

# Crioconservazione di ceppi di **lievito** in **glicerolo**

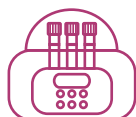
**Obiettivo** Amplificare e congelare colture pure di ceppi di lievito per conservarli a -80°C per tempo indefinito.

**Autore** Istituto Nicola Pellati di Nizza Monferrato (AT)  
Primo classificato Mad for Science 2017  
Progetto “Biodiversità e Uva”



# Materiali e reagenti

- Colture pure di lievito in terreno solido WL (addizionato con Ampicillina e Bifenile)
- Tubi da 15 ml sterili
- Pipette sterili
- Anse da inoculazione sterili e monouso
- Puntali sterili
- Criotubi sterili
- Glicerolo 50% sterile
- Pennarello



## Strumenti

- Cappa biologica a flusso laminare o becco Bunsen
- Pipettatore automatico o manuale
- Micropipette
- Termostato (facoltativo)
- Congelatore -80°C (oppure -20°C)



## Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Guanti per il freddo



## Tempo

- 30 minuti per la semina in terreno liquido
- 48-72 ore per la crescita
- 15 minuti per il congelamento dei lieviti



# Procedimento

- 1.** Preparare il terreno YEPG liquido, seguendo il protocollo “Preparazione del terreno YEPG liquido”.
- 2.** Accendere la cappa biologica a flusso laminare, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70% e preparare tanti tubi da 15 ml sterili quante sono le colture pure di lievito da congelare (colture ottenute seguendo il protocollo “Isolamento in coltura pura di ceppi di lievito” nella sezione “Biologia ambientale”).
- 3.** Con un pennarello numerare in ordine crescente le piastre Petri con le colture pure e marcare i tubi sterili con gli stessi numeri.
- 4.** Trasferire con una pipetta 5-6 ml di terreno YEPG liquido in ogni tubo preparato. Modificare il volume di terreno a seconda di quanti criotubi si vogliono congelare.
- 5.** Con un’ansa da inoculazione sterile trasferire una colonia singola dalla piastra numero 1 al tubo di terreno YEPG corrispondente: inclinare il tubo da 15 ml, inserire l’ansa nel terreno ed eseguire dei movimenti circolari per favorire il rilascio in soluzione del materiale biologico.
- 6.** Ripetere l’operazione per tutti i ceppi di lievito da conservare, avendo cura di cambiare ogni volta l’ansa.
- 7.** Lasciar crescere i lieviti per 48-72 ore in un termostato alla temperatura di 24°C. In mancanza di un termostato, è possibile incubare le provette a temperatura ambiente, considerando che i lieviti cresceranno più lentamente.
- 8.** Al termine del periodo di crescita, predisporre sotto cappa biologica i criotubi sterili, scrivendo la data del congelamento e tutte le informazioni utili per poter risalire al campione congelato a distanza di anni.
- 9.** La soluzione per il congelamento dei lieviti è composta da una miscela 50:50 di glicerolo 50% sterile e di lievito in coltura. Se il criotubo può ospitare un volume finale di 2 ml, per ognuno di essi trasferire 500 µl di glicerolo 50% sterile e successivamente 500 µl di lievito in coltura. Modificare i volumi a seconda della capacità dei criotubi a disposizione. Cambiare puntale tra una

coltura pura e l'altra.

- 10.** Chiudere i criotubi e mescolare per inversione 5-6 volte per favorire la diffusione del glicerolo.
- 11.** Riporre i criotubi in un portaprovette e congelare in freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  o in alternativa a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## Note

- Questo protocollo sperimentale consente di conservare colture di lievito per lunghi periodi: i campioni preparati in questo modo sono stabili per molti anni a  $-80^{\circ}\text{C}$  e per qualche anno a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Il glicerolo 50% sterile viene preparato sotto cappa biologica diluendo 1:1 una soluzione di glicerolo 100% sterile in acqua deionizzata sterile.
- La concentrazione ottimale di glicerolo per la crioconservazione dei lieviti è 25%, valore che viene raggiunto mescolando glicerolo 50% e coltura di lievito in proporzione 1:1.
- Per allestire una coltura di lievito a partire da un campione crioconservato in glicerolo, occorre trasferire per il minor tempo possibile il campione da  $-80^{\circ}\text{C}$  in ghiaccio, aprire il criotubo e con un'ansa sterile monouso (o anche un semplice puntale purché sterile) grattare un po' di coltura congelata e trasferirla in un tubo con terreno YEPG fresco. Riporre il criotubo a  $-80^{\circ}\text{C}$  per evitare lo scongelamento del campione. Dal momento che il congelamento-scongelamento del campione alla lunga ne compromette la vitalità, si preparano diversi campioni della stessa coltura da conservare a  $-80^{\circ}\text{C}$ , così da avere sempre a disposizione materiale di partenza.
- Per impedire la contaminazione microbica, le operazioni vanno effettuate sotto cappa biologica a flusso laminare oppure sul bancone da laboratorio, precedentemente pulito con Etanolo 70%, vicino alla fiamma di un becco Bunsen (attenzione al rischio incendio!).
- Non è sicuro accendere la fiamma del becco Bunsen sotto la cappa biologica, per cui la semina sotto cappa deve essere effettuata esclusivamente con anse sterili e monouso. Se, invece, si effettua la semina sul banco da laboratorio in presenza di un becco Bunsen, è possibile utilizzare anse in acciaio inox. Leggere le note del protocollo "Lavaggio degli acini d'uva e semina su piastra dei lieviti" (sezione: "Biologia ambientale") per conoscere come sterilizzare le anse in acciaio inox prima della semina.
- Per conoscere le buone pratiche da adottare al fine di mantenere la sterilità nel lavorare sotto cappa biologica, leggere le note dedicate nel protocollo "Preparazione del terreno WL solido".