

Allestimento di vetrini per l'**osservazione** **microscopica** dei **lieviti**

Obiettivo Allestire vetrini per osservare al microscopio ottico le caratteristiche microscopiche dei lieviti, cresciuti su terreno solido WL dopo isolamento dalla buccia degli acini d'uva.

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



Materiali e reagenti

- Colture pure di lievito in terreno solido WL (addizionato con Ampicillina e Bifenile)
- Acqua deionizzata
- Puntali sterili
- Vetrini porta oggetto
- Vetrini copri oggetto
- Carta assorbente
- Pennarello



Strumenti

- Cappa biologica a flusso laminare o becco Bunsen
- Micropipette
- Microscopio ottico (eventualmente con fotocamera integrata)



Sicurezza

- Camice
- Guanti



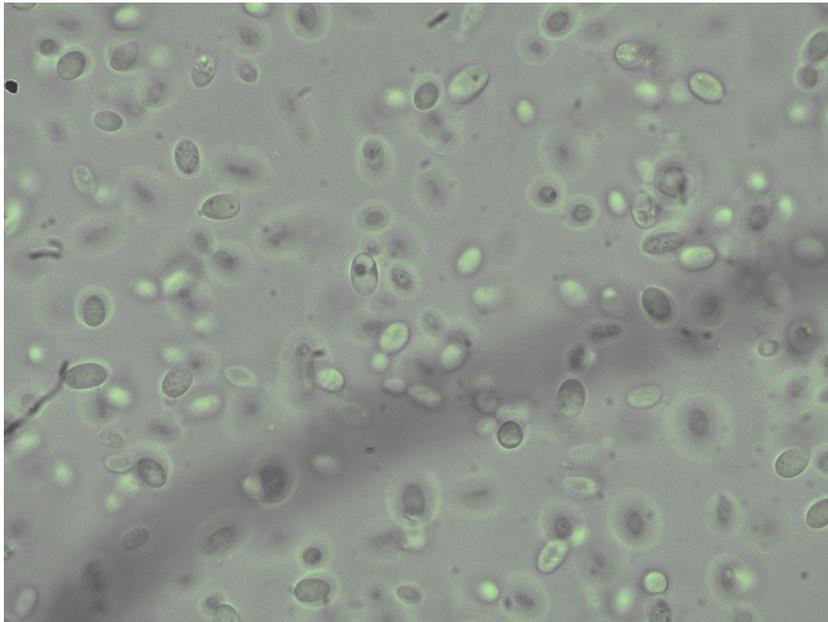
Tempo

15 minuti per la preparazione del vetrino
30 minuti per l'osservazione al microscopio ottico



Procedimento

- 1.** Accendere la cappa biologica a flusso laminare, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70% e posizionare nella porzione centrale tutto il materiale necessario, come riportato in “Materiali e reagenti”.
- 2.** Sotto cappa biologica, trasferire con una micropipetta una goccia di acqua deionizzata sul vetrino porta oggetto (una goccia corrisponde a circa 25 μ l).
- 3.** Con la punta di un puntale sterile, agganciato ad una micropipetta, raschiare delicatamente una colonia di lievito dalla piastra, ottenuta seguendo i protocolli “Lavaggio degli acini d’uva e semina su piastra dei lieviti” e “Isolamento in coltura pura di ceppi di lievito” nella sezione “Biologia ambientale”.
- 4.** Stemperare il campione di lievito nella goccia d’acqua ed eliminare il puntale.
- 5.** Porre il vetrino copri oggetto sul vetrino porta oggetto e premere leggermente per eliminare le bolle d’aria. Asciugare con carta assorbente eventuali liquidi in eccesso fuoriusciti.
- 6.** Ripetere le operazioni sopra descritte per tutti i vetrini che si vogliono allestire.
- 7.** 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.
- 8.** Osservare il preparato al microscopio ottico, passando dagli obiettivi a minore ingrandimento a quelli a maggiore ingrandimento.



Lieviti osservati al microscopio ottico all'ingrandimento 40X.

Note

- Se non si hanno a disposizione colture di lievito in piastra è possibile utilizzare il lievito per la panificazione, facilmente reperibile al supermercato. Basta sciogliere pochi granuli di lievito granulare in acqua sterile, trasferire una goccia del preparato sul vetrino porta oggetto, coprire con il vetrino copri oggetto e osservare il preparato. Nel caso il campione risultasse molto concentrato, procedere con un paio di diluizioni in acqua (fino a 1:100), prima di trasferire la goccia sul vetrino.
- Quanto è grande una cellula di lievito? Dipende dal tipo di lievito che stiamo osservando. *Saccharomyces cerevisiae*, il lievito comunemente utilizzato per la panificazione, ha forma ovoidale-tondeggianti da 5 a 30 μm in lunghezza e 1-5 μm di larghezza. Se si preparano vetrini a partire da colonie di lievito isolate dalle acque di lavaggio degli acini d'uva, ci possiamo imbattere in diverse specie come ad esempio: *Schizosaccharomyces pombe* (diametro di circa 3-4 μm e lunghezza di circa 7-14 μm), *Metschnikowia pulcherrima* (forma globosa-ellittica molto simile per dimensioni a *S. cerevisiae*) o *Saccharomycodes ludwigii*.
- Se non si possiedono micropipette e puntali sterili, è possibile utilizzare delle pipette Pasteur in plastica monouso per prelevare e depositare la goccia d'acqua sul vetrino porta oggetto e degli stuzzicadenti sterili per il trasferimento del campione di lievito.
- Alternativamente al protocollo sopra descritto, è possibile allestire vetrini anche utilizzando anse sterili monouso: raschiare con un'ansa la colonia di lievito di interesse, inserirla in una provetta contenente acqua deionizzata (1 ml) ed eseguire dei movimenti circolari vigorosi per favorire il rilascio in soluzione dei microrganismi. Prelevare una goccia di acqua e cellule e depositarla sul vetrino porta oggetto. Sostituire l'ansa per ogni nuova colonia da prelevare.
- Per impedire la contaminazione microbica, le operazioni vanno effettuate sotto cappa biologica a flusso laminare. In alternativa è possibile utilizzare un banco da laboratorio, precedentemente pulito con Etanolo 70%, e un becco Bunsen (fare attenzione al rischio incendio!), vicino al quale allestire i vetrini.
- 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" nella sezione "Microbiologia".

Risorse online

- Immagini di lieviti al microscopio con riferimento alla specie (credit: CREA - Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria)
http://20.61.16.38/micro/galleria_microscopio.html
- Immagini di lieviti in piastra con riferimento alla specie (credit: CREA - Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria)
http://20.61.16.38/micro/galleria_piastre.html
- Strumento online del sito "The Yeast Trust" per la ricerca di immagini, informazioni e riferimenti bibliografici di vari ceppi di lievito
<https://theyeasts.org/species-search>
- "I lieviti dell'habitat viticolo-enologico" di E. Vaudano, A. Costantini, L. Pulcini, E. Garcia-Moruno, pubblicato su Edizioni L'Informatore Agrario S.r.l. nel 2008 e liberamente scaricabile dal web per maggiori informazioni sui lieviti delle uve.