

Crioconservazione di **ceppi batterici** in **glicerolo**

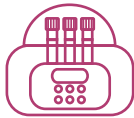
Obiettivo Allestire una coltura batterica per preparare campioni da conservare per tempo indefinito a -80°C .

Autore Assunta Croce, PhD



Materiali e reagenti

- Coltura batterica in piastra
- Anse da inoculazione sterili monouso
- Pennarello indelebile
- Criotubi
- Terreno LB sterile
- Glicerolo 50% sterile
- Puntali sterili
- Tubi da 50 ml sterili (in alternativa beute da 100 ml sterili)



Strumenti

- Termostato
- Cappa a flusso laminare
- Micropipette
- Freezer -80°C



Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Guanti da freddo



Tempo

- 10 minuti per la semina
- 1 notte per la crescita delle colture
- 20 minuti per la preparazione dei campioni da congelare



Procedimento

1. Per crioconservare un ceppo batterico è necessario partire da una coltura liquida ottenuta da colonia singola.
2. Trasferire in un tubo sterile da 50 ml (in alternativa una beuta sterile da 50 ml), 10 ml di terreno LB sterile.
3. Con un'ansa sterile monouso e sotto cappa a flusso laminare, prelevare una colonia singola del ceppo batterico di interesse dalla piastra e stemperarla nel terreno liquido.
4. Incubare nel termostato per una notte a 37°C in agitazione per favorire la crescita dei batteri.
5. Predisporre 4 criotubi per congelamento dei batteri scrivendo il nome del ceppo, la data del congelamento e il numero del campione.
6. Sotto cappa a flusso laminare e con un puntale sterile, trasferire i 0.8 ml di glicerolo 50% sterile in ognuno dei criotubi.
7. Con un puntale sterile pulito, trasferire 1ml di coltura batterica overnight in ognuno dei criotubi.
8. Chiudere i criotubi e mescolare per inversione 5-6 volte, per favorire la diffusione del glicerolo.
9. Congelare in freezer a -80°C o in alternativa a -20°C.

Note

- Questo protocollo sperimentale consente di conservare colture batteriche per lunghi periodi: i campioni preparati in questo modo sono stabili per molti anni a -80°C e per qualche anno a -20°C.
- Per allestire una coltura batterica a partire da un glicerolo, occorre trasferire per il minor tempo possibile il campione da -80°C in ghiaccio, aprire il tubo e con un'ansa sterile monouso (o anche un semplice puntale purché sterile) grattare un po' di coltura batterica congelata e trasferirla in un tubo con terreno fresco. Dal momento che il congelamento-scongelo del campione alla lunga ne compromette la vitalità, si preparano diversi campioni della stessa coltura da conservare a -80°C, così da avere sempre a disposizione materiale di partenza.
- Per la conservazione dei ceppi batterici, la concentrazione ottimale di glicerolo si attesta tra il 15-25%. In questo protocollo sperimentale viene usata una concentrazione di circa 22%.
- Il glicerolo 50% viene preparato diluendo una soluzione di glicerolo 100% 1:1 in acqua deionizzata sterile.
- I criotubi possono essere acquistati da diversi fornitori, a titolo esemplificativo si citano:
 - Freezing vials 2.0 mL, sterile di Sigma, numero di catalogo V9380
 - Fisherbrand™ di Fischer Scientific, codice prodotto 11787939
 - Nalgene® cryogenic vials di Sigma, numero di catalogo V5132