

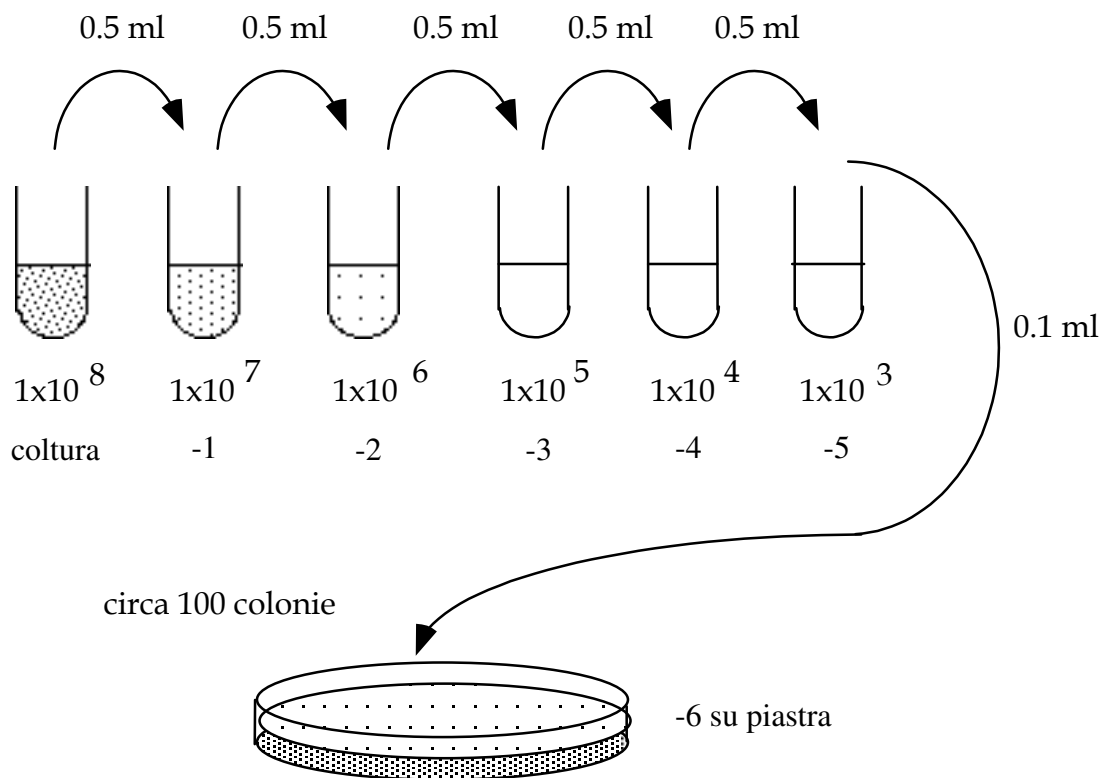
Esercitazione 2

Colorazione di Gram

- 1) Mettere 10 μ l di coltura batterica sul vetrino; con il puntale della pipetta distribuire uniformemente la sospensione batterica.
- 2) FISSAZIONE: far asciugare all'aria e quindi passare rapidamente sulla fiamma del bunsen per 3 volte.
- 3) COLORAZIONE PRIMARIA: al vetrino fissato aggiungere 500 μ l di cristalvioletto **(1)** e lasciar colorare per 1 minuto.
- 4) Rimuovere il cristalvioletto lavando delicatamente con acqua corrente.
- 5) MORDENTE: aggiungere 500 μ l di soluzione di Lugol (Iodio/Ioduro di potassio) **(2)** e lasciarlo sul vetrino per 1 minuto.
- 6) Rimuovere il mordente lavando delicatamente con acqua corrente.
- 7) DECOLORAZIONE: aggiungere 500 μ l di decolorante (isopropanolo/acetone) **(3)** finchè il solvente è incolore (20 secondi)
- 8) Lavare il vetrino delicatamente con acqua corrente
- 9) COLORAZIONE DI CONTRASTO: aggiungere 500 μ l di safranina **(4)** e lasciar colorare per 1 minuto.
- 10) Lavare il vetrino delicatamente con acqua corrente.
- 11) Tamponare con carta bibula o lasciar asciugare all'aria.
- 12) Esaminare al Microscopio con obiettivo ad immersione

Esercitazione 3

Titolazione di una sospensione batterica



- 1) Preparazione delle provette per la diluizione: ad ognuna delle 5 provette aggiungi 4,5 ml di SM (soluzione per la sospensione dei batteri); le provette vanno siglate da -1 a -5.
- 2) Con una pipetta preleva 0,5 ml di coltura batterica e aggiungilo alla provetta -1; mescola bene per ottenere una sospensione batterica omogenea.
- 3) Preleva 0,5 ml dalla provetta -1 e aggiungilo alla provetta -2; mescola bene per ottenere una sospensione batterica omogenea.
- 4) Ripeteri l'operazione fino all'aggiunta di 0,5 ml nella provetta -5.
- 5) Dopo aver risospeso i batteri, preleva 100 μ l dalla provetta -5 e versali su una piastra di **TSA** (terreno completo); con una spatola sterile distribuisce uniformemente la sospensione batterica fino al completo assorbimento del liquido; sigla la piastra con il numero -6 (fattore di diluizione finale)

Esercitazione 3

Titolazione e isolamento su terreni diversi

Sospensione batterica 1:

- a) determinare il titolo mediante piastramento su TSA
- b) isolare su Mac Conkey

Sospensione batterica 2:

- a) isolare su TSA
- b) isolare su TSA + Amp

Esercitazione 4

Curva di crescita di una coltura batterica

Scopo dell'esercitazione è determinare la curva di crescita di *Escherichia coli* K12 alla temperatura di 37°C.

Al tempo zero (T0) una popolazione batterica di circa 1×10^8 batteri/ml è incubata in shaker alla temperatura di 37°C in terreno SB e terreno minimo M9.

Ad intervalli di tempo stabiliti verrà determinata la curva di crescita mediante misura della densità ottica (OD₆₀₀).

I dati ottenuti verranno riportati su foglio con scala semilogaritmica e verrà ricavato il tempo di generazione.

Esercitazione 5

Trasferimento genico orizzontale

Trasformazione batterica

Ceppo batterico utilizzato:

E. coli Δlac

DNA plasmidico:

- I plasmidi **1**, **2** e **3** portano l'operone *lac* ma si differenziano per la presenza di mutazioni nei geni dell'operone. Conferiscono la resistenza all'antibiotico cloramfenicolo (Cm). Concentrazione plasmidi: 5ng/ μ l.

Terreni utilizzati:

- 1) **TSA Cm**: terreno completo addizionato di cloramfenicolo (50 μ g/ml).
- 2) **SOC**: terreno per la risospensione di batteri trasformati.

Protocollo

1. Aggiungi 10 μ l di DNA plasmidico in una provetta contenente 200 μ l di batteri competenti.
2. Tieni in ghiaccio 15 minuti.
3. Trasferisci la provetta a 42 °C per 90 secondi (shock termico).
4. Tieni in ghiaccio per 1 minuto.
5. Aggiungi 800 μ l di SOC.
6. Trasferisci in termostato a 37°C per 30 minuti (espressione della resistenza all'antibiotico).
7. Piastra 0,1 ml su piastra TSA+Cm.

Esercitazione 6

Saggio di β -galattosidasi
(saggio Miller)

Ceppi batterici utilizzati:

- 1) *E. coli* Δlac (p *lac1*) – IPTG
- 2) *E. coli* Δlac (p *lac1*) + IPTG
- 3) *E. coli* Δlac (p *lac2*) – IPTG
- 4) *E. coli* Δlac (p *lac2*) + IPTG
- 5) *E. coli* Δlac (p *lac3*) – IPTG
- 6) *E. coli* Δlac (p *lac3*) + IPTG

Protocollo:

- 1) Da ogni coltura prelevare 300 μ l, trasferire in un tubicino per microcentrifuga.
- 2) Aggiungere 700 μ l di Buffer Z.
- 3) Aggiungere 20 μ l di SDS 0,1%
- 4) Aggiungere 20 μ l di cloroformio (*tossico! evitare di inalare*) e passare su vortex 30 secondi.
- 5) Lasciare il tubicino aperto per far evaporare il cloroformio (circa 10 minuti all'aria aperta).
- 6) Aggiungere 100 μ l di ONPG.
- 7) Attendere circa 5-10 minuti e bloccare la reazione con 300 μ l di Na_2CO_3 1M.