

Analisi **microscopica** di **colture pure** di **microrganismi** isolati da **mosto** d'uva

Obiettivo Ottenere colture pure di lieviti e muffe isolate da mosto d'uva e osservarne le caratteristiche microscopiche attraverso preparati a fresco.

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

- Piastre di lieviti e mufte
- Pennarello indelebile
- Piastre Petri con terreno PDA
- Piastre Petri con terreno SDA
- Etanolo 70%
- Anse ad anello sterili monouso
- Tubi sterili da 15 ml
- Puntali sterili
- Pipette sterili
- Acqua distillata sterile
- Vetrini porta oggetto
- Vetrini copri oggetto
- Carta assorbente
- Parafilm®



Strumenti

- Cappa a flusso laminare
- Incubatore
- Micropipette
- Pipettatore manuale
o automatico
- Microscopio ottico
(eventualmente con fotocamera
integrata)



Sicurezza

- Camice
- Guanti



Tempo

Circa 30 minuti per l'isolamento delle colonie
3-5 giorni di incubazione per ottenere le colture pure
15 minuti per la preparazione del vetrino
30 minuti per l'osservazione al microscopio ottico

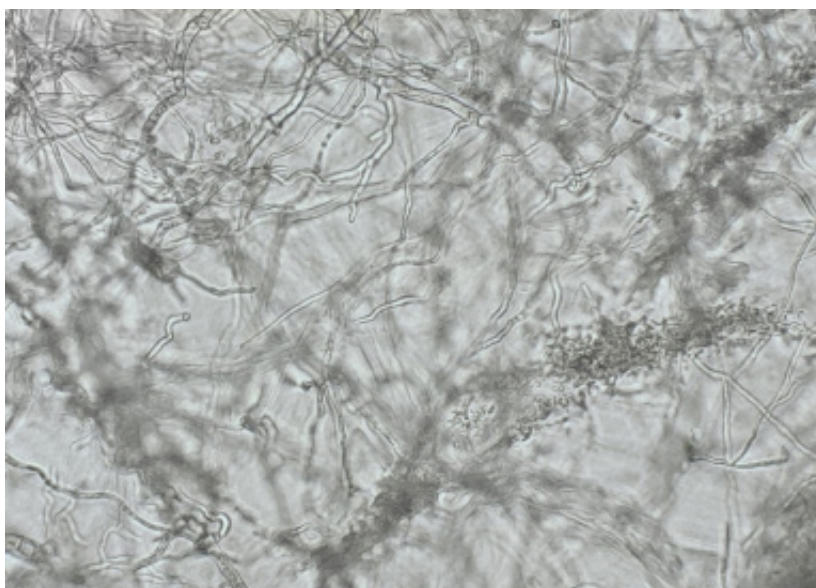


Procedimento

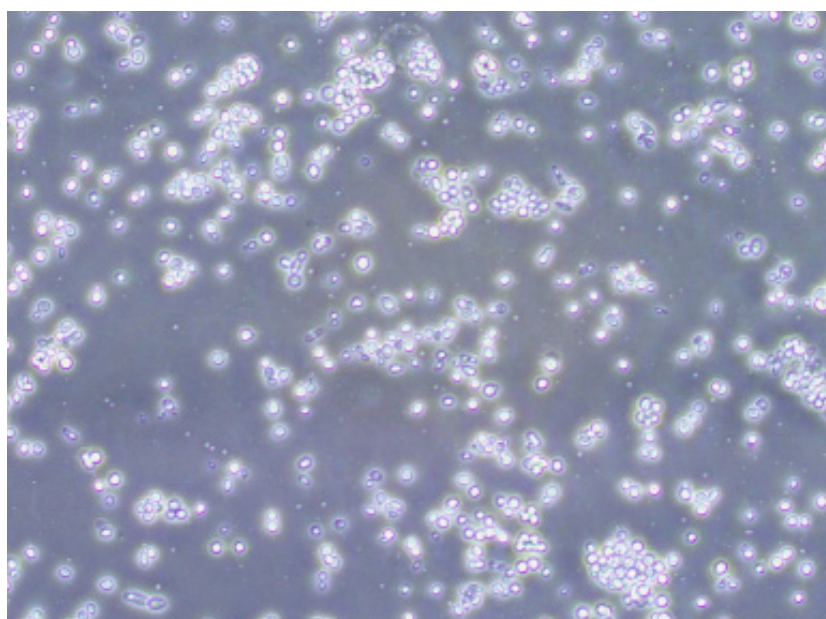
- 1.** Prima di iniziare l'esperienza, è necessario predisporre i seguenti terreni da utilizzare per la semina dei microrganismi: Potato Dextrose Agar (PDA) e Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Le piastre possono essere allestite in anticipo e conservate a 4°C fino al momento dell'utilizzo.
- 2.** Il punto di partenza di questa attività è il protocollo "Isolamento di microrganismi da mosto d'uva", disponibile nella sezione "Biologia ambientale", che consente di isolare colonie singole di muffe e lieviti cresciuti sui terreni PDA e SDA.
- 3.** Esaminare attentamente le colonie presenti nelle piastre di partenza. Sulla base delle caratteristiche macroscopiche osservate, selezionare una colonia presumibilmente appartenente a un lievito oppure a una muffa e contrassegnarla sul fondo della piastra con un pennarello indelebile.
- 4.** Prelevare dal frigorifero tante piastre Petri di terreno quante sono le colonie da seminare. Utilizzare una piastra contenente terreno PDA per l'isolamento delle muffe e una piastra con terreno SDA per i lieviti. Lasciare le piastre a temperatura ambiente per circa 30 minuti, in modo da evitare la formazione di condensa sulla superficie del terreno durante la semina. Contrassegnare ogni nuova piastra riportando la data e il tipo di microrganismo che si intende piastare.
- 5.** Accendere la cappa biologica a flusso laminare, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70% e posizionare nella porzione centrale le anse ad anello e le piastre contenenti i terreni PDA o SDA.
- 6.** Sotto cappa biologica, utilizzando un'ansa sterile, prelevare una piccola quantità di materiale biologico dalla colonia selezionata.
- 7.** Aprire la nuova piastra e inoculare il campione nel centro. Con la stessa ansa, distribuire il materiale mediante una serie di strisci paralleli sulla superficie del terreno, in modo da ottenere colonie ben separate durante la successiva crescita.
- 8.** Richiudere immediatamente la piastra e ripetere il procedimento in una nuova piastra per eventuali altre colonie di interesse, utilizzando ogni volta una nuova ansa sterile.

9. 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.
10. Trasferire le piastre nell'incubatore con temperatura impostata a 25°C. Mantenere in incubazione le colture di muffe per almeno 5 giorni e quelle di lieviti per almeno 3 giorni, monitorandone quotidianamente lo sviluppo.
11. Terminata l'incubazione, verificare l'omogeneità delle colonie ottenute. La presenza di colonie con aspetto uniforme indica il probabile ottenimento di una coltura pura. Se sono presenti colonie con morfologie differenti, ripetere il procedimento di isolamento a partire da una singola colonia ben separata.
12. Per l'osservazione microscopica su campione fresco, accendere la cappa biologica a flusso laminare, disinfettare il piano di lavoro con Etanolo 70% e porre nella porzione centrale le anse ad anello, le micropipette, i puntali sterili, i vetrini porta oggetto e i vetrini copri oggetto. Predisporre anche un pipettatore, una pipetta da 10 ml e i tubi sterili necessari per allestire le sospensioni.
13. Preparare un tubo da 15 ml per ogni campione da analizzare, marcandolo con il terreno di provenienza e la presunta tipologia di microrganismo. Rimuovere il tappo e, utilizzando il pipettatore, trasferire con una pipetta 10 ml di acqua distillata sterile in ciascun tubo.
14. Utilizzare un'ansa sterile per prelevare una piccola quantità di cellule e sospenderla nell'acqua sterile contenuta nel tubo. Chiudere il tappo e mescolare delicatamente per inversione alcune volte fino ad ottenere una sospensione omogenea. Sostituire l'ansa per ogni nuova colonia da prelevare.
15. Con un puntale sterile depositare una goccia della sospensione al centro di un vetrino porta oggetto (una goccia corrisponde a circa 25 µl).
16. Posizionare delicatamente un vetrino copri oggetto sopra la goccia evitando la formazione di bolle d'aria. Asciugare con carta assorbente eventuali liquidi in eccesso.
17. Ripetere le operazioni sopra descritte per tutti i vetrini che si vogliono preparare.
18. Una volta allestiti i vetrini di interesse, 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. Osservare immediatamente il preparato al microscopio ottico. Iniziare l'osservazione con l'obiettivo a minore ingrandimento (ad esempio 5X) per individuare il campione, quindi passare progressivamente a ingrandimenti maggiori (ad esempio 40X) per visualizzarne i dettagli.

- 20.** Annotare la forma delle cellule, la loro disposizione e le principali caratteristiche morfologiche osservate. In presenza di strutture filamentose ramificate, come mostrato nella prima immagine, il microrganismo può essere identificato come una muffa. Cellule rotonde o ovali che presentano gemmazione, come quelle osservate nella seconda immagine, sono invece caratteristiche dei lieviti. Eventuali cellule molto piccole, prive di gemmazione e non organizzate in strutture filamentose, sono compatibili con batteri.
- 21.** Al termine delle osservazioni, sigillare con Parafilm® i bordi delle piastre contenenti le colture pure di muffe e lieviti e conservarle a 4°C per una o due settimane per eventuali analisi successive. In alternativa, le piastre possono essere mantenute a circa 15°C per rallentare la crescita dei microrganismi e disporre più a lungo di colture vitali.



Coltura pura di muffa Penicillium digitatum osservata al microscopio ottico all'ingrandimento 20X



Coltura pura di lievito BS91 osservata al microscopio ottico all'ingrandimento 40X

Note

- In questo protocollo, il terreno Potato Dextrose Agar viene utilizzato per l'isolamento in coltura pura delle muffe, mentre il Sabouraud Dextrose Agar per quello dei lieviti, sebbene entrambi possano supportare la crescita di numerose specie fungine. Per conoscere le caratteristiche e la composizione di questi due terreni, fare riferimento alle note del protocollo "Isolamento di microrganismi da mosto d'uva" nella sezione "Biologia ambientale". Per la preparazione delle piastre con questi terreni, è possibile seguire il procedimento riportato nel protocollo "Preparazione del terreno Skim Milk Agar" nella sezione "Microbiologia".
- L'ottenimento di colture pure rappresenta un passaggio fondamentale in microbiologia, poiché permette di osservare e studiare un singolo microrganismo senza interferenze dovute alla presenza di altre specie. Il trasferimento di una colonia isolata su una nuova piastra riduce progressivamente la complessità della popolazione microbica fino ad ottenere una coltura costituita da cellule appartenenti allo stesso microrganismo.
- I lieviti si osservano al microscopio come cellule singole di forma generalmente sferica o ovale. In molti casi è possibile riconoscere cellule in fase di gemmazione, caratteristica tipica della loro riproduzione. Le cellule tendono ad essere relativamente uniformi per forma e dimensioni.
- Le muffe sono invece costituite da filamenti microscopici chiamati ife. Al microscopio appaiono come strutture allungate, ramificate e intrecciate tra loro che formano il micelio. In alcune specie possono essere visibili strutture riproduttive contenenti spore.
- I batteri possono occasionalmente essere presenti nelle colture ottenute dal mosto d'uva. Rispetto a lieviti e muffe, si distinguono per le dimensioni molto ridotte e per la formazione di colonie generalmente lisce e appiattite. L'osservazione microscopica richiede solitamente ingrandimenti maggiori rispetto a quelli necessari per lieviti e muffe.
- La preparazione di una sospensione in acqua sterile consente di distribuire più uniformemente le cellule sul vetrino e facilita l'osservazione microscopica. Nel caso di colture poco dense, è comunque possibile allestire il preparato prelevando con la punta di un puntale sterile una minima quantità di cellule dalla colonia, disperdendole in una goccia di acqua sterile depositata sul vetrino porta oggetto.
- Per l'osservazione dei lieviti, alla sospensione preparata al punto 14 può essere aggiunta una piccola quantità di glucosio in polvere prelevata con una spatola pulita. Dopo aver mescolato delicatamente la sospensione per inversione, si consiglia di attendere almeno 15 minuti prima dell'osservazione al microscopio. La disponibilità di una fonte di carbonio facilmente assimilabile può favorire l'attività metabolica delle cellule e rendere più semplice l'osservazione di eventuali fenomeni di gemmazione.
- In assenza di 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.
- Per allestire un preparato a fresco è sufficiente appoggiare delicatamente il vetrino copri oggetto sulla goccia depositata sul vetrino porta oggetto. Si consiglia di non esercitare pressione sul copri oggetto, poiché potrebbe rompersi oppure deformare le strutture cellulari osservate, in particolare le ife delle muffe.
- 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, fare riferimento alle note dedicate nel protocollo "Preparazione del terreno Skim Milk Agar" nella sezione "Microbiologia".