

Semina di batteri per **spatolamento**

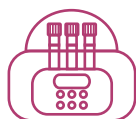
Obiettivo Seminare ceppi batterici in coltura liquida su piastre di LB agar tramite l'uso di un'ansa a L.

Autore Assunta Croce, PhD



Materiali e reagenti

- Piastre di terreno solido
LB agar
- Anse sterili monouso a L
- Pennarello indelebile
- Puntali sterili
- Colture liquide di batteri



Strumenti

- Micropipette
- Termostato
- Cappa biologica a flusso laminare o becco Bunsen



Sicurezza

- Camice
- Guanti



Tempo

20 minuti per la semina
1 notte per la crescita



Procedimento

1. Il punto di partenza di questo protocollo sono le piastre ottenute dal protocollo “Preparazione del terreno LB solido”.
2. Predisporre tante piastre di terreno LB solido quante sono le colture liquide di batteri da seminare. Marcare le piastre con il nome del ceppo batterico, avendo cura di scriverlo sul bordo della piastra.
3. Con un puntale sterile prelevare qualche microlitro della coltura batterica liquida e trasferirla al centro della piastra, facendo attenzione a non toccare con il puntale la superficie dell’agar.
4. Con un’ansa sterile monouso a L spargere la coltura liquida sulla superficie del terreno fino a completo assorbimento.
5. Procedere in questo modo fino al completamento dei ceppi da seminare, avendo cura di cambiare per ogni piastra l’ansa.
6. Incubare le piastre nel termostato a 37°C per una notte (se si tratta di ceppi di *E. coli*) o alla temperatura ottimale di crescita.
7. Conservare i ceppi cresciuti a 4°C.

Note

- Questo protocollo sperimentale viene usato per piastrare i batteri dopo una trasformazione batterica oppure quando si vuole determinare la concentrazione di batteri all’interno di una coltura in esame. In questo caso, occorrerà preparare diluizioni seriali della coltura di interesse, piastrare un volume noto di ciascuna diluizione seriale su ogni piastra e, una volta cresciuti i batteri, contare le colonie presenti su ognuna delle piastre. Tenendo conto del volume piastrato, della diluizione effettuata e del numero di colonie cresciute è possibile calcolare la concentrazione di batteri presenti nella coltura originaria.
- Per impedire la contaminazione microbica, le operazioni vanno effettuate sotto cappa biologica a flusso laminare. In alternativa, è possibile utilizzare un banco da laboratorio, precedentemente pulito con Etanolo 70% e un becco Bunsen (pericolo di incendio!).
- Se il volume della coltura batterica piastrata è consistente (all’incirca di un centinaio di microlitri), serviranno diversi minuti per permettere alla coltura di assorbirsi completamente. Il processo può essere agevolato ponendo le piastre nel termostato a 37°C un paio d’ore prima del loro utilizzo, così da farle asciugare.
- Anche questa metodica consente, in base alla concentrazione di batteri presenti nella coltura di partenza o di una sua opportuna diluizione, di ottenere colonie singole ben distanziate sulla piastra, come mostrato nell’immagine a lato.

