

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 sterili
- Terreno liquido LB sterile
- Glicerolo 50% sterile
- Puntali sterili
- Tubi da 50 ml sterili (in alternativa beute da 50 ml sterili)



Strumenti

- Termostato
- Cappa biologica a flusso laminare
- Micropipette
- Freezer -80°C (in alternativa -20°C)



Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Guanti per il 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 una colonia singola cresciuta in piastra.
2. Sotto cappa biologica a flusso laminare, trasferire in un tubo sterile da 50 ml (in alternativa una beuta sterile da 50 ml) 10 ml di terreno liquido LB sterile, preparato secondo il protocollo “Preparazione del terreno LB liquido”.
3. Con un’ansa sterile monouso e sotto cappa a flusso laminare, prelevare dalla piastra una colonia singola del ceppo batterico di interesse e stemperarla nel terreno liquido.
4. Incubare per una notte in termostato a 37°C e in agitazione per favorire la crescita dei batteri.
5. Predisporre 4 criotubi per il congelamento dei batteri, scrivendo il nome del ceppo e la data del congelamento.
6. Sotto cappa biologica e con un puntale sterile, trasferire 0.8 ml di glicerolo 50% sterile in ognuno dei criotubi.
7. Con un puntale sterile pulito, trasferire 1 ml 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:
 - 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).