

Erbari microbici

Paragrafo 1. INTRODUZIONE

I microrganismi rivestono un ruolo fondamentale per la biosfera, sia da un punto di vista evolutivo che ecologico. Le prime forme di vita sulla Terra erano microbiche e si può affermare che i microrganismi sono presenti sul nostro pianeta da almeno 3700 milioni di anni (cioè 3000 milioni di anni prima che comparissero piante e animali). Non solo, quindi, piante e animali sono prodotti recenti dell'evoluzione biologica terrestre, ma essi originano dai microrganismi. La biosfera terrestre è modellata in larga misura dalle attività geochimiche dei microrganismi che hanno reso possibile l'evoluzione di piante e animali e rendono possibile la perpetuazione di tutti i viventi. Molte specie microbiche, infatti, espletano processi geochimici unici, che costituiscono punti nodali nella funzionalità della biosfera.

Non sorprende, quindi, che la diversità genetica, metabolica e fisiologica dei microrganismi, sia molto maggiore di quella riscontrata nel mondo animale e vegetale. Contrariamente a quella di piante e animali, però, la biodiversità microbica è in gran parte sconosciuta (si veda...), anche se ciò che è noto di questa diversità ci lascia stupefatti. Si pensi, ad esempio, al fatto che alcuni microrganismi vivono a temperature uguali o superiori ai 100°C (fonti termali superficiali o profonde); altri vivono a temperature inferiori al punto di congelamento dell'acqua (ghiacci marini). Moltissimi crescono in assenza di ossigeno, e le loro attività sono indispensabili per espletare svariati processi ambientali essenziali (ad esempio, la produzione di metano e la fissazione dell'azoto atmosferico). Altri tollerano concentrazioni saline, pressioni osmotiche o valori di pH a cui nessuna pianta o animale potrebbe resistere.

La straordinaria diversità microbica prende forma anche attraverso i notevoli benefici sociali che i microrganismi, antichi alleati dell'uomo, ci regalano. Moltissime attività domestiche, quali la lievitazione del pane, la produzione dello yoghurt e dei formaggi, l'ottenimento delle bevande alcoliche e degli insaccati, fanno affidamento su microrganismi che espletano una o più linee chiave del processo in questione. I microrganismi partecipano da protagonisti benefici anche ad altre funzioni sociali. Ci affidiamo a loro per la produzione, di composti antibiotici e antitumorali e di moltissimi altri prodotti biotecnologici impiegati in medicina, in processi chimico trasformativi, nell'alimentazione umana e nella gestione dell'ambiente.

Nell'ultimo decennio si è sviluppata, soprattutto nel mondo scientifico, una nuova consapevolezza di questa straordinaria diversità microbica esistente sulla Terra.

I progressi nel campo della biologia molecolare hanno consentito di comparare fra di loro tutti i viventi, sulla base di sequenze geniche che durante l'evoluzione hanno conservato elevate identità. L'albero filogenetico che ne deriva mette in rilievo, ancora una volta, la fenomenale diversità che caratterizza il mondo dei microrganismi (Service, 1997). Le ramificazioni filogenetiche dei gruppi microbici, infatti, sono molto profonde, a indicare separazioni evolutive antichissime. Vi sono infatti 12 *phyla* di eubatteri, 3 di archea e numerosi altri *phyla* di altri microrganismi (funghi e protisti).

Altre indagini evidenziano che sulla Terra esistono molte più forme di vita di quanto sospettato fino a poco tempo fa. Per la verità, la gran parte dei microrganismi dei suoli e delle acque non sono mai stati coltivati e caratterizzati in laboratorio. Sicché, mentre le specie di piante e vertebrati descritte rappresentano quasi il 90% del totale, si stima che solo l'1% dei batteri siano stati descritti (Tab.1). L'albero filogenetico della vita, come oggi lo descriviamo, non è in grado di comprendere, dunque, tutte queste specie. Tuttavia, abbiamo da poco a disposizione tecniche molecolari che possono essere impiegate per identificare quei microrganismi ambientali non coltivabili. Coll'affinarsi delle nostre conoscenze e delle tecnologie di laboratorio, inoltre, stiamo imparando a coltivare un numero sempre più elevato di specie microbiche. I microbiologi possono dunque esplorare e quantificare l'estensione e la variegatura di questi regni nascosti, ultima grande frontiera della biologia terrestre.

La scarsissima attenzione che la ricerca sulla biodiversità microbica ha ricevuto, contrasta con la nuova, crescente consapevolezza dell'importanza che l'esplorazione del mondo microbico deve assumere, alla luce delle rivoluzioni metodologiche cui si è accennato e delle promesse applicative che vengono offerte.

La possibilità di studiare le popolazioni microbiche naturali è stata limitata, tradizionalmente, da un ostacolo imprescindibile: l'incapacità di coltivare la maggioranza dei microrganismi che si trovano in natura. Si stima infatti che le metodologie che partono dalla coltivazione dei microrganismi siano in grado di isolare meno dello 0,1% dei batteri totali presenti in un qualsiasi habitat naturale. Il rimanente 99,9% non può essere coltivato con le metodologie tradizionali. Dunque, non è più possibile (né utile) confidare esclusivamente sulla coltivazione per studiare la diversità microbica nelle popolazioni naturali. Le analisi filogenetiche molecolari, cui si è già accennato, forniscono invece la possibilità più razionale che abbiamo oggi a disposizione per effettuare classificazioni biologiche. E poiché la valutazione filogenetica si basa sulle sequenze, essa non dipende dall'isolamento dei microrganismi dall'ambiente. L'analisi dei tipi filogenetici, o filotipi, fornisce interessanti indicazioni riguardanti la natura e la fisiologia delle specie studiate.

Con queste procedure, sviluppate negli ultimi anni, l'ecologia microbica è oggi in grado di mettere in luce l'intera diversità delle forme microbiche. Assume dunque carattere prioritario la creazione di circostanze che favoriscano le indagini inerenti tutti gli aspetti della biodiversità microbica. Per raggiungere questo scopo si possono seguire approcci diversi, ma è sempre di primaria importanza esplorare soprattutto quegli habitat che promettono una maggior ricchezza, non solo in termini di biodiversità, ma anche in termini di unicità delle specie presenti.

Particolare importanza riveste, a tal proposito, lo studio delle simbiosi (microbo-pianta, microbo-animale, microbo-microbo) e delle cenosi microbiche, al cui interno vengono intessute complesse interdipendenze trofiche e metaboliche. Senza le simbiosi e le associazioni microbiche, un gran numero di piante e animali non potrebbero sopravvivere nelle comunità naturali. Largamente sconosciuti sono ad esempio la gran parte dei microrganismi simbiotici del tratto intestinale dei vertebrati e degli invertebrati, molti dei quali espletano processi digestivi anaerobici indispensabili per la nutrizione di questi animali. Le indagini miranti ad approfondire questi argomenti, e più in generale tutta la microbiologia delle simbiosi, vanno ricollegate a studi adeguati sull'ospite. Ciò consentirà, fra l'altro, di determinare il grado di coevoluzione dei simbiotici, e di definire eventuali traiettorie evolutive comuni. Vi sono altre associazioni microbiche che attendono indagini specifiche e approfondite, per esempio quelle micorriziche, quelle che alghe e batteri stabiliscono con molti animali marini, e le cenosi che partecipano ai processi di fertilizzazione naturale dei suoli e ai processi di biorisanamento ambientale. Occorrerà affrontare anche le problematiche legate alle simbiosi microbiche presenti nel corpo umano, e al ruolo che tali simbiosi giocano nel mantenimento dello stato di salute. Come già sottolineato, i batteri e i funghi vivono anche sulla superficie o all'interno di altri animali, e tali associazioni sono essenziali per la vita degli ospiti.

Le indagini sulla biodiversità microbica dovranno inoltre prestare particolare attenzione ai cosiddetti "punti caldi" della biosfera, cioè a quelle aree terrestri e acquatiche in cui si riscontrano densità particolarmente elevate di endemismi animali o vegetali. Ciascuno di questi endemismi, infatti, ospita una varietà interessantissima di microrganismi simbiotici, spesso caratterizzati da una rigorosa specificità d'ospite. Molti "punti caldi" vivono equilibri ecologici delicatissimi, spesso minacciati da impatti ambientali negativi, capaci talvolta di portare a estinzione uno o più endemismi. Ne consegue inevitabilmente la concomitante estinzione di tutte le specie microbiche obbligatoriamente associate alle specie estinte.

Tutti i microrganismi sono stati considerati per lungo tempo dai naturalisti gruppi tassonomici di organismi unicellulari appartenenti al regno vegetale (batteri, lieviti, microalghe) o animali (protozoi), come testimoniato, tra l'altro, dai molti termini ancora in uso ai nostri giorni, che

mostrano richiami specifici alle forme viventi macroscopiche (es. “microflora”). Infatti, la gran parte dei libri di botanica mantengono, per tradizione disciplinare, capitoli e sezioni dedicate a batteri, alghe e funghi; similmente, è ancora prassi piuttosto comune dedicare una parte dei libri di zoologia ai protozoi.

...

Solo molto raramente l’osservazione dei microrganismi ne consente l’identificazione. Più sovente, ottenuta una coltura pura di un microrganismo, esso è sottoposto a identificazione mediante una laboriosa serie di caratteristiche morfologiche, culturali, biochimiche e fisiologiche.

...

Paragrafo 2. COLLEZIONI MICROBICHE INTERNAZIONALI

Le principali collezioni microbiche del mondo fanno capo a una federazione denominata con l’acronimo WFCC (*World Federation of Culture Collection*). Questa è parte della IUBS (Unione Internazionale delle Scienze Biologiche) e della IUMS (Unione internazionale Società Microbiologiche). Its aim is to promote and support the establishment of culture collections and related services, to provide liaison and set up an information network between the collections and their users, to organise workshops and conferences, publications and newsletters and work to ensure the long term perpetuation of important collections. La WFCC opera per mezzo di un comitato esecutivo e di una serie di Comitati settoriali. A partire dagli anni '60 del secolo scorso, essa ha messo a punto una vastissima base di dati pubblica (<http://wcdm.nig.ac.jp/>) che compendia i dati di 476 collezioni dislocate in 62 paesi. Ogni collezione ha due schede (record): nella prima sono illustrate idati riguardanti le generalità della collezione (caratteristiche e specializzazioni, servizi offerti, attività scientifica, dislocazione, contatti); nella seconda (accessibile dalla prima) vi si trovano le liste delle specie conservate.

Alcune di queste collezioni sono settoriali o specializzate, spesso emanazioni di istituti di ricerca e dipartimenti universitari. Un esempio delle prime è l’ACAM (*Australian Collection of Antarctic Microorganisms*), una collezione che ospita 400 ceppi batterici antartici. Un esempio di collezione “generalista”, è invece l’ATCC (*American Type Culture Collection*), forse la più grande collezione microbica, che ospita quasi 80.000 ceppi di ogni categoria microbica (virus, batteri, alghe protozoi, lieviti e funghi filamentosi) e in cui lavorano circa 200 specialisti.

Quasi tutte le collezioni mettono a disposizione i ceppi agli studiosi e alle istituzioni di ricerca. Generalmente gli interessati pagano una cifra che serve a coprire le spese di spedizione e i costi legati alle operazioni necessarie per rintracciare, smistare ed eventualmente rivitalizzare i ceppi richiesti. Le modalità di richiesta dei ceppi e i costi sono di solito illustrati nelle schede della base di dati della Federazione.

L’Italia presenta, come spesso succede, un quadro frammentario e privo di riferimenti governativi: 7 collezioni registrate, di cui solo 6 microbiche, contro le 29 Francesi, le 19 britanniche e le 11 tedesche. Moltissime le piccole collezioni dislocate nei diversi istituti di ricerca universitari e non. Tra queste, sono da segnalare la collezione dell’Istituto Superiore della Sanità (specialmente microrganismi patogeni umani e veterinari) e, di una certa importanza in campo Enologico, quelle di Faenza () e Sassari (Dip. ... dell’Università). Nessuna collezione italiana è di emanazione ministeriale o governativa; tutte sono di settore e generalmente fanno capo a istituti di ricerca universitari o del CNR. La più ampia numericamente è quella che fa capo alla Microbiologia Agraria di Perugia (ca. 1000 ceppi di lievito, prevalentemente di rilevanza industriale). Poco, a paragone, per es. con i Paesi Bassi, che hanno 5 collezioni, tutte supportate dal governo; tra queste,

lo storico e autorevole CBS (*Centraalbureau voor Schimmelcultures*), centro di riferimento internazionale per le colture fungine e blastomicetiche.

Collezione							
Centro Enterobatteri Patogeni Italia Meridionale							
Collezione dell' Istituto di Microbiologia							
Centro di Studio dei Microorganismi Autotrofi del CNR	Firenze						
Industrial Yeasts Collection	Perugia						
National Culture Bank							
Collection of Leptospira Strains							

Paragrafo 3. COME SI PREPARA UN “ERBARIO MICROBICO”

L'equivalente funzionale dell'erbario, per chi studi i microrganismi, è il preparato fissato e colorato su vetrino, che può essere conservato indefinitamente in apposite collezioni. Tuttavia, la devitalizzazione che accompagna il processo di fissazione, porta quasi sempre a profondi mutamenti morfologici e di aggregazione delle cellule preparate, riducendo significativamente l'efficacia di questo strumento per le diagnosi morfologiche. E' prassi corrente, quindi, tra chi si occupa di biologia microbica, quella di effettuare le diagnosi morfologiche prima di tutto impiegando preparati *a fresco*, impieganti cioè cellule vive risospese generalmente in acqua sterile. Di qui la necessità di mantenere i microrganismi vivi nel tempo, per averli a disposizione quando se ne abbia necessità. Ciò si ottiene mediante l'allestimento di collezioni microbiche. Le collezioni microbiche consentono di avere a disposizione cellule in coltura nel giro di pochi giorni, e ciò permette di effettuare, oltre che le osservazioni microscopiche già menzionate, anche quelle colturali in liquido (es., crescita dispersa o aggregata) e su superficie agarizzata (es., forma e morfologia delle colonie). Tali caratteristiche sono di fondamentale importanza per la descrizione e l'identificazione delle colonie. Si aggiunga, infine che la disponibilità di cellule fresche consente allo studioso di poter effettuare, quando lo voglia tutti i test biochimici e fisiologici che servono a identificare il microrganismo.

Idealmente, quindi, un “erbario microbico” consiste in una collezione di colture pure conservate con diversi metodi (es., liofilizzazione, ibernazione), preventivamente identificate mediante tutti i test ritenuti canonici nell'ambito degli studiosi di tali microrganismi. A ciascuna coltura saranno associati uno o più preparati fissati e colorati delle stesse cellule, riposti in apposite teche e osservabili rapidamente senza scomodare le colture pure. Alla stessa coltura sarà anche associata una scheda contenente gli esiti dei test diagnostici effettuati per quella coltura, oltre che una o più microfotografie effettuate sui corrispondenti preparati a fresco e fissati.

Solitamente, le grandi collezioni microbiche conservano colture pure vitali identificate e classificate. A ciascuna coltura è abbinata una scheda contenente tutte le informazioni disponibili per quella coltura, comprese, talvolta, una o più microfotografie di preparati a fresco.

Le collezioni piccole e medie, quelle che spesso caratterizzano i centri di ricerca o i laboratori, essendo in genere specializzati, raccolgono solo o prevalentemente colture microbiche di interesse (es. parassiti microbici dei vertebrati). Di queste, talvolta, si conservano, quando possibile, oltre che le cellule vitali, anche collezioni di cellule preparate su vetrini mediante fissazione e colorazione.

...

Per ragioni di spazio e dato il contesto di questo volume, la trattazione sarà limitata a batteri e lieviti.

1. I preparati fissati

a. PREPARAZIONE DELLO STRISCIO

- i. Si rimuova con un'ansa sterile una piccola quantità di materiale batterico da una colonia fresca ottenuta su mezzo di coltura agarizzato e la si risospenda in acqua sterile mediante un vortificatore elettrico. La sospensione dovrebbe apparire lievemente lattiginosa (opalescente).
- ii. Si collochi una goccia di tale sospensione su un portaoggetto (mediante ansa o micropipetta). Si spanda in maniera regolare la goccia sulla superficie del vetrino in modo da ottenere una piccola chiazza sottilissima da lasciare asciugare all'aria (generalmente, 1-5 min.). Dopo l'asciugatura, sul vetrino dovrebbe essere appena visibile una pellicola cellulare sottile e regolare, denominata *striscio*.
- iii. Tenendo il vetrino con una pinza a punte piatte, lo si passi rapidamente attraverso la fiamma di un bunsen (2-5 volte)

b. COLORAZIONI

Le colorazioni dei preparati fissati hanno lo scopo di mettere in risalto informazioni cellulari di natura morfo-strutturale e biochimico fisiologica. I coloranti possono essere acidi, basici o neutri. I primi hanno elevata affinità soprattutto per il citoplasma, mentre gli ultimi per il materiale nucleare. Entrambi sono impiegati, di solito, sotto forma di sali. Durante le colorazioni è buona norma effettuare un controllo negativo e uno positivo, impiegando microrganismi adatti. La soluzione colorante dovrà sempre essere versata direttamente sul vetrino. A colorazione avvenuta, si rimuoverà il colorante con acqua corrente e si asciugherà il vetrino con carta da filtro.

b.1 COLORAZIONI SEMPLICI. Hanno lo scopo di mettere in evidenza le dimensioni, la forma e le aggregazioni cellulari. Si riportano di seguito due comuni procedure di colorazione batterica, adatte per scopi di valutazione morfologica generale. Entrambe producono cellule colorate intensamente in cui non si mettono in risalto le differenziazioni intracellulari. Con la prima procedura, inoltre, si possono mettere in evidenza eventuali granuli metacromatici.

Con soluzione di Loeffler

- i. Si prepari la soluzione sciogliendo 1,6 g. di blu di metilene·HCl in 100 ml di etanolo al 95% (v/v) e unendo infine 100 ml di KOH allo 0,01% (w/v).
- ii. Si immerga lo striscio batterico fissato nella soluzione di Loeffler per 10 secondi.
- iii. Si rimuova il colorante con acqua corrente e si asciughi con carta da filtro.

Con soluzione di Ziehl

- i. Si prepari una soluzione satura di fucsina basica solubile in alcol e si uniscano 10 ml di tale soluzione con 100 ml di soluzione di fenolo al 5%.
- ii. Si immerga lo striscio batterico fissato nella soluzione di Ziehl per 20 secondi.
- iii. Si rimuova il colorante con acqua corrente e si asciughi con carta da filtro.

b.2 COLORAZIONI DIFFERENZIALI. Hanno lo scopo di evidenziare informazioni riguardanti, ad es., la chimica della cellula, le strutture subcellulari, etc. Si riportano di seguito ... di procedure, adatte per scopi di valutazione morfologica differenziale.

Colorazione di Gram

endospore
flagelli
capsule
nuclei e nucleoidi
ascospore dei lieviti
...
etc.
...

2. I preparati freschi

descrizione dei preparati freschi

- procedura a goccia sospesa
- procedura a goccia schiacciata

3. Allestire una collezione microbica

Esistono collezioni microbiche in cui le colture sono mantenute vitali, o “fresche”, su (o in) terreno di coltura adatto, a temperature ridotte, onde mantenere ridotto il metabolismo dei ceppi. In questo modo, le colture possono essere mantenute per brevi periodi (da pochi giorni a qualche settimana). Esistono poi collezioni i cui ceppi sono mantenuti vitali per anni o addirittura indefinitamente, mediante riduzione drastica, o annullamento di ogni attività metabolica cellulare.

a. Colture fresche mantenute in condizioni di metabolismo ridotto

I microrganismi sono conservati in celle refrigerate (4-10°C) sotto forma di colture agarizzate o liquide. In tali condizioni i ceppi hanno una conservabilità di breve durata; quindi, per mantenerli indefinitamente, occorrerà trasferirli (“ripassarli”) periodicamente su terreni freschi. Al vantaggio dei costi d’investimento relativamente contenuti, queste collezioni abbinano lo svantaggio della necessità di spazi ampi a quello della laboriosità, e quindi della necessità di molto personale per il loro mantenimento. Inoltre, poiché le colture conservate in questo modo vanno incontro comunque, durante l’anno, a un certo numero di generazioni (sia dopo i trasferimenti, quando le colture sono messe a incubare a temperatura ottimale sino alla rigenerazione di una biomassa fresca; sia, seppure a tassi ridotti, in cella fredda) essi andranno accumulando inevitabilmente un certo numero di mutazioni genetiche e andranno inevitabilmente a divergere dal ceppo di partenza.

- procedura: provette a becco di clarino

b. Colture mantenute in condizioni di metabolismo azzerato.

Queste sono colture essiccate, liofilizzate oppure ibernare (temperature < 0°C). In tali condizioni i ceppi hanno una conservabilità di lunga o lunghissima durata e non occorrerà rigenerare in continuazione le colture. Soprattutto con la crio-conservazione i costi d’investimento sono elevati, ma, rispetto alle colture fresche, i costi di mantenimento generalmente si riducono, e così pure – a parità di ceppi da mantenere - gli spazi per lo stoccaggio.

i. Colture crioconservate

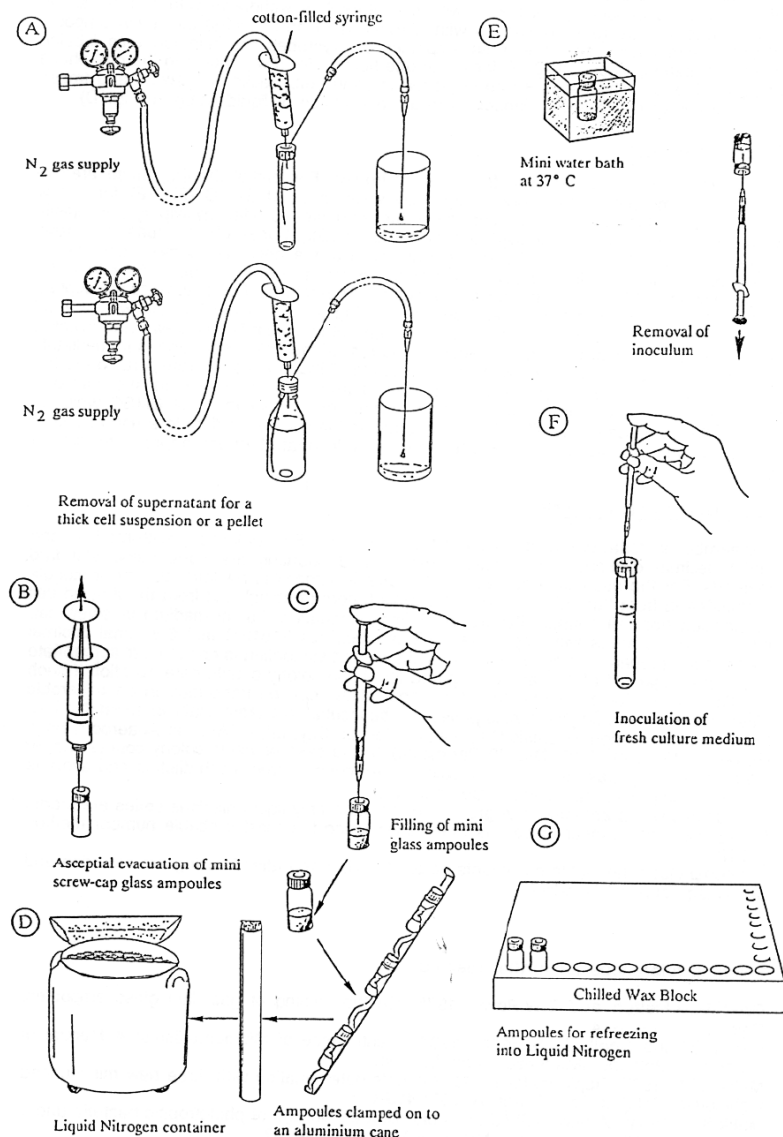
La crioconservazione dei microrganismi procariotici ed eucariotici in azoto liquido a -196 C è un metodo estremamente affidabile e generalmente considerato superiore a ogni altro metodo di conservazione. Un’interessante alternativa, impiegante temperature di -130°C, oggi ottenibili con congelatori meccanici (*ultrafreezer*), garantisce un’ottima conservabilità delle colture e riduce di

molto i costi di gestione legati soprattutto al fatto che non è più necessario approvvigionarsi di azoto liquido ricorrendo a sistemi di trasporto e stoccaggio piuttosto costosi. Accettabili sono anche le crioconservazioni in congelatori da -85°. La durata delle colture, in questo caso, è stimabile in 10-30 anni.

- Procedura semplice (1), “universale” (per piccoli lab e gruppi di ricerca) [vale per batteri e lieviti]

Procedura Batterica (1)

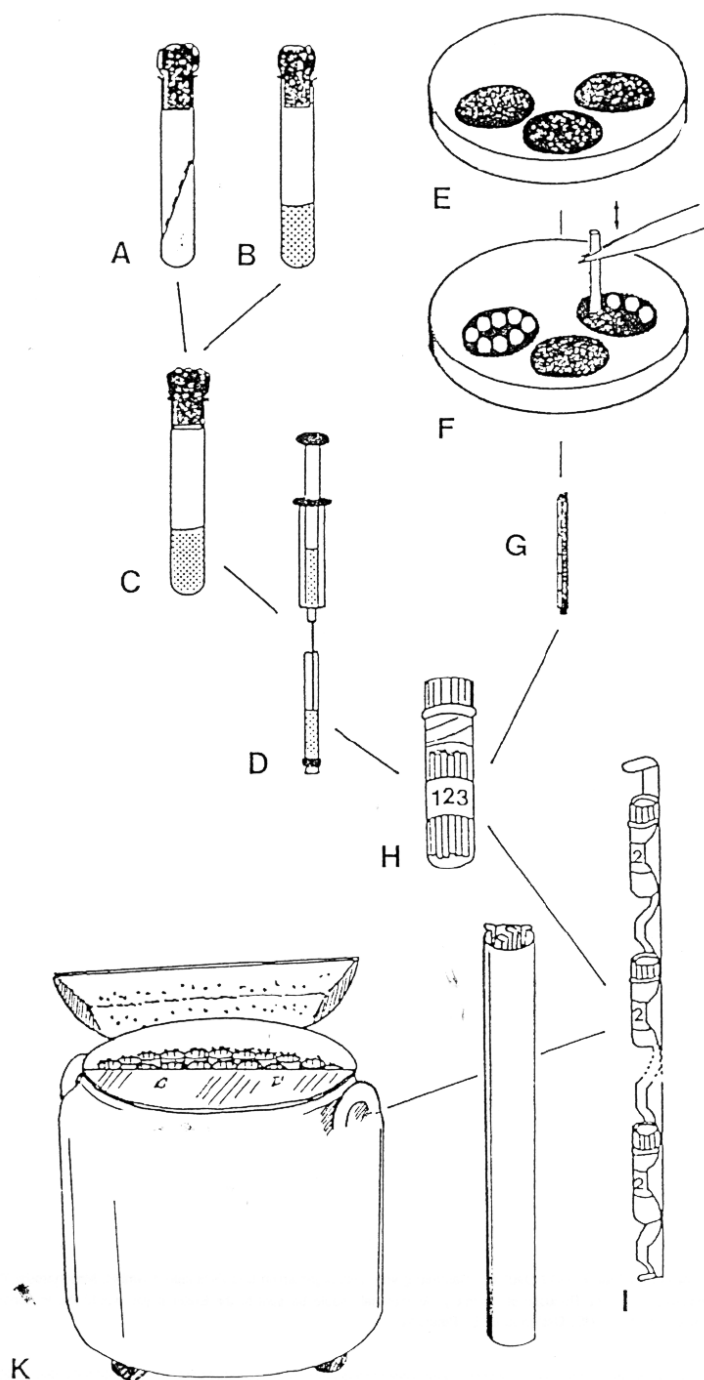
Conservati in azoto liquido, I batteri mantengono di solito elevati tassi di sopravvivenza e ottima stabilità genetica anche nel lungo termine. I recipienti di stoccaggio possono essere i *cryotube* di polipropilene, le fiale di vetro, i capillari di vetro, le cannucce di polipropilene (quelle per le bibite) o, infine, le ampolle con tappo a vite. Quest’ultime sono anche adatte per la conservazione di batteri anaerobi. Il metodo qui descritto è efficace e poco costoso.



Procedura per lieviti (1)

Il metodo che riportiamo, semplice ed economico, è applicabile a diversi microrganismi fungini, quali lieviti, funghi miceliali e muffe.

Fig. 1: Cryopreservation of fungi and yeasts

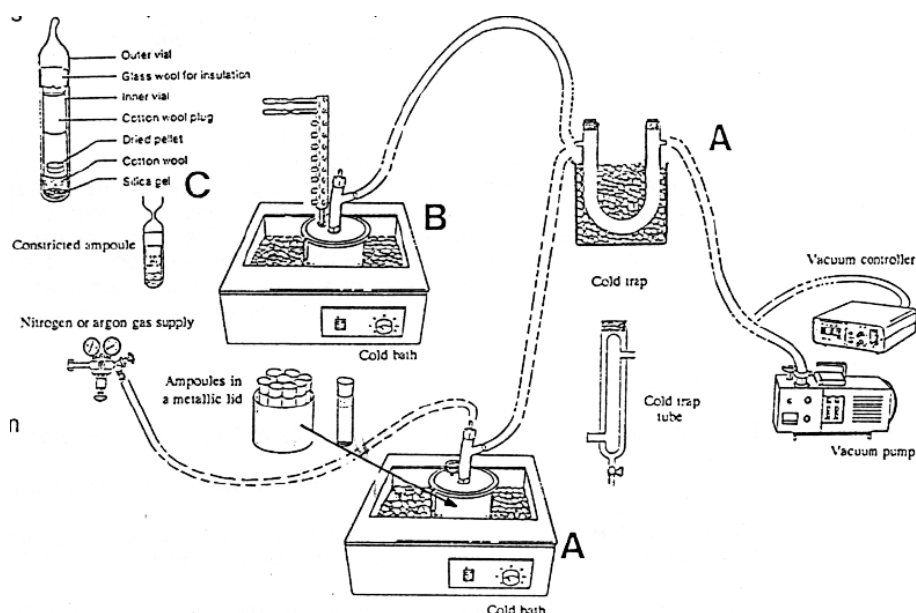


ii. Colture liofilizzate

La liofilizzazione delle colture microbiche (ingl. *freeze-drying*) è un metodo indicato per la conservazione di lungo termine di quasi tutti i microrganismi. Occorre, tuttavia, prendere alcune precauzioni speciali per quei microbi che si dimostrano sensibili al deessiccamento, alla luce, all'ossigeno, alla pressione osmotica, alla tensione superficiale e ad altri fattori ambientali particolari. Esiste ormai una vasta messe di pubblicazioni che descrivono la messa a punto di procedure particolari (o varianti di procedure precedentemente descritte) per ottenere buoni liofilizzati da colture microbiche costituite da ceppi sensibili a questi fattori. Il metodo descritto nel

seguito è relativamente semplice (Malik, 1988) e fa uso di alcuni agenti cellulari protettivi (Malik, 1976 & 1988) quali latte scremato in polvere, meso-inositolo, miele, glutammate o raffinose, da impiegarsi per risospendere le cellule prima della liofilizzazione. Molti anaerobi, di solito sensibili alla liofilizzazione aerobica, possono essere protetti efficacemente impiegando charcoal (5 % w/v) nel mezzo in cui si risospendono le cellule prima del processo (Malik, 1990).

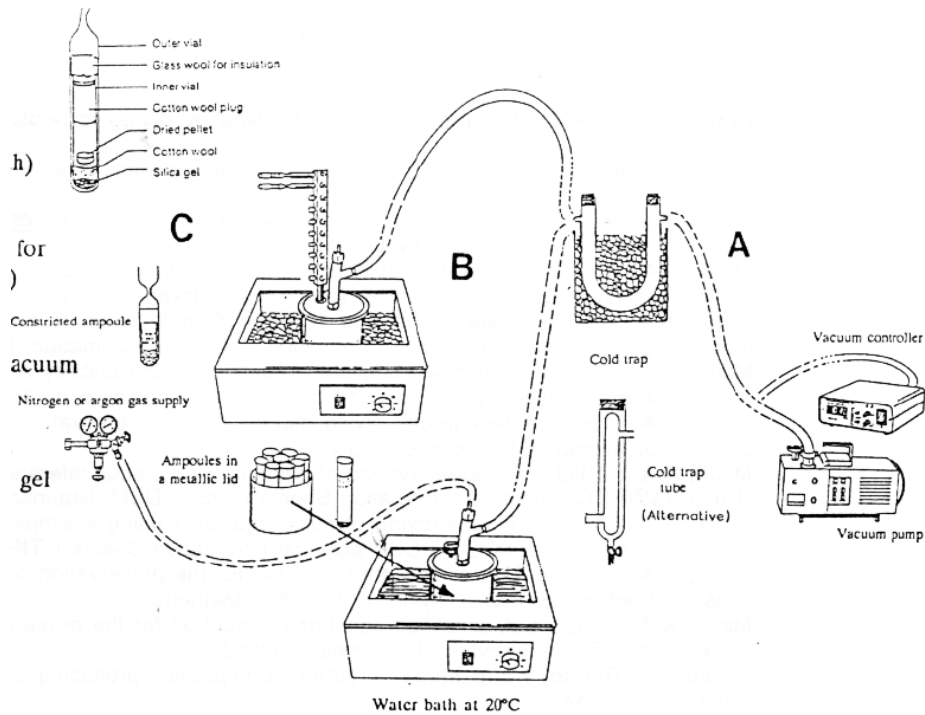
With this simple method various yeasts, sporulating fungi, and bacteria can successfully be preserved. Many delicate microorganisms such as nitrogen-fixing bacteria like *Azospirillum*, *Azotobacteraceae*, *Rhizobium*, *Xanthobacters*, *Spirillaceae*, *Vibrios*, and others like *Alcaligenes*, *Ancylobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonads* and few *Rhodospirillaceae* resulted in a fairly good viability and stability after Iyophilization and during storage. However, relatively low viability results in the case of various yeasts such as *Leucosporidium*, *Sporobolomyces*, *Rhodospiridium*, *Zygosaccharomyces* and fragile bacteria like *Aquaspirillum*, *Spirosoma*, *Flectobacillus*, and others, as compared to the Iyophilization done under standard conditions (Malik, 1988 & 1990). The method is simple and the equipment described here can be easily constructed in most laboratories.



iii. Colture essiccate

L'essiccazione delle colture (ingl. *liquid-drying*) consiste in una disidratazione sotto vuoto non preceduta da congelamento ed è particolarmente adatta per i molti microrganismi sensibili o ipersensibili al congelamento e/o alla liofilizzazione. Utilizzata con successo in molte collezioni microbiche di rilevanza mondiale per conservare colture caratterizzate da cellule aerobie e anaerobie fragili e delicate, questo metodo può essere attuato anche con procedure relativamente semplici e impieganti apparati semplici e relativamente economici, come quella descritta da Malik (1990).

La procedura, descritta in appendice, consiste ... descrizione dei principi generali.



APPENDICE METODOLOGICA

Procedura 1

Procedura 2

Procedura 2

.....

Paragrafo 4. BIBLIOGRAFIA

- Amann RI, W Ludwig e KH Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Reviews* 59:143-169.
 - Bianchi A e L Guiliano. 1996. Enumeration of viable bacteria in the marine pelagic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 174-177.
- DIVERSITAS. 1996. An International Programme of Biodiversity Science. Operational Plan. DIVERSITAS, Paris
- Ferris MJ, AL Ruff-Roberts, ED Kocczynski, MM Bateson e DM Ward. 1996. Enrichment culture and microscopy conceal diverse thermophilic *Synechococcus* populations in a single hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1045-1050.
- Fuhrman JA, K McCallum e AA Davis. 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature (London)* 356: 148-149.
- Gams W. 1992. The analysis of communities of saprophytic fungi with special reference to soil. *In Fungi in Vegetation Science* (W Winterhoff, ed.) Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands, pp. 183-223.
- Gaston KJ and RM May. 1992. Taxonomy of taxonomists. *Nature* 356:281-282.
- Green DG. 1994. Databasing diversity—a distributed, public domain approach. *TAXON* 43:51-62.
- Heywood VH (ed.). 1995. *Global Biodiversity Assessment*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Hungate RE. 1966. *The Rumen and Its Microorganisms*. Academic Press, New York
- Kane MD e NE Pierce. 1994. Diversity within diversity: molecular approaches to studying microbial interactions with insects. *In Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications* (E Schierwater, B Streit, GP Wagner e R DeSalle, eds) pp. 509-524. *Berghanser Verlag*, Basel
- McInerney JO, M Wilkinson, JW Patching, TM Embley e R Powell. 1995. Recovery and phylogenetic analysis of novel archaeal rRNA sequences from a deep-sea deposit feeder. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1646-1648.
- Myers N. 1990. The biodiversity challenge: expanded hot-spots analysis. *The Environmentalist*. 10:243- 256.
- Pace NR, ER Angert, EF DeLong, TM Schmidt e GS Wickham. 1993. New perspective on the natural microbial world. *In Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics* (RH Baltz, GD Hegeman e PL Skatrud, eds). pp. 77-83. *American Society for Microbiology Press*, Washington, D. C.
- Pimm SL, GJ Russell, JL Gittleman e TM Brooks. 1995. The future of biodiversity. *Science* 269:347- 350.

- Service RF. 1997. Biodiversity: microbiologists explore life's rich, hidden kingdoms. *Science* 275: 1740.
- Schut F, EJ de Vries, JC Gottschal, BR Robertson, W Harder, RA Prins and DK Button. 1993. Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2150-2160.
- Sogin ML. 1994. The origin of eukaryotes and evolution into major kingdoms. In "Early Life on Earth—A Nobel Symposium" (S Bengtson, ed).
- Sogin ML, JD Silberman, G Hinkle e G Morrison. 1996. Problems with molecular diversity in the Eucarya. *Society for General Microbiology Symposium* in press.
- Sogin ML, HG Morrison, G Hinkle e JD Silberman. 1996. Ancestral relationships of the major eukaryotic lineages. *Microbiologia SEM* 12:17-28.
- Stackebrandt E e BM Goebel. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. System. Bacteriol.* 44:846-849.
- Staley JT e AE Konopka. 1985. Measurement of in situ activities of heterotrophic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Ann. Rev. Microbiol.*, 39: 321-46.
- Stevens TO e JP McKinley. 1995. Lithoautotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers. *Science* 270:450-454.
- Tiedje JM. 1995. Approaches to the comprehensive evaluation of prokaryotic diversity of a habitat. In *Microbial Diversity and Ecosystem Function* (eds. D Alsopp, RR Colwell e DL Hawkesworth). CAB International (in association with United Nations Environment Programme).
- Tiedje JM, J Urbance, N Larsen, T Schmidt, O Strunk, S Pramanik, R Overbeek, R Martin e J Holt. 1996. Towards an integrated microbial database. In: *Culture Collections to Improve the Quality of Life* (eds. RA Samson, et al.). CBS Publications, The Netherlands.
- Tørsvik, V, J Goksoyr e FL Daae. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:782-787.
- Vandamme, P, K Pot, M Billis, P DeVos, et al. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60:407-438.
- White, DC. 1995. Chemical ecology: Possible linkage between macro- and microbial ecology. *Oikos* 74:174-181.
- Wilson, KH, and RB Blitchington. 1996. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2273-2278.
- Woese, CR. 1994. There must be a prokaryote some-where: microbiology's search for itself. *Microbiol. Rev.* 58:1-9.