

# Preparazione del terreno **PVK solido**

**Obiettivo** Preparare il terreno PVK (Pikovskaya's Agar) in forma solida per la crescita su piastra di batteri che solubilizzano il fosfato.

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



# Materiali e reagenti

- Pikovskaya's Agar in polvere
- Acqua deionizzata
- Spatola
- Navicella da pesata o carta stagnola
- Becher o beuta graduati da 1L
- Cilindro graduato da 500 ml
- Ancoretta magnetica
- Bottiglia da 1L resistente al calore
- Scotch da autoclave
- Piastre Petri sterili monouso
- Parafilm®
- Pennarello



## Strumenti

- Bilancia
- Autoclave
- Piastra magnetica riscaldante
- Cappa biologica a flusso laminare o becco Bunsen



## Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Guanti per il calore



## Tempo

Circa due ore (compresa la sterilizzazione in autoclave e la solidificazione del terreno nelle piastre Petri)



# Procedimento

- 1.** Per preparare 1L di terreno PVK, pesare con una bilancia 31.3 g di Pikovskaya's Agar in polvere, aiutandosi con una spatola e una navicella da pesata. Trasferire la polvere in una beuta graduata da 1L.
- 2.** Con un cilindro graduato misurare e trasferire circa 500 ml di acqua deionizzata nella beuta e mescolare la soluzione con una ancoretta su piastra magnetica, riscaldata a 70°C, per favorire la dissoluzione della polvere.
- 3.** Portare la soluzione al volume di 1L nella beuta, aggiungendo acqua deionizzata fino a raggiungere la tacca indicatrice corrispondente.
- 4.** Trasferire il terreno PVK in una bottiglia da 1L resistente al calore, precedentemente marcata con scotch da autoclave con la dicitura "PVK terreno solido" 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.** Al termine del processo di sterilizzazione, lasciare raffreddare il terreno. Quando la temperatura è intorno ai 50°C e la bottiglia può essere maneggiata senza scottarsi, colare il terreno nelle piastre Petri.
- 7.** Accendere la cappa biologica a flusso laminare e pulire il piano di lavoro con Etanolo 70%.
- 8.** Sotto cappa biologica, preparare le piastre Petri, marcandole con il nome del terreno e la data, e, dopo aver mescolato bene il terreno, trasferirne 20-25 ml circa nel centro di una piastra Petri, evitando la formazione di bolle. Distribuire il terreno in maniera uniforme. Lo spessore del terreno in piastra deve essere all'incirca di 1 cm.
- 9.** Lasciare raffreddare le piastre sotto cappa con il coperchio semichiuso per permettere la solidificazione completa dell'agar.
- 10.** Quando il terreno sarà completamente solidificato, procedere con la semina dei microrganismi, seguendo il protocollo "Isolamento di batteri PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) da suoli agricoli". In alternativa, chiudere le piastre con il Parafilm® e conservarle a 4°C capovolte e al riparo dalla luce.

## 11. Liberare la cappa biologica dal materiale utilizzato, pulire il piano di lavoro, chiudere il vetro e sterilizzare l'ambiente interno con la luce a raggi UV.

### Note

- Il terreno PVK è il mezzo di crescita necessario per identificare e far crescere i batteri capaci di solubilizzare il fosfato. Quando ciò accade si evidenzia la formazione di un alone trasparente attorno alla colonia batterica.
- La composizione del terreno PVK è la seguente:
  - Estratto di lievito 0.5 g/L
  - Destrosio 10 g/L
  - Fosfato di calcio 5 g/L
  - Solfato di ammonio 0.5 g/L
  - Cloruro di potassio 0.2 g/L
  - Solfato di magnesio 0.1 g/L
  - Solfato di manganese 0.0001 g/L
  - Solfato di ferro (II) 0.0001 g/L
  - Agar 15 g/L
- Verificare sulla confezione di Pikovskaya's Agar acquistata la giusta quantità di polvere da pesare per preparare un litro di terreno. Per questo protocollo è stato utilizzato il terreno PVK della ditta produttrice HiMedia Laboratories (codice: M520).
- Il terreno ha generalmente un colore giallino, che diventa trasparente in presenza di batteri in grado di solubilizzare il fosfato di calcio.
- Si raccomanda l'utilizzo della piastra magnetica per facilitare e velocizzare la dissoluzione delle polveri. Tuttavia, il fosfato di calcio non entra mai completamente in soluzione: su piastra magnetica sembra dissolversi, ma con la sterilizzazione in autoclave si formano dei depositi marroni sul fondo della bottiglia. Al momento di colare il terreno nelle piastre occorre mescolare il terreno per fare in modo che almeno una parte, seppur piccola, di fosfato di calcio dei residui passi in soluzione. Evitare di staccare i depositi marroni dal fondo della bottiglia per non trasferirli nelle piastre. Anche se dovessero rimanere sul fondo della bottiglia, i sedimenti non costituirebbero un problema, poiché il fosfato è in eccesso nella formulazione del terreno e, dunque, sufficiente per identificare i batteri PSB.
- Il terreno PVK e il terreno Sperber, preparato seguendo il protocollo "Preparazione del terreno Sperber solido", sono entrambi utilizzati per riconoscere i batteri PSB, che formano degli aloni trasparenti intorno alle colonie interessate. Ciò che differenzia i due terreni è la composizione e il colore che assumono una volta solidificati: biancastro per il terreno Sperber e giallino per il terreno PVK. Inoltre, il team di docenti di scienze del Liceo Scientifico Giuseppe Battaglini di Taranto ha osservato che l'alone identificativo dei batteri in grado di solubilizzare il fosfato è più evidente in piastre con terreno PVK.
- Questo protocollo può essere realizzato anche in assenza di una cappa biologica a flusso laminare: è sufficiente un banco da laboratorio, precedentemente pulito con Etanolo 70%, e la fiamma di un becco Bunsen (fare attenzione al rischio incendio!), vicino alla quale colare le piastre.
- Per conoscere le buone pratiche da adottare al fine di mantenere la sterilità nel lavorare sotto cappa biologica, leggere le note dedicate nel protocollo "Preparazione del terreno Sperber solido".
- Per mantenere la sterilità delle piastre Petri aprire e chiudere la confezione sotto il flusso della cappa biologica o vicino alla fiamma del becco Bunsen.