

Preparare il terreno di coltura per i lieviti con antibiotico

a cura di C. Segré

In determinati esperimenti, ad esempio per identificare l'insorgenza di mutazioni o l'acquisizione di nuovi fenotipi, è necessario utilizzare dei terreni di coltura selettivi. La selezione può avvenire ad esempio eliminando un metabolita, come l'uracile, o aggiungendo un agente selettivo, come un antibiotico. In quest'ultimo caso, l'antibiotico uccide i ceppi di lievito selvatici e permette la crescita solo a quelli che hanno acquisito resistenza a esso. Anche nei laboratori scolastici, almeno in quelli dotati di strumenti come l'autoclave, è possibile preparare questo terreno.

Obiettivo

Preparare un terreno liquido o solido contenente amfotericina B per la crescita dei lieviti in condizioni selettive.

Procedimento

1. Sciogliere 12.5mg di Amfotericina B in polvere in 50ml di acqua sterile deionizzata per ottenere una soluzione madre Amfotericina B 250mg/l. Conservare in frigorifero.
2. Pesare 10g di estratto di lievito, 20g di peptone e 20g di D-glucosio.
3. Mettere l'estratto di lievito in un becher contenente 500ml di acqua deionizzata e mescolare fino a quando la polvere si è sciolta.
4. Aggiungere il peptone e il destrosio e mescolare fino a quando le polveri si sono sciolte.
5. Portare il volume a 980ml aggiungendo acqua deionizzata e trasferire in una bottiglia. Per preparare un terreno liquido procedere seguendo i punti 6 e 7, per un terreno solido dal punto 8.
6. Sterilizzare in autoclave per 10 minuti a 121°C e conservare il terreno liquido così preparato a temperatura ambiente.
7. Lasciare raffreddare il terreno, poi aggiungere 20ml di soluzione di Amfotericina B 250mg/l, per ottenere una concentrazione finale di Amfotericina B 5mg/l. Conservare il terreno in frigorifero.
8. Aggiungere 20g di bacto-agar per ogni litro di terreno.
9. Sterilizzare in autoclave per 10 minuti a 121°C.
10. Lasciare raffreddare il terreno fino a una temperatura di circa 45°C/50°C e aggiungere 20ml di soluzione di Amfotericina B 250mg/l, per ottenere una concentrazione finale di Amfotericina B 5mg/l.
11. Lasciare raffreddare il terreno e versarne circa 25ml in ogni piastra.
12. Quando il terreno si è solidificato, conservare le piastre in frigorifero.

Osservazioni

L'antibiotico va aggiunto al terreno con bacto-agar quando è ancora liquido per garantire una distribuzione uniforme ma a una temperatura non superiore ai 50°C, per evitare la sua degradazione da calore.



Tempo previsto

50 minuti

Materiali e reagenti

- ✓ Estratto di lievito
- ✓ Peptone
- ✓ D-glucosio (destrosio)
- ✓ Bacto-agar
- ✓ Acqua deionizzata
- ✓ Becher
- ✓ Bottiglia
- ✓ Piastre petri
- ✓ Amfotericina B in polvere

Strumentazione

- ✓ Bilancia
- ✓ Autoclave