimicrobial Sensitivity Testing: a Critical Review. J Antimicrob Chemother. 20:147-154

Orth, D.S. et al. 1989. Effect of Culture Conditions and Method of Inoculum Preparation On the Kinetics of Bacterial Death During Preservation Efficacy Testing. J Soc Cosmet Chem. 40:193-204

Sutton, S. 2007. "Microbiology Laboratory Quality Control Practices" IN Pharmaceutical Quality Control Microbiology: A Guidebook to the Basics DHI Publishers, Inc. 2007.

* The ATCC Licensed Derivative® emblem, the ATCC Licensed Derivative® word mark and the ATCC® catalog marks are trademarks of ATCC® used under license. Kairosafe is licensed to use these trademarks and to sell licensed products manufactured for Mecconti using ATCC® materials derived from ATCC® cultures. Look for the ATCC Licensed Derivative® emblem for products derived from ATCC® cultures.

