

Lavaggio degli acini d'uva e **semina** su piastra dei **lieviti**

Obiettivo Isolare dai grappoli d'uva i lieviti che crescono sulla buccia degli acini e seminarli su piastre di terreno solido WL per 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

- Grappoli d'uva da coltivazione biologica e tradizionale
- Soluzione fisiologica sterile (NaCl 0.9%)
- Cilindri sterili
- Beute sterili da 500 ml
- Tubi da 15 ml sterili
- Pipette sterili
- Puntali sterili
- Piastre Petri di terreno solido WL (addizionato con Ampicillina e Bifenile)
- Anse a L sterili monouso
- Parafilm®
- Pennarello



Strumenti

- Cappa biologica a flusso laminare o becco Bunsen
- Pinzette sterili
- Agitatore basculante
- Micropipette
- Pipettatore manuale o automatico
- Vortex (facoltativo)
- Termostato (facoltativo)



Sicurezza

- Camice
- Guanti



Tempo

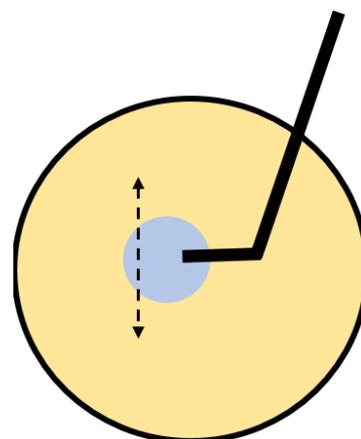
Circa un'ora e mezza per le diluizioni e la semina su piastra
48-72 ore per la crescita dei lieviti



Procedimento

- 1.** Raccogliere i grappoli d'uva da coltivazione biologica e tradizionale, seguendo il protocollo "Campionamento di grappoli d'uva".
- 2.** Accendere la cappa biologica a flusso laminare, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70% e posizionare nella porzione centrale tutto il materiale necessario.
- 3.** Sotto cappa biologica, misurare con un cilindro sterile e trasferire 100 ml di soluzione fisiologica sterile in quattro beute sterili da 500 ml, etichettate ognuna con il nome dei quattro vigneti campionati.
- 4.** Da ognuno dei nove grappoli d'uva raccolti in uno stesso vigneto, come indicato nel protocollo "Campionamento di grappoli d'uva", prelevare con le pinzette sterili 3 acini d'uva da punti diversi del grappolo (in alto, al centro, in basso). Complessivamente, saranno prelevati 27 acini d'uva dai grappoli di ogni vigneto.
- 5.** Porre tutti i 27 acini d'uva in un'unica beuta. Adattare il volume di soluzione fisiologica nella beuta in modo tale che gli acini siano ben immersi nella soluzione e chiudere la beuta con Parafilm®.
- 6.** Ripetere i punti 4 e 5 per tutti i grappoli dei vigneti campionati.
- 7.** Lasciare le quattro beute su agitatore basculante per 30 minuti (temperatura impostata a 24°C) per permettere alla soluzione fisiologica di rimuovere i microrganismi dalle bucce degli acini.
- 8.** Per ogni vigneto campionato preparare quattro tubi sterili da 15 ml, che serviranno per allestire le diluizioni seriali. Numerare i tubi in modo progressivo (1, 2, 3 e 4) e indicare il nome del vigneto corrispondente.
- 9.** Con una pipetta trasferire 4.5 ml di soluzione fisiologica sterile nei tubi 2, 3 e 4.
- 10.** Nel tubo 1, trasferire con un puntale sterile 1 ml di acqua di lavaggio (soluzione fisiologica e microrganismi disciolti). Questa sarà la soluzione madre.

11. Nel tubo 2, trasferire 0.5 ml della soluzione madre del tubo 1. Chiudere il tappo e agitare per inversione qualche volta oppure mescolare con un vortex. La soluzione madre è stata così diluita 1:10 nel tubo 2.
12. Nel tubo 3, trasferire 0.5 ml di soluzione presente nel tubo 2. Chiudere il tappo e agitare per inversione qualche volta oppure mescolare con un vortex. Si è così ottenuta una soluzione diluita 100 volte rispetto alla soluzione madre.
13. Nel tubo 4, trasferire 0.5 ml di soluzione presente nel tubo 3. Chiudere il tappo e agitare per inversione qualche volta oppure mescolare con un vortex. Si è così ottenuta una soluzione diluita 1000 volte rispetto alla soluzione madre.
14. Procurarsi quattro piastre Petri di terreno solido WL, preparato secondo il protocollo “Preparazione del terreno WL solido” (sezione: “Microbiologia”) con l’aggiunta di Ampicillina e Bifenile. Numerare le piastre in modo progressivo da 1 a 4 e segnare la diluizione che sarà piastrata, la data di semina e il nome del vigneto di provenienza.
15. Trasferire con un puntale sterile 100 µl di acqua di lavaggio dal tubo 1 alla piastra 1 in posizione centrale e distribuire il liquido uniformemente utilizzando un’ansa a L sterile (vedi immagine).
16. Procedere piastrando le diluizioni successive: trasferire 100 µl di liquido dal tubo 2 alla piastra 2, dal tubo 3 alla piastra 3 e, infine, dal tubo 4 alla piastra 4. Dopo ogni trasferimento, distribuire il liquido con un’ansa a L sterile. Cambiare ansa ad ogni piastra.
17. Ripetere i passaggi dal punto 8 al punto 16 per isolare i lieviti dagli acini d’uva degli altri vigneti campionati.
18. 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.
19. 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 (la crescita dei lieviti sarà più lenta).
20. Al termine della crescita, isolare in coltura pura i ceppi di lievito amplificati, secondo il protocollo “Isolamento in coltura pura di ceppi di lievito” oppure



conservare le piastre a 4°C per un paio di settimane, rivestendo i bordi della piastra con il Parafilm®.

Note

- Questo protocollo può anche essere utilizzato per ottenere piastre di lievito, partendo dal comune lievito granulare per la panificazione, facilmente acquistabile al supermercato. Basta sciogliere pochi granuli di lievito in acqua sterile, eseguire alcune diluizioni seriali come quelle descritte in questo protocollo e procedere alla semina delle soluzioni meno concentrate.
- La soluzione fisiologica si prepara sciogliendo 45 g di NaCl in 500 ml di acqua deionizzata. La soluzione poi viene sterilizzata per filtrazione (tramite filtro a 0.22 µm) o in autoclave (121°C per 15-20 minuti). Adattare il volume di soluzione fisiologica da preparare in funzione delle esigenze di lavoro. Una volta pronta, la soluzione si conserva a 4°C. Agitare prima dell'uso.
- Il terreno di crescita WL addizionato con Ampicillina e Bifenile consente la crescita di tutte le specie di lievito presenti nelle acque di lavaggio (altre informazioni sul terreno WL sono riportate nel protocollo "Preparazione del terreno WL solido", sezione "Microbiologia").
- Per impedire la contaminazione microbica, le operazioni vanno effettuate sotto cappa biologica a flusso laminare oppure sul banco da laboratorio, precedentemente pulito con Etanolo 70%, vicino alla fiamma di un becco Bunsen (attenzione al rischio incendio!). Inoltre, è importante che tutti i materiali utilizzati per eseguire questo protocollo sperimentale siano sterili o monouso, dalle beute ai puntali, dai tubi alle anse a L.
- 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 a L sterili monouso.
- Per ridurre il numero delle anse a L monouso utilizzate, è possibile piastrare le acque di lavaggio di uno stesso vigneto partendo da quelle più diluite (tubo 4) a quelle meno diluite (tubo 1). Così facendo si limita il consumo di materiale, evitando allo stesso tempo di contaminare i campioni poiché si procede dal campione più diluito a quello più concentrato.
- Se, invece, si effettua la semina sul banco da laboratorio in presenza di un becco Bunsen, è possibile utilizzare anse in acciaio inox. In questo caso, prima di procedere alla semina:
 - sterilizzare l'ansa a L sulla fiamma del becco Bunsen e farla raffreddare all'aria;
 - trasferire e distribuire uniformemente il liquido di lavaggio;
 - ripetere i punti precedenti per ogni nuova diluizione da seminare.
- Nel lavorare sotto cappa biologica, l'operatore deve adottare alcuni accorgimenti funzionali al mantenimento della sterilità:
 - il piano di lavoro è reso sterile dal flusso dell'aria proveniente dalle griglie: non ostruire il passaggio dell'aria e posizionare il materiale nella porzione centrale del piano;
 - non sovraccaricare il piano di lavoro con troppo materiale;
 - disinfettare con Etanolo 70% tutto il materiale necessario allo svolgimento dell'attività, prima di inserirlo sotto cappa;
 - evitare di mantenere aperte le piastre di coltura, oltre il tempo necessario alla semina del materiale biologico.