

Preparazione del terreno **PGA solido**

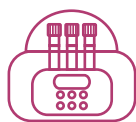
Obiettivo Preparare il terreno PGA (Potato Glucose Agar) in forma solida per la crescita e l'isolamento in piastra di funghi da latticini e prodotti alimentari.

Autore Istituto Augusto Monti di Asti
Primo classificato Mad for Science 2018
Progetto "Funghi - Questi sconosciuti"



Materiali e reagenti

- Potato Glucose Agar in polvere
- Acqua deionizzata
- Spatola
- Navicella da pesata o carta stagnola
- Becher o beuta da 1L
- Cilindro graduato da 1L
- 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 PGA, con una bilancia pesare 39 g di Potato Glucose Agar, aiutandosi con una navicella da pesata, e trasferire la polvere in un becher da 1L.
- 2.** Posizionare il becher sulla piastra magnetica riscaldante (temperatura impostata a 50°C), inserire l'ancoretta e aggiungere lentamente e poco alla volta acqua deionizzata fino a portare la soluzione al volume finale di 1L.
- 3.** Mantenere la soluzione sulla piastra magnetica riscaldante fino al raggiungimento dell'ebollizione.
- 4.** Trasferire il terreno PGA in una bottiglia da 1L resistente al calore, precedentemente marcata con scotch da autoclave con la dicitura "PGA 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.** Terminata la 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, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70% e preparare le piastre Petri, segnando sul coperchio il nome del terreno e la data di preparazione.
- 8.** Sotto cappa biologica mescolare bene la soluzione, colare 20-25 ml circa di terreno PGA nel centro della piastra Petri e 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 dell'agar.

10. Quando il terreno sarà completamente solidificato, procedere con la semina dei funghi seguendo il protocollo “Semina di funghi su piastra”. 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 con Etanolo 70%, chiudere il vetro e sterilizzare l’ambiente interno con la luce a raggi UV.

Note

- Il terreno PGA (pH 5.6 ± 0.2) è costituito da estratto di patate, che fornisce il nutrimento per la crescita della maggior parte dei funghi, glucosio e agar. Si tratta di un terreno generico non differenziale, raccomandato per la crescita di lieviti e di muffe di origine alimentare (*Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium comune*, *Candida albicans*).
- Il terreno PGA diventa limpido solo dopo la sterilizzazione in autoclave.
- 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 un becco Bunsen (attenzione al pericolo incendio!), vicino al quale colare il terreno nelle piastre.
- Nel lavorare sotto cappa biologica, l’operatore deve adottare alcuni accorgimenti funzionali al mantenimento della sterilità: leggere le note del protocollo “Preparazione del terreno MEA solido” per conoscerli.
- 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.