

# Preparazione del terreno

## **Nutrient Broth**

## **liquido**

**Obiettivo** Preparare il terreno Nutrient Broth in forma liquida.

**Autore** Liceo Scientifico Giuseppe Battaglini di Taranto  
Secondo classificato Mad for Science 2019  
Progetto “Phosphorus for Future”



# Materiali e reagenti

- Nutrient Broth in polvere
- Acqua deionizzata
- Spatola
- Navicella da pesata o carta stagnola
- Beuta o becher graduati da 1L
- Cilindro graduato da 500 ml
- Ancoretta magnetica
- Bottiglia da 1L resistente al calore
- Scotch da autoclave
- Pennarello



## Strumenti

- Bilancia
- Autoclave
- Piastra magnetica riscaldante



## Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Guanti per il calore



## Tempo

Circa due ore per la preparazione e la sterilizzazione in autoclave del terreno



# Procedimento

- 1.** Per preparare 1L di terreno Nutrient Broth, pesare con una bilancia 13 g di Nutrient Broth in polvere, aiutandosi con una spatola e una navicella da pesata. Trasferire la polvere in una beuta graduata da 1L.
- 2.** Con un cilindro trasferire circa 500 ml di acqua deionizzata nella beuta e mescolare la soluzione con una ancorotta su piastra magnetica riscaldata (si vedono le note), fino alla completa dissoluzione della polvere.
- 3.** Portare la soluzione a volume di 1L nella beuta, aggiungendo acqua deionizzata fino a raggiungere la tacca indicatrice corrispondente.
- 4.** Trasferire il terreno in una bottiglia da 1L resistente al calore, precedentemente marcata con scotch da autoclave con la dicitura “Nutrient Broth terreno liquido” e la data di preparazione.
- 5.** Sterilizzare il terreno, ponendo la bottiglia in autoclave a 121°C per 15-20 minuti. Assicurarsi che il tappo non sia chiuso ermeticamente.
- 6.** Terminato il processo di sterilizzazione, lasciare raffreddare il terreno. Quando la temperatura è intorno ai 50°C e la bottiglia può essere maneggiata senza scottarsi, procedere sotto cappa biologica alla semina dei microrganismi di interesse. In alternativa, lasciare scendere ulteriormente la temperatura, chiudere il tappo della bottiglia e conservare il terreno a 4°C per un paio di mesi.

## Note

- Il Nutrient Broth è un terreno liquido non selettivo, indicato per la coltivazione e il mantenimento di una vasta gamma di microrganismi poco esigenti.
- La composizione del terreno Nutrient Broth (pH  $6.8 \pm 0.2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ) è la seguente:
  - Estratto di carne 1 g/L
  - Peptone 5 g/L
  - Estratto di lievito 2 g/L
  - Cloruro di sodio 5 g/L
- Il terreno, una volta sterilizzato, assume una colorazione giallo paglierino, che diventa torbido in seguito alla crescita dei microrganismi.
- Verificare sulla confezione di Nutrient Broth acquistata la giusta quantità di polvere da pesare per preparare un litro di terreno. Per questo protocollo è stato utilizzato il terreno Nutrient Broth della ditta produttrice Liofilchem® (codice: 610037).
- La piastra magnetica facilita e velocizza la dissoluzione della polvere. Si consiglia di non utilizzare una temperatura della piastra magnetica troppo elevata (non superare i  $50^{\circ}\text{C}$ ), in quanto il contatto tra la beuta e la piastra eccessivamente riscaldata potrebbe far attaccare la polvere al fondo del contenitore e bruciarla. In assenza di una piastra magnetica, bisognerà mescolare manualmente la soluzione.
- La semina dei microrganismi in terreno liquido si esegue a partire da colonie cresciute in terreno solido: con un'ansa da inoculazione toccare la colonia di interesse cresciuta in piastra e trasferirla nel terreno liquido, eseguendo dei movimenti circolari per favorire il rilascio del materiale biologico in soluzione. Lavorare sotto cappa biologica a flusso laminare o vicino alla fiamma di un becco Bunsen per mantenere la sterilità del terreno e della coltura seminata.