

Studio dell'**antagonismo diretto** tra **lieviti** e **muffe**

Obiettivo Valutare la capacità di un ceppo di lievito di interferire con la crescita di una muffa su terreni di coltura differenti.

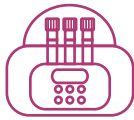
Autore Liceo Scientifico Galileo Galilei di Catania
Primo classificato Mad for Science 2023

Progetto "Per un pugno di arance: i lieviti come microrganismi di biocontrollo contro l'insorgenza di muffe sugli agrumi"



Materiali e reagenti

- Etanolo 70%
 - Arancia ammuffita
 - Criotubo con lievito BS91
 - 6 piastre Petri con terreno PDA
 - 6 piastre Petri con terreno SDA
 - Pennarello indelebile
 - Anse ad anello sterili monouso
 - Bisturi sterile
 - Pinzetta sterile
 - Parafilm®
-



Strumenti

- Cappa a flusso laminare
- Incubatore



Sicurezza

- Camice
 - Guanti
-



Tempo

Circa 30-40 min per l'allestimento delle colture di muffa e lievito
2-5 giorni di incubazione per l'ottenimento delle colonie
circa 45 minuti per la preparazione del saggio in piastra
circa 2 giorni per il saggio di antagonismo diretto



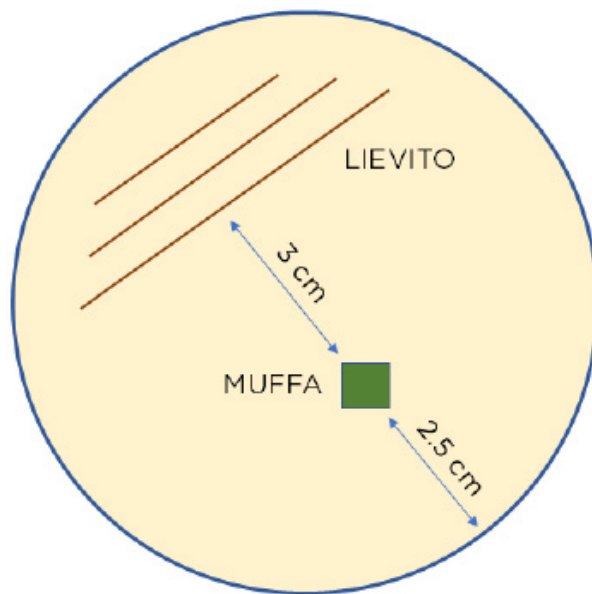
Procedimento

- 1.** Prima di iniziare l'esperienza, per la semina dei microrganismi è necessario predisporre i terreni Potato Dextrose Agar (PDA) e Sabouraud Dextrose Agar (SDA), preparati seguendo le note riportate nel protocollo "Isolamento di microrganismi da mosto d'uva", disponibile nella sezione "Biologia ambientale".
- 2.** Accendere la cappa biologica a flusso laminare, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70% e posizionare nella porzione centrale le anse sterili e un'arancia ammuffita.
- 3.** Predisporre sotto cappa due piastre Petri con terreno PDA per la muffa e due con terreno SDA per il lievito. Marcare il bordo di ciascuna con la data, il nome del terreno e il contenuto previsto. Per ciascun terreno, una piastra sarà dedicata alla semina del microrganismo, mentre l'altra verrà utilizzata come controllo negativo, senza inoculo.
- 4.** Sotto cappa biologica, utilizzando un'ansa sterile, prelevare una piccola porzione di muffa dalla superficie dell'arancia e seminarla nel centro della piastra contenente terreno PDA, distribuendola uniformemente sulla superficie dell'agar.
- 5.** Trasferire le piastre nell'incubatore con temperatura impostata a 25°C, monitorando la crescita su base quotidiana, fino all'ottenimento di una coltura ben sviluppata (generalmente dopo 3-5 giorni).
- 6.** Recuperare dal congelatore un criotubo contenente il ceppo di lievito BS91 e lasciarlo scongelare parzialmente per alcuni minuti a temperatura ambiente.
- 7.** Utilizzando un'ansa sterile, prelevare una piccola quantità del contenuto del criotubo e seminarla mediante striscio uniforme sulla superficie della piastra contenente terreno SDA. Riporre il criotubo in congelatore nel più breve tempo possibile.
- 8.** Trasferire le piastre nell'incubatore con temperatura impostata a 25°C, monitorando la crescita quotidianamente, fino all'ottenimento di colonie ben isolate e morfologicamente omogenee (generalmente dopo 2-5 giorni).

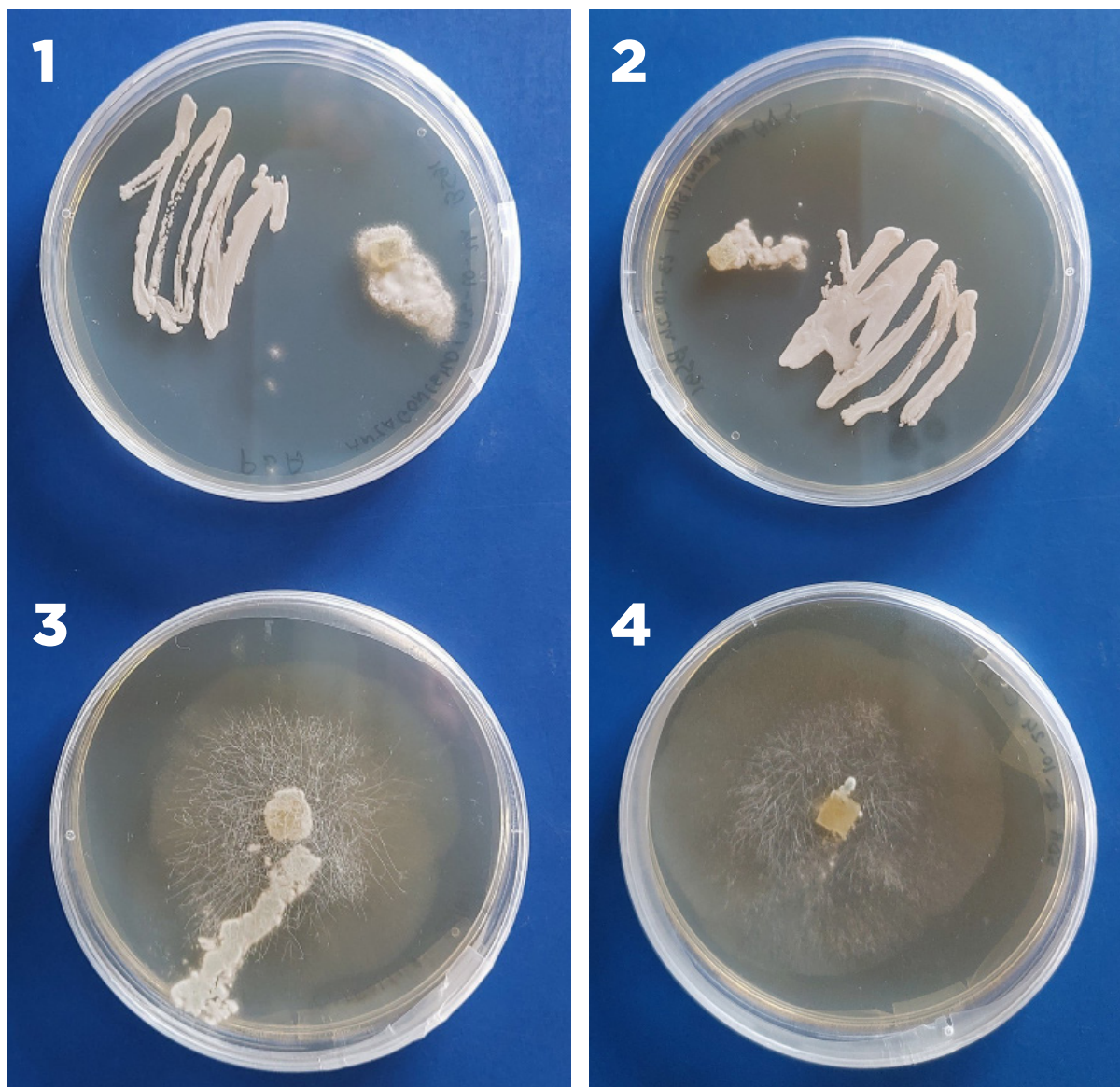
9. Una volta ottenute colonie ben sviluppate, selezionarne una di muffa e una di lievito BS91 da utilizzare per l'allestimento del saggio di antagonismo.
10. Disporre sotto cappa biologica anse, bisturi e pinzetta sterili, insieme a quattro piastre Petri con terreno PDA e quattro con terreno SDA. Marcare il bordo di ciascuna piastra con la data, il nome del terreno e il tipo di inoculo previsto, come indicato nella tabella seguente.

PIASTRA	TERRENO	INOCULO PREVISTO
A	PDA	Muffa + lievito BS91
B	PDA	Muffa
C	PDA	Lievito BS91
D	PDA	Nessun inoculo (controllo negativo)
E	SDA	Muffa + lievito BS91
F	SDA	Muffa
G	SDA	Lievito BS91
H	SDA	Nessun inoculo (controllo negativo)

11. Prelevare dall'incubatore le colture di muffa e di lievito BS91 selezionate per l'allestimento del saggio.
12. Aprire la piastra contenente la muffa e, utilizzando un bisturi sterile, ritagliare dalla colonia fungina un frammento quadrato di circa 5 mm di lato, avendo cura di includere una piccola porzione del terreno di coltura sottostante.
13. Aiutandosi con una pinzetta sterile, trasferire il frammento sulla piastra A contenente terreno PDA. Come mostrato nell'illustrazione, posizionarlo a circa 2.5 cm dal bordo, facendolo aderire delicatamente alla superficie dell'agar.
14. Aprire la piastra contenente il lievito BS91 e, utilizzando un'altra ansa sterile, prelevare una piccola quantità della colonia selezionata.
15. Inoculare il lievito nella piastra A contenente il frammento, distribuendolo mediante una serie di strisci paralleli sulla superficie del terreno. Come mostrato nell'illustrazione, lo striscio dovrà essere effettuato sul lato opposto della piastra rispetto al frammento, mantenendo una distanza di circa 3 cm da esso.



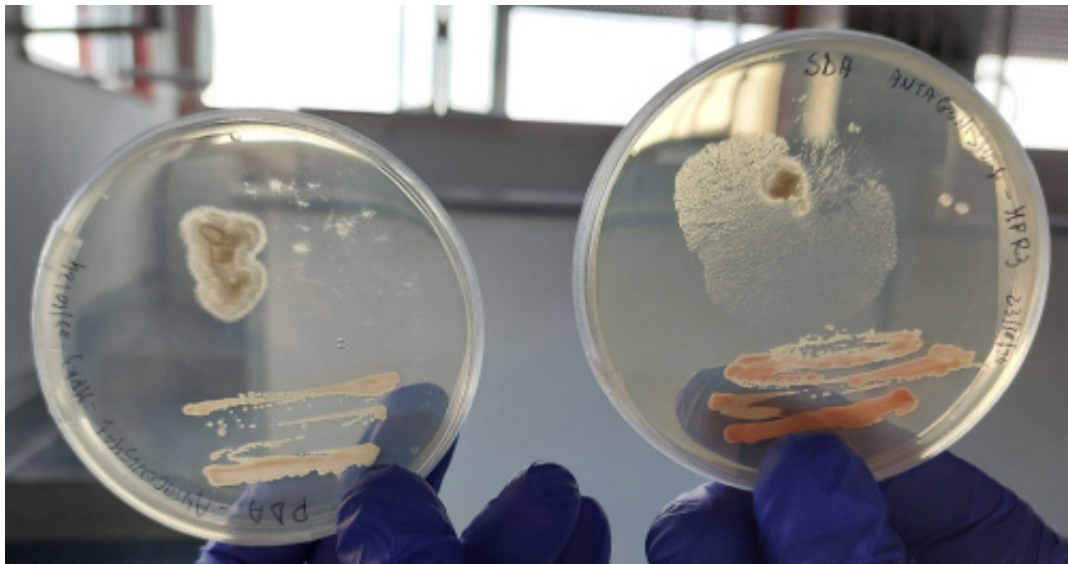
- 16.** Ripetere i passaggi 12-15 sulla piastra E contenente terreno SDA, prestando attenzione a cambiare ansa ad ogni inoculo.
- 17.** Allestire le piastre di controllo previste per entrambi i terreni: B e F inoculate esclusivamente con il frammento, C e G con il solo lievito BS91 e D e H prive di inoculo (controlli negativi).
- 18.** Trasferire le piastre nell'incubatore con temperatura impostata a 25°C e monitorare quotidianamente l'evoluzione dell'interazione tra i due microrganismi, fino alla comparsa di evidenti fenomeni di antagonismo o competizione (generalmente dopo circa 2 giorni).
- 19.** Al termine delle operazioni, 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.
- 20.** Per eventuali osservazioni o analisi successive, sigillare il bordo delle piastre con Parafilm® e conservarle a 4°C per un massimo di due settimane.



Saggio di antagonismo tra muffa e lievito BS91 in diverse condizioni sperimentali.
 1) saggio su terreno PDA; 2) saggio su terreno SDA;
 3) controllo con sola muffa su terreno PDA; 4) controllo con sola muffa su terreno SDA.
 Sul terreno PDA la crescita della muffa risulta orientata verso il lato opposto rispetto al lievito, mentre sul terreno SDA le ife si sviluppano in direzione della colonia di lievito.

Note

- Le muffe che crescono sulla superficie delle arance appartengono spesso al genere *Penicillium*. Tra le specie più diffuse vi è *Penicillium digitatum*, una delle principali responsabili del marciume verde e del deterioramento post-raccolta degli agrumi.
- Molti lieviti naturalmente presenti sulla superficie dei frutti sono in grado di limitare lo sviluppo delle muffe attraverso meccanismi di competizione o mediante la produzione di sostanze ad attività antimicrobica. Per questo motivo alcuni ceppi sono studiati come possibili agenti di biocontrollo per la conservazione degli alimenti e la riduzione dell'impiego di fungicidi chimici.
- Per questa attività è stato utilizzato il lievito BS91 (*Wickerhamomyces anomalus*), il cui effetto sulla crescita della muffa è mostrato nell'immagine sopra. Il saggio può essere eseguito anche con altri ceppi, come ad esempio MPR3 (*Metschnikowia pulcherrima*), riportato nell'immagine seguente. Il confronto tra i risultati ottenuti con lieviti diversi permette di valutare l'influenza delle caratteristiche specifiche di ciascun ceppo sull'attività antagonistica e di individuare i microrganismi più efficaci nel limitare la crescita della muffa.



Saggio di antagonismo tra muffa e lievito MPR3 in terreno PDA (sinistra) e SDA (destra).
Sul terreno PDA si osserva una maggiore inibizione della crescita della muffa, mentre sul terreno SDA le ife fungine si sviluppano fino a raggiungere quasi la colonia di lievito.

- In funzione delle caratteristiche del lievito e del terreno utilizzato, è possibile osservare differenti modalità di interazione tra i due microrganismi. In presenza di attività antagonistica, la crescita della muffa può risultare rallentata rispetto al controllo oppure arrestarsi a una certa distanza dalla colonia di lievito, determinando la comparsa di una zona di inibizione. In altri casi si possono osservare fenomeni di competizione per lo spazio e per i nutrienti disponibili, con modalità di crescita diverse nei due terreni di coltura. Alcuni esempi di queste interazioni sono mostrati nelle due immagini riportate sopra, dove i ceppi di lievito BS91 e MPR3 evidenziano comportamenti differenti nei terreni PDA e SDA.
- Le piastre contenenti i terreni Potato Dextrose Agar (PDA) e Sabouraud Dextrose Agar (SDA) possono essere preparate in anticipo e conservate a 4°C fino al momento dell'utilizzo. Dopo averle prelevate dal frigorifero, lasciarle a temperatura ambiente sul bancone per circa 30 minuti, in modo da evitare la formazione di condensa sulla superficie del terreno durante la semina.
- Per preservare la vitalità del ceppo di lievito e limitare eventuali danni dovuti a cicli ripetuti di congelamento e scongelamento, si consiglia di prelevare dal criotubo esclusivamente la quantità di inoculo necessaria e di riporlo nuovamente in congelatore nel più breve tempo possibile.
- Il frammento di muffa viene trasferito nella nuova piastra insieme a una piccola porzione del terreno di coltura. Ciò contribuisce a preservare l'integrità del micelio e ne facilita la ripresa della crescita dopo il trasferimento.
- La distanza iniziale tra il frammento di muffa e il lievito deve essere mantenuta il più possibile costante in tutte le piastre. Una distanza troppo ridotta potrebbe favorire un contatto precoce tra le colonie, mentre una distanza eccessiva potrebbe rendere meno evidenti eventuali fenomeni di antagonismo.
- Le piastre contenenti il frammento fungino devono essere incubate senza essere capovolte. Il capovolgimento potrebbe causare lo spostamento del frammento o il suo distacco dalla superficie dell'agar, compromettendo il corretto sviluppo della coltura.
- Per aumentare l'affidabilità dei risultati, è consigliabile eseguire tutte le fasi sperimentali in almeno tre repliche indipendenti, sia durante l'ottenimento delle colture di muffa e lievito, sia durante il successivo saggio di antagonismo.
- L'allestimento di controlli contenenti esclusivamente la muffa o il lievito consente di valutare la normale crescita di ciascun microrganismo nelle condizioni sperimentali adottate. Il confronto con le piastre del saggio di antagonismo permette di attribuire eventuali differenze di crescita all'interazione tra i due organismi e non alle caratteristiche del terreno o alle condizioni di incubazione. Il controllo negativo consente di verificare l'assenza di contaminazioni del terreno di coltura o dell'ambiente di lavoro.