

# Isolamento in **coltura pura** di ceppi di **lievito**

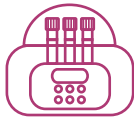
**Obiettivo** Identificare, isolare e amplificare in coltura pura i ceppi di lievito cresciuti in piastra su terreno solido WL, al fine di studiarne le principali caratteristiche macroscopiche e microscopiche e compiere ulteriori analisi.

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



# Materiali e reagenti

- Colture di lievito in terreno solido WL (addizionato con Ampicillina e Bifenile)
  - Piastre Petri di terreno solido WL con Ampicillina e Bifenile
  - Anse da inoculazione sterili e monouso
  - Pennarello
- 



## Strumenti

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



## Sicurezza

- Camice
  - Guanti
- 



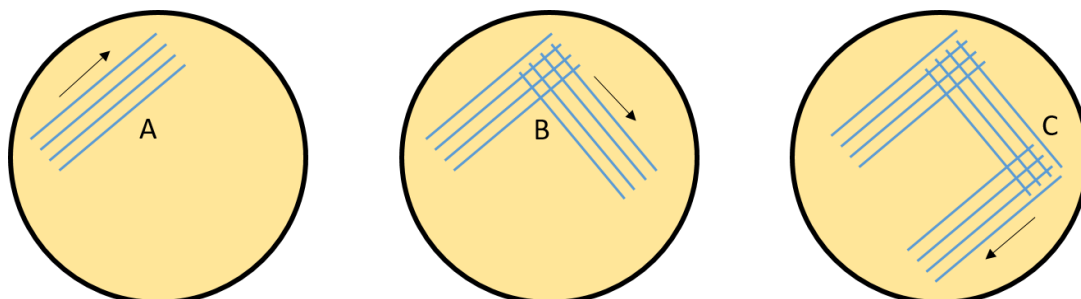
## Tempo

Circa un'ora per la propagazione su piastra  
48-72 ore per la crescita dei lieviti in coltura pura



# Procedimento

- 1.** Le colture di lievito, cresciute in terreno solido WL (addizionato con Ampicillina e Bifenile) dalle acque di lavaggio degli acini d'uva e ottenute seguendo il protocollo "Lavaggio degli acini d'uva e semina su piastra dei lieviti", rappresentano il punto di partenza di questo protocollo.
- 2.** Con l'aiuto di uno stereomicroscopio, osservare le principali caratteristiche macroscopiche (morfologia, colore, superficie, margini) delle colonie di lievito cresciute in piastra, con l'obiettivo di identificare colonie fenotipicamente diverse.
- 3.** Con un pennarello indelebile, cerchiare sul retro della piastra le colonie con diversa morfologia e numerarle in ordine crescente.
- 4.** Accendere la cappa biologica a flusso laminare e pulire il piano di lavoro con Etanolo 70%. Predisporre tante piastre Petri di terreno solido WL, preparate secondo il protocollo "Preparazione del terreno solido WL" (sezione: "Microbiologia") con l'aggiunta di Ampicillina e Bifenile, quante sono le colonie da isolare identificate come diverse.
- 5.** Segnare su ogni piastra il numero corrispondente alla colonia da isolare, la data di semina e il vigneto di campionamento iniziale.
- 6.** Con un'ansa da inoculazione sterile, toccare la colonia identificata con il numero 1 e strisciarla sulla piastra numero 1, come mostrato nella parte A dell'immagine. Spargere la colonia in tutta la superficie della piastra, compiendo il movimento descritto nella parte B e C dell'immagine sottostante al fine di ottenere, una volta cresciute, delle colonie singole.



7. Procedere in questo modo per tutte le colonie con morfologia diversa, avendo cura di cambiare ogni volta l'ansa da inoculazione monouso.
8. 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.
9. Incubare le piastre per 48-72 ore in un termostato con temperatura impostata a 24°C. In mancanza di un termostato, è possibile incubare le piastre a temperatura ambiente, considerando che i lieviti cresceranno più lentamente.
10. Al termine del periodo di crescita, procedere con l'analisi macroscopica e microscopica dei lieviti isolati in coltura pura, seguendo il protocollo "Allestimento di vetrini per l'osservazione microscopica dei lieviti" (sezione: "Microscopia e istologia") oppure compiere successive analisi come l'estrazione di DNA genomico (protocollo "Estrazione di DNA genomico da lievito" nella sezione "Biologia molecolare").

## Note

- In assenza di uno stereomicroscopio, è possibile aiutarsi nell'analisi macroscopica (pre e post isolamento in coltura pura) con la fotocamera di uno smartphone. In questo caso avvicinare la telecamera del cellulare al coperchio della piastra di coltura, senza aprirla, e scattare una foto della colonia di interesse. Osservare la morfologia, i margini, la superficie, il colore della colonia e tutto ciò che attira la vostra attenzione. Confrontare anche colonie diverse e provare a rintracciare sul web o su testi in dotazione il genere del lievito osservato.
- Nel caso in cui la precedente semina dei lieviti su terreno solido WL (addizionato con Ampicillina e Bifenile) sia stata compiuta con lievito granulare per la panificazione (vedi note del protocollo "Lavaggio degli acini d'uva e semina su piastra dei lieviti") non è necessario procedere all'isolamento in coltura pura.
- La semina per striscio su piastra permette di ottenere colonie di lievito singole, in quanto i movimenti descritti nel punto 4 del protocollo hanno l'obiettivo di diluire la quantità di microrganismi trasportati dall'ansa.
- È possibile conservare le colture pure di lievito in piastra a 4°C per un paio di settimane. Rivestire i bordi delle piastre con il Parafilm®.
- 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%, in presenza della 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.
- Per conoscere le buone pratiche da adottare al fine di mantenere la sterilità nel lavorare sotto cappa biologica, fare riferimento alle note dedicate nel protocollo "Preparazione del terreno WL solido" nella sezione "Microbiologia".