

Preparazione del terreno **YEPG solido**

Obiettivo Preparare il terreno YEPG (Yeast Extract Peptone Glucose) in forma solida per la crescita e la conservazione dei lieviti.

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
- Agar 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
- Piastre Petri sterili monouso
- Provette sterili da 15 ml con tappo
- Pipette sterili
- Parafilm®
- Pennarello



Strumenti

- Bilancia
- Piastra magnetica riscaldante
- pHmetro
- Autoclave
- Cappa biologica a flusso laminare o becco Bunsen
- Pipettatore automatico o manuale



Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Guanti per il calore



Tempo

Circa due ore (compresa la sterilizzazione in autoclave e la solidificazione del terreno)



Procedimento

Il protocollo sottostante descrive la preparazione del terreno YEPG e la sua solidificazione con due metodi, in piastra Petri e in provetta con formazione di *agar slant*. La solidificazione in piastra Petri è funzionale alla semina e alla crescita dei lieviti per successivi utilizzi, come l'analisi macroscopica e microscopica dei microrganismi o l'estrazione e l'amplificazione del DNA dei lieviti. La solidificazione in provetta, invece, è da preferire per la conservazione nel lungo periodo di ceppi di lievito, precedentemente isolati in coltura pura.

- 1.** Per preparare 1L di terreno YEPG, con una bilancia pesare 10 g di estratto di lievito, 10 g di peptone, 20 g di D-glucosio e 20 g di agar, 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 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.** Terminata la sterilizzazione, lasciare raffreddare il terreno fino a raggiungere una temperatura tale per cui la bottiglia possa essere maneggiata senza scottarsi (circa 50°C).
- 8.** Accendere la cappa biologica a flusso laminare, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70% e preparare, a seconda della necessità, le piastre Petri o le

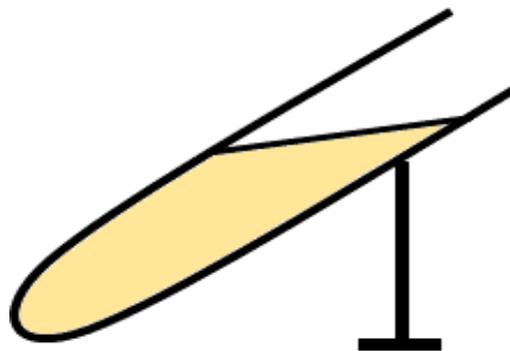
provette, marcandole con il nome del terreno e la data.

9. Solidificazione del terreno in piastra Petri:

- sotto cappa biologica, colare 20-25 ml circa di terreno YEPG 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;
- lasciare raffreddare le piastre sotto cappa con il coperchio semichiuso per permettere la solidificazione dell'agar;
- quando il terreno sarà completamente solidificato, procedere con la semina dei lieviti. In alternativa, chiudere le piastre con il Parafilm® e conservarle a 4°C capovolte e al riparo dalla luce (si conservano per un paio di mesi).

Solidificazione del terreno in provetta con formazione di *agar slant*:

- sotto cappa biologica, trasferire con una pipetta sterile circa 5 ml di terreno in ogni provetta e chiudere il tappo;
- lasciare raffreddare il terreno, tenendo le provette inclinate (45°) su un supporto (vedi immagine). In questo modo il terreno nella porzione più superficiale occuperà orizzontalmente la provetta offrendo una maggiore superficie di crescita alla colonia e agevolando il successivo prelievo da parte dell'operatore;
- gli *agar slant* così preparati possono essere utilizzati subito, procedendo alla semina dei lieviti secondo il protocollo "Conservazione dei ceppi di lievito su *agar slant*" oppure mantenuti a 4°C per alcune settimane.



- 10.** 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 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, in particolare *Saccharomyces cerevisiae*. Il terreno è costituito da:
 - Estratto di lievito 10 g/L
 - Glucosio 20 g/L
 - Peptone 10 g/L
 - Agar 20 g/L
- 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.
- Per impedire la contaminazione microbica, le operazioni di trasferimento del terreno sterile nelle piastre Petri e nelle provette vanno effettuate sotto cappa biologica a flusso laminare oppure sul bancone da laboratorio, precedentemente pulito con Etanolo 70%, accanto alla fiamma di un becco Bunsen (fare attenzione al rischio incendio!).
- Un ulteriore modo per ridurre la contaminazione batterica del terreno prevede l'aggiunta di 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).
- Il terreno YEPG solidificato in piastra Petri può essere utilizzato per la semina e la crescita del lievito granulare per la panificazione, facilmente reperibile al supermercato. Sciogliere pochi granuli di lievito in acqua sterile ed eseguire delle diluizioni seriali con fattore di diluizione pari a 10 (la soluzione madre sarà concentrata 10 volte in più rispetto alla "diluizione 1", 100 volte in più rispetto alla "diluizione 2", 1000 volte in più rispetto alla "diluizione 3" e così avanti). Seminare le soluzioni meno concentrate per favorire la crescita del lievito in colonie singole.
- La piastra magnetica facilita e velocizza la dissoluzione delle polveri; in sua mancanza, bisognerà mescolare manualmente la soluzione.
- 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".
- Per mantenere la sterilità delle piastre Petri e delle provette aprire e chiudere la confezione e il tappo sotto il flusso della cappa biologica o vicino alla fiamma del becco Bunsen.