

Preparazione del terreno **YEPG liquido**

Obiettivo Preparare il terreno YEPG (Yeast Extract Peptone Glucose) in forma liquida per la crescita dei lieviti, in particolare *Saccharomyces cerevisiae*.

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



Materiali e reagenti

- Estratto di lievito in polvere
- Peptone in polvere
- D-glucosio in polvere
- Acqua deionizzata
- Spatole
- Navicelle da pesata o carta stagnola
- Becher o beuta graduati da 1L
- Cilindro graduato da 500 ml
- Contagocce (eventuale)
- NaOH 0.4M (eventuale)
- Ancoretta magnetica
- Bottiglia da 1L resistente al calore
- Scotch da autoclave
- Pennarello



Strumenti

- Bilancia
- Autoclave
- Piastra magnetica riscaldante
- pHmetro



Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Guanti per il calore



Tempo

Circa un'ora (compresa la sterilizzazione in autoclave del terreno)



Procedimento

- 1.** Per preparare 1L di terreno YEPG, con una bilancia pesare 10 g di estratto di lievito, 10 g di peptone e 20 g di D-glucosio, utilizzando una o più navicelle da pesata. Trasferire le polveri in un becher graduato da 1L.
- 2.** Con un cilindro trasferire circa 500 ml di acqua deionizzata nel becher e mescolare la soluzione con una ancorotta su piastra magnetica, riscaldata a 70°C, fino alla completa dissoluzione delle polveri.
- 3.** Portare la soluzione a volume di 1L nel becher, aggiungendo acqua deionizzata fino a raggiungere la tacca indicatrice corrispondente.
- 4.** Controllare che il pH del terreno abbia un valore di 5.5 ± 0.2 a 25°C. Eventualmente, aggiustare il pH aggiungendo una soluzione di NaOH 0.4M con un contagocce.
- 5.** Trasferire il terreno YEPG in una bottiglia da 1L resistente al calore, precedentemente marcata con scotch da autoclave con la dicitura “YEPG terreno liquido” 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.** Terminata la sterilizzazione, lasciare raffreddare il terreno. Quando la temperatura è intorno ai 50°C e la bottiglia può essere maneggiata senza scottarsi, procede sotto cappa biologica alla semina dei lieviti. In alternativa, lasciare scendere ulteriormente la temperatura, chiudere il tappo e conservare il terreno a 4°C per un paio di mesi.

Note

- Il terreno YEPG, anche abbreviato come YPD (Yeast Peptone Destrose), è un terreno di coltura non selettivo e completo per la crescita e l'isolamento della maggior parte delle specie di lieviti, tra cui *Saccharomyces cerevisiae*.
- Il terreno è costituito da estratto di lievito (10 g/L), glucosio (20 g/L) e peptone (10 g/L) e assume dopo la sterilizzazione una tipica colorazione marrone-dorata, che ricorda molto quella del miele di castagno.
- Il terreno fornisce una fonte di carbonio (D-glucosio), un mix di amminoacidi (peptone ed estratto di lievito) e precursori molecolari per soddisfare le necessità di crescita di un organismo eterotrofo come il lievito, che altrimenti dovrebbe attivare le proprie vie metaboliche consumando tempo ed energia.
- Per impedire la contaminazione batterica del terreno, è possibile aggiungere 100 mg di Ampicillina sterile in polvere (concentrazione finale: 100 mg/L), quando il terreno avrà raggiunto la temperatura di 50°C dopo la sterilizzazione in autoclave. In questo caso è importante mantenere la sterilità dell'antibiotico e del terreno preparato, lavorando sotto cappa biologica. In assenza di Ampicillina sterile, risospendere la polvere in acqua deionizzata secondo le indicazioni della ditta produttrice e sterilizzare la soluzione sotto cappa biologica tramite filtrazione (con filtro a 0,22 µm).
- Se si decide di non aggiungere l'antibiotico, prima di utilizzare il terreno verificare che non sia inquinato dalla crescita di batteri, agitando il terreno e osservando la bottiglia in trasparenza: il terreno deve risultare limpido.
- La semina di lieviti in terreno liquido si esegue a partire da colonie di lievito cresciute in terreno solido: con un'ansa da inoculazione toccare la colonia di interesse cresciuta in piastra e trasferirla nel terreno liquido, eseguendo dei movimenti circolari per favorire il rilascio del materiale biologico in soluzione. Lavorare sotto cappa biologica a flusso laminare o vicino alla fiamma di un becco Bunsen per mantenere la sterilità del terreno e della coltura seminata.
- La piastra magnetica facilita e velocizza la dissoluzione delle polveri; in sua mancanza, bisognerà mescolare manualmente la soluzione.