

## Preparazione di una coltura di lieviti

a cura di V. Soglio

*I lieviti sono eucarioti unicellulari la cui temperatura di crescita ottimale è attorno ai 28-30°C. Essi sono impiegati in svariati ambiti: nell'industria alimentare, e, su scala minore, in cucina, vengono usati per la produzione di vino e birra e per la lievitazione di prodotti da forno, sfruttando la loro capacità di fare fermentazione. Il lievito è stato introdotto come organismo modello nella ricerca scientifica a partire dagli anni '30 del XX secolo e a oggi è un utilissimo strumento per lo studio del ciclo cellulare e dei meccanismi di controllo della replicazione del DNA. In questo protocollo si illustra come è possibile preparare una coltura a partire da ceppi di lievito facilmente reperibili.*

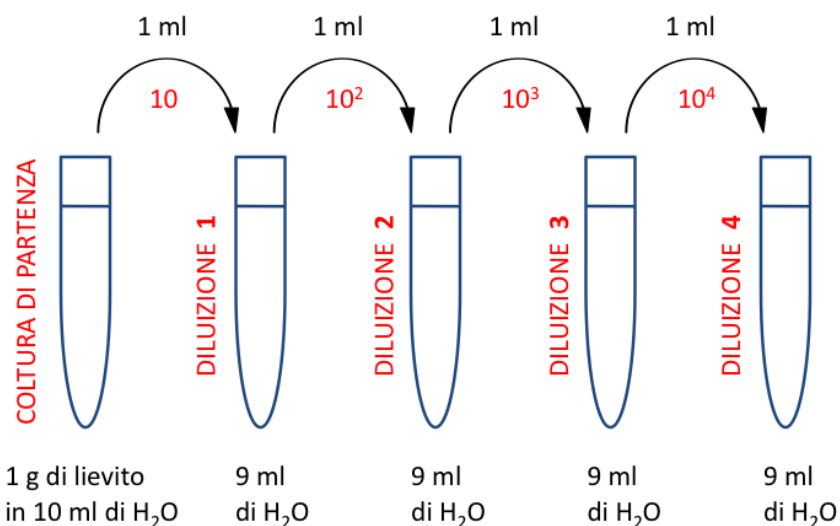
### Obiettivo

Allestire una coltura di lieviti.

### Procedimento

#### Preparazione di una coltura a partire da lievito in polvere

- Pesare 1 g di lievito in polvere e scioglierlo in 10 ml di acqua del rubinetto o di terreno liquido YPD (vedi protocollo 'Preparare il terreno di coltura per i lieviti').
- Preparare una diluizione seriale con fattore di diluizione pari a 10 come riportato nello schema. La coltura di partenza risulta più concentrata di 10 volte rispetto alle 'diluizione 1', di 100 volte ( $10^2$ ) rispetto alla 'diluizione 2', di 1000 volte ( $10^3$ ) rispetto alla 'diluizione 3' e di 10000 ( $10^4$ ) volte rispetto alla 'diluizione 4'.



- Usando un'ansa a L, piastrare una goccia della diluizione 3 o della diluizione 4 su una piastra con terreno solido YPD (vedi protocollo 'Preparare il terreno di coltura per i lieviti').
- Porre la piastra a 30°C per una notte o a temperatura ambiente per due giorni o fino a quando le singole colonie diventano visibili.



### Tempo previsto

30 minuti

### Materiali e reagenti

- ✓ Bustina di lievito in polvere (acquistabile al supermercato)
- ✓ Acqua del rubinetto
- ✓ Terreno liquido YPD
- ✓ Piastre con terreno solido YPD
- ✓ Anse a L (sterili)
- ✓ Piastra con colonie di lievito
- ✓ Stuzzicadenti (sterili)
- ✓ Provette da 15 ml
- ✓ Pipette Pasteur (sterili)
- ✓ Pipette graduate

### Strumentazione

- ✓ Bilancia
- ✓ Autoclave (facoltativo)

### Preparazione di una coltura a partire da colonie di lievito su piastra

- Toccare con uno stuzzicadente una singola colonia e immergerlo in una provetta contenente 10 ml di terreno liquido YPD.
- Porre la provetta a 30°C per una notte o a temperatura ambiente per due giorni e osservare la crescita delle cellule notando l'aumento della torbidità della coltura.

### Osservazioni

- La scelta di sciogliere il lievito in acqua del rubinetto o nel terreno liquido YPD dipende dal tipo di esperimento che si vuole successivamente realizzare: per un'osservazione al microscopio o una conta delle cellule è sufficiente usare l'acqua, per attività più complesse è opportuno usare il terreno di coltura. Quest'ultimo contiene sostanze, *in primis* una fonte di carbonio, per consentire una più lunga sopravvivenza dei lieviti, inoltre è sterile e consente di evitare o limitare la crescita di altri microrganismi indesiderati.
- Se si vogliono limitare le contaminazioni è opportuno lavorare nelle condizioni più sterili possibili, a tal fine occorre autoclavare gli stuzzicadenti e usare provette e anse a L sterili.