



Biodermol

SPERIMENTAZIONE ANTIMUFFA ATX80

Eseguita presso l'Istituto conciaro di Arzignano (VI)

A - Scelta del materiale da utilizzare

CAMPIONE

Pelle normale da conceria fatta di:

- 3% solfati di cromo
- 6-7% acidi grassi
- 15% acqua
- il resto è tutta pelle

ANTIMUFFA ATX 80

Un antimuffa è una sostanza che neutralizza l'effetto negativo dell'ossigeno. L'ossidazione dei prodotti, che avviene in presenza di ossigeno, comporta un indesiderabile colore scuro e/o un cattivo odore e sapore conosciuto come rancidità. Gli antimuffa sono sostanze che reagiscono con l'ossigeno e quindi neutralizzano i suoi effetti negativi. Un esempio di antimuffa è rappresentato dalla vitamina C.

6 OLI DA CONGERIA Olio solfitato: 1, 2, 3, 4, 5, 6

Nomi, caratteristiche e perché si usano:

OLIO sostanza organica naturale o artificiale, di origine vegetale, animale o minerale, a base di idrocarburi o esteri della glicerina ed acidi grassi superiori, liquida a temperatura ambiente, insolubile in acqua ed insolubile in solventi, utilizzata in campo conciaro per lubrificare il tessuto dermico, facilitare lo scorrimento reciproco delle fibre ed ostacolare l'ossidazione superficiale del cuoio.

LAVORARE SU PIASTRE

Le piastre sono più vantaggiose poiché la muffa è esposta all'aria per cui ha tutto (ossigeno...) e la crescita è sicura; inoltre è possibile osservare meglio i risultati.

MATERIALE DA LABORATORIO USATO PER L'ESPERIENZA

- autoclave
- becher
- bilancia elettronica
- bunsen
- cappa biologica
- cilindri graduati
- piastre
- pipette sterili
- propipette
- spatole
- Vetrini e coprivetrini

TERRENI

Sabouraud n°9 tryptone soya broth TSA n°10

Sabouraud dexstrose agar:

per la preparazione di questo terreno bisogna pesare 15 gr (del terreno in polvere) in 500 ml di H₂O; porli in autoclave a 121° (gradi centigradi per 15' minuti).

B - Effettuare le prove

PRIMA PROVA: SEMINA PER INCLUSIONE E SPATOLAMENTO

12 gennaio 2007

SCOPO

Studiare lo sviluppo delle muffe negli oli conciarati e valutarne la carica microbica.

PROCEDIMENTO

Abbiamo usato 5 oli di conceria diversi tra loro, scelti a caso.

Per ogni olio abbiamo svolto una prova con:

- terreno sabouraud e tecnica inclusione
- terreno sabouraud e tecnica spatolamento superficiale
- terreno TSA e tecnica inclusione
- terreno TSA e tecnica spatolamento superficiale

Lavoro svolto sempre sottocappa

Oli: 1, 2, 3, 4, 5

Totale piastre: 20

cioè 2 terreni per ogni olio (tot 5) per l'inclusione e per lo spatolamento.



Olio 3 - SPATOLAMENTO SUPERFICIALE
Terreno Sabouraud

RISULTATI

Dopo una settimana di incubazione.

Tecnica	Terreno	Olio	Crescita	Carica microb. tot
Inclusione	sabouraud	1	Sì	Irrilevante
		2	Sì	Irrilevante
		3	Sì	Irrilevante
		4	Sì	Irrilevante
		5	Sì	irrillevante
Spatol	sabouraud	1	Sì	3
		2	Sì	1
		3	Sì	>50
		4	Sì	3
		5	Sì	7
Spatol	TSA	1	Sì	1
		2	Sì	10
		3	Sì	6
		4	Sì	1 (resto incontabile)
		5	Sì	Incontabile
Inclusione	TSA	1	Sì	>30
		2	Sì	2
		3	Sì	Incontabile
		4	Sì	1
		5	Sì	5

SECONDA PROVA: PIASTRE CONTACT

SCOPO

Prelevare direttamente dalla pelle conciaria le muffe e iniziare le prime prove con l'antimuffa.

PROCEDIMENTO

Preparare 10 piastre contact con terreno sabouraud.

Prelevare dalla pelle conciaria in esame, in 5 zone diverse, le muffe con piastre contact:

- sulle prime 5 non è applicare l'antimuffa ATX80
- sulle ultime 5 applicare 0,1ml di antimuffa ATX80 con una pipetta sterile (prelievo svolto vicino a due lampade bunsen)

RISULTATI

PIASTRE SENZA ANTIMUFFA ATX80	CRESCITA	CARICA MICROBICA TOT
A	Si	Incontabile
B	Si	Incontabile
C	Si	Incontabile
D	Si	Incontabile
E	Si	Incontabile

PIASTRE CON ANTIMUFFA ATX80	CRESCITA	DESCRIZIONE
A	Si	Incontabile
B	Si	Incontabile
C	Si	Incontabile
D	Si	Incontabile
E	Si	Incontabile



SABOURAUD MUFFA C
Con antimuffa ATX80



SABOURAUD MUFFA C
Senza antimuffa ATX80

TERZA PROVA: DILUIZIONI TIRO A FORCELLA

26 febbraio 2007

SCOPI

- Stabilire la quantità minima di antimuffa ATX80 alla quale la muffa cresce
- stabilire a quale quantità l'antimuffa ATX 80 utilizzato blocca la crescita delle muffe
- stabilire la temperatura e il tempo necessario in cui le muffe crescono
- stabilire quale olio è più sensibile, cioè l'olio dove le muffe crescono di meno

PROCEDIMENTO

A Uso l'antimuffa ATX80 puro al 20%

Preparo una soluzione diluita al 2% poiché il rapporto con l'antimuffa ATX80 è 1:10

Preparare la soluzione diluita al 2%

Aggiungo: 1ml di antimuffa ATX80

9ml di diluente

Lavoro svolto in condizioni di sterilità, sottocappa e con uso di due pipette sterili

B Preparare 6 barattoli per ogni olio ognuno contenente:

- 40ml di acqua deionizzata
- 0,6gr di agar-agar
- 2,6gr di broth sabouraud olio

C Stabilire quanti ml di olio utilizzare.

Per gli oli 5, 1, 6 che sono troppo densi e a densità incognita, questa viene calcolata poiché la densità è un dato indispensabile.

Per i 3 oli uso 2,8 ml ciascuno.

Procedimento per calcolare la densità degli oli:

- pesare un cilindretto vuoto da 10ml su una bilancia elettronica
- aggiungere 5ml di acqua deionizzata
- con una bacchetta in vetro aggiungo due "bacchettate" di olio
- chiudo il cilindretto con cartafina
- omogeneizzo la soluzione ed eseguo le pesate necessarie

Si ottengono le seguenti densità:

$$\text{Peso} = \text{densità} * \text{Volume}$$

$$\text{Densità} = \text{Peso} \setminus \text{Volume}$$

$$d = (\text{peso finale} - \text{peso iniziale}) \setminus (\text{volume finale} - \text{volume iniziale})$$

Legenda

Peso iniziale = peso del cilindretto vuoto da 10 ml = 22,96 gr

Peso finale = peso del cilindretto + 5ml di acqua deionizzata + 2 "pennellate" di olio

Volume iniziale del cilindretto con i 5ml di

Volume finale del cilindretto con i 5 ml di acqua deionizzata + l'olio acqua deionizzata

D Per ogni olio preparare 6 barattoli di Agar sabouraud + acqua deionizzata.

olio 5	densità: 1,1 gr/ml	per 2,8ml uso:	
olio 6	densità: 0,975 gr/ml	olio 5	3,08mg
olio 1	densità: 1 gr/ml	olio 6	2,73mg
		olio 1	2,8mg

Su 3 barattoli aggiungo la soluzione PURA		Su 3 barattoli aggiungo la soluzione DILUITA	
Diluizioni	ml	Diluizioni	ml
1%	0,5	1%	0,5
0,5%	0,25	0,05%	0,25
0,25%	0,125	0,025%	0,125

E Versare il contenuto di ogni barattolo in una piastra.

Quando il terreno si è solidificato, aggiungere l'inoculo.

F Preparare l'inoculo.

Prelevare direttamente dalle muffe sulla pelle conciaria tramite ansa sterile: introdurre le muffe in una provetta già contenente soluzione fisiologica.

Agitare con il vortex.

Si procede, per spatolamento superficiale, alla distribuzione di 0,1ml di inoculo con una pipetta sterile e si distribuire con etaleur.

Dopo quattro giorni, a temperatura ambiente, si è verificata la crescita.



OSSERVAZIONI

La crescita è avvenuta su tutte le piastre però alcuni oli hanno reagito meglio di altri con l'antimuffa ATX80; ovvero, sulle piastre degli oli 1 e 5, si può visibilmente constatare che la quantità di muffe è minore.

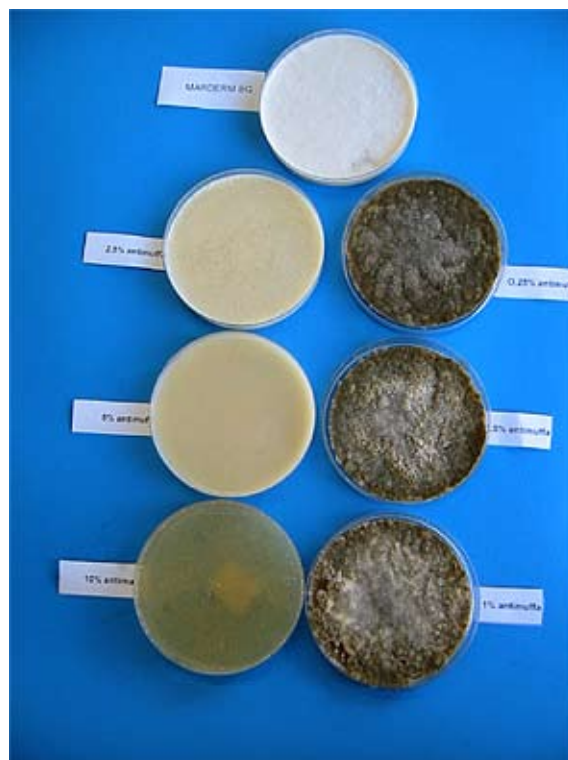
DILUIZIONE	ML DI ANTIMUFFA ATX80
10%	5ml
5%	2,5ml
2,5%	1,25ml

Aumentiamo quindi la concentrazione di antimuffa ATX80 del 10% su questi oli e ripetiamo il procedimento.

Utilizziamo solo l'antimuffa ATX80, no la soluzione diluita.



Olio 1
Terreno sabouraud
Antimuffa ATX80 10%



Olio 1
Terreno sabouraud
Antimuffa ATX80 10%

OSSERVAZIONI

Ponendo a confronto:

- piastra di controllo (bianco) = terreno + olio + muffa (inoculo)
- piastra prima = terreno + olio + muffa (inoculo) + antimuffa ATX80 1%
- piastra seconda = terreno + olio + muffa (inoculo) + antimuffa ATX80 10%

Si può notare che:

- sulla piastra di controllo è avvenuta la crescita di muffa bianca
- sulla piastra con antimuffa ATX80 all'1% ha attecchito meglio la muffa verde
- sulla piastra con antimuffa ATX80 al 10% entrambe le muffe spariscono e l'antiossidante ATX80 reagisce col terreno che cambia colore

CONCLUSIONI

E' stato dimostrato che è presente attività antimuffa:

essa può dipendere dal diverso tipo di olio usato a seconda dell'interazione con olio-antimuffa ATX80 o dalla diversa concentrazione dell'olio stesso.

Sono stati riscontrate 2 tipi di muffe: verdi e bianche.

Le muffe bianche hanno il sopravvento sulle muffe verdi a condizioni normali;

in presenza di antimuffa ATX80 all'1%, la muffa bianca è più sensibile, sparisce e prende il sopravvento la muffa verde.

Abbiamo ottenuto che:

- la quantità minima di antimuffa ATX80 è 1%
- la quantità massima di antimuffa ATX80 è 10%

QUARTA PROVA: RICONOSCIMENTO DELLE MUFFE

MATERIALE

- Vetrini e coprivetrini sterili
- una lampada bunsen
- Ansa
- terreno sabouraud

PROCEDIMENTO

- Versare un po' di terreno sui vetrini, giusto per formare un centimetro
- prelevare la muffa dalle piastre e strisciare, con l'ansa sterile, i vetrini
- aggiungere una goccia di acqua
- coprire con i coprivetrini e attendere

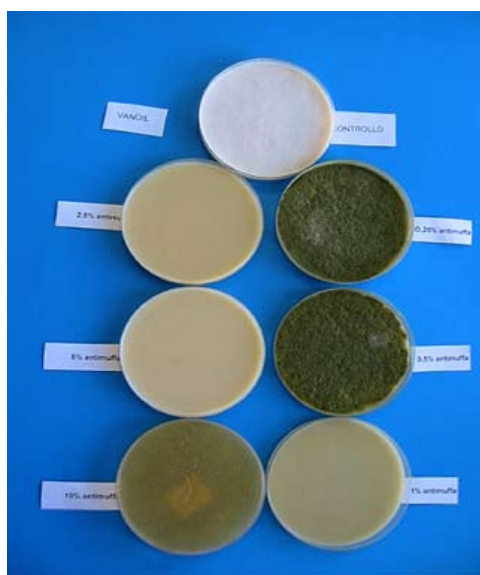
CONCLUSIONI

Dopo 4 giorni a temperatura ambiente si può osservare la crescita ai vetrini al microscopio si è scoperto che le muffe appartengono al genere *Aspergillus terreus*!!

L'aspergillo è un genere di circa 200 muffe trovate in tutto il mondo. L'aspergillo in primo luogo è stato catalogato nel 1729 dal priest e dal biologo italiani Pietro Antonio Micheli. Osservando i funghi al microscopio, Micheli è stato attratto dalla figura di un aspergillum (spruzzatore santo dell'acqua) ed ha chiamato il genere di conseguenza.

Alcune caratteristiche dell'*Aspergillus terreus*:

- conidioforo incolore liscio (100-250 micron)
- vescicola a cupola, subglobosa (10-16 micron)
- biseriato; metule cilindriche
- fialidi originanti sulla metà o i 2/3 superiori della superficie della vescicola
- testa a disposizione colonnare
- conidi globosi\subglobosi, lisci, da ialini a giallo pallidi/2-3 micron di diametro)
- clamido spore ialine nella parte vegetativa sommersa dall'ifa



L'antimuffa ATX80 ha reagito meglio con i terreni contenenti gli oli 1 e 5.

Si può notare che:

- con il controllo cresce la muffa bianca;
- a soluzione minima di antimuffa ATX80 0,25% e 0,50% ha prevalenza la muffa verde
- all'1% c'è ancora l'effetto dell' antimuffa ATX80: il terreno appare torbido ma spariscono le muffe verdi completamente
- da 2,5% in poi l' antimuffa ATX80 reagisce con il terreno: spariscono tutte le muffe, il terreno resta torbido fino al 5% e al 10% cambia colore