

Preparazione del terreno **MEA solido**

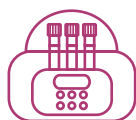
Obiettivo Preparare il terreno MEA (Malt Extract Agar) in forma solida per la crescita e l'isolamento in piastra di funghi da varie fonti.

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



Materiali e reagenti

- Glucosio in polvere
- Estratto di malto in polvere
- Peptone in polvere
- Agar
- Acqua deionizzata
- Spatole
- Navicelle 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 MEA, con una bilancia pesare 20 g di glucosio, 20 g di estratto di malto, 2 g di peptone e 18 g di agar, utilizzando una o più navicelle da pesata. Trasferire le polveri in un becher da 1L.
- 2.** Con un cilindro graduato misurare 1L di acqua deionizzata, leggermente riscaldata.
- 3.** Trasferire circa 500 ml di acqua deionizzata nel becher e mescolare la soluzione con una ancorotta su piastra magnetica riscaldante fino alla completa dissoluzione delle polveri.
- 4.** Portare il volume della soluzione a 1L, aggiungendo l'acqua deionizzata restante.
- 5.** Trasferire il terreno MEA in una bottiglia da 1L resistente al calore, precedentemente marcata con scotch da autoclave con la dicitura "MEA terreno solido" e la data di preparazione.
- 6.** Sterilizzare il terreno, ponendo la bottiglia in autoclave a 121°C per 15-20 minuti. Assicurarsi che il tappo non sia chiuso ermeticamente.
- 7.** 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, è possibile colare il terreno nelle piastre Petri.
- 8.** Accendere la cappa biologica a flusso laminare, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70% e preparare le piastre Petri, marcandole con il nome del terreno e la data.
- 9.** Sotto cappa biologica, colare 20-25 ml circa di terreno MEA 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.
- 10.** Lasciare raffreddare le piastre sotto cappa con il coperchio semichiuso per permettere la solidificazione dell'agar.

- 11.** 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.
- 12.** 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 MEA è un terreno generico impiegato per la crescita e l'isolamento di lieviti e muffe da coltura pura o da diversi materiali di partenza, come gli alimenti. Si tratta di un terreno ricco di carboidrati e con pH acido, caratteristica che impedisce la crescita dei batteri contaminanti.
- 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 (fare attenzione al rischio 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:
 - il piano di lavoro è reso sterile dal flusso dell'aria proveniente dalle griglie: non ostruire il passaggio dell'aria e posizionare il materiale nella porzione centrale del piano;
 - non sovraccaricare il piano di lavoro con troppo materiale;
 - disinfettare con Etanolo 70% tutto il materiale necessario allo svolgimento dell'attività, prima di inserirlo sotto cappa;
 - evitare di mantenere aperte le piastre di coltura, oltre il tempo necessario alla semina e al prelievo del materiale biologico.
- La piastra magnetica riscaldante facilita e velocizza la dissoluzione delle polveri; in sua assenza, bisognerà mescolare manualmente la soluzione.
- 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.