

Conservazione di ceppi di **lievito** su *agar slant*

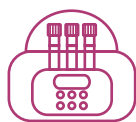
Obiettivo Amplificare e conservare a lungo termine ceppi di lievito, precedentemente isolati in coltura pura, su *agar slant* di terreno solido YEPG.

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



Materiali e reagenti

- Provette di terreno solido YEPG (*agar slant*)
 - Colture pure di lievito in terreno solido WL (addizionato con Ampicillina e Bifenile)
 - Anse da inoculazione sterili e monouso
 - Pennarello
-



Strumenti

- Cappa biologica a flusso laminare o becco Bunsen
- Termostato (facoltativo)
- Frigorifero



Sicurezza

- Camice
 - Guanti
-



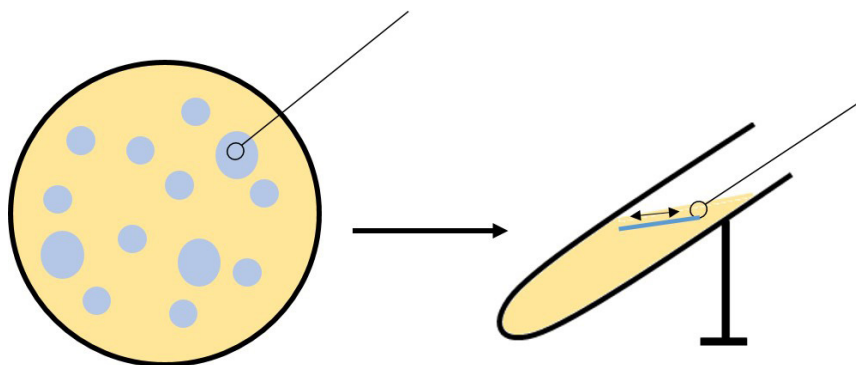
Tempo

30 minuti per la semina in provetta su *agar slant*
48-72 ore per la crescita dei lieviti



Procedimento

- 1.** Accendere la cappa biologica a flusso laminare, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70% e posizionare nella porzione centrale tante provette di terreno YEPG solido, ottenute seguendo il protocollo “Preparazione del terreno YEPG solido”, quanti sono i ceppi di lievito in coltura pura da conservare (predisposti tramite il protocollo “Isolamento in coltura pura di ceppi di lievito” disponibile nella sezione “Biologia ambientale”).
- 2.** Con un pennarello numerare le piastre in ordine crescente e marcare le provette con gli stessi numeri e la data di preparazione.
- 3.** Con un’ansa da inoculazione sterile prelevare una colonia singola dalla piastra numero 1 e trasferirla nella provetta di terreno YEPG corrispondente: inclinare la provetta e seminare la colonia nel centro della superficie del terreno (vedi illustrazione).



- 4.** Ripetere l’operazione descritta nel punto 3 per tutti i ceppi di lievito da conservare, avendo cura di cambiare ogni volta l’ansa.
- 5.** Incubare le provette di terreno 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.
- 6.** Al termine della crescita, conservare i ceppi puri a 4°C. Seguendo questo protocollo i ceppi si conservano per 6-9 mesi e all’occorrenza possono essere amplificati in terreno YEPG (solido o liquido).

7. Al termine della semina 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

- Per congelare ceppi di lievito e averli a disposizione per tempo indefinito seguire il protocollo "Crioconservazione di ceppi di lievito in glicerolo".
- Per amplificare una colonia di lievito conservata in provette di agar slant, preparare piastre Petri di terreno solido YEPG (seguire il protocollo "Preparazione del terreno YEPG solido") oppure tubi di terreno liquido YEPG (seguire il protocollo "Preparazione del terreno YEPG liquido"). Sotto cappa biologica a flusso laminare, con un'ansa da inoculazione sterile prelevare dalla superficie del terreno una colonia e strisciarla sulla piastra Petri oppure inserirla nel terreno liquido e compiere dei movimenti circolari per favorire il rilascio del campione in soluzione.
- 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" nella 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".