

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

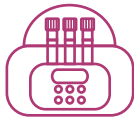
Obiettivo Studiare l'interazione tra lieviti e muffe senza contatto diretto, attraverso la produzione di composti organici volatili in un sistema di coltivazione "*face to face*".

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%
 - Colonie di muffa da arancia
 - Colonie di lievito BS91
 - 2 piastre Petri con terreno PDA
 - 2 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 min per l'allestimento del sistema “*face to face*”
circa 5 giorni per il saggio di antagonismo indiretto



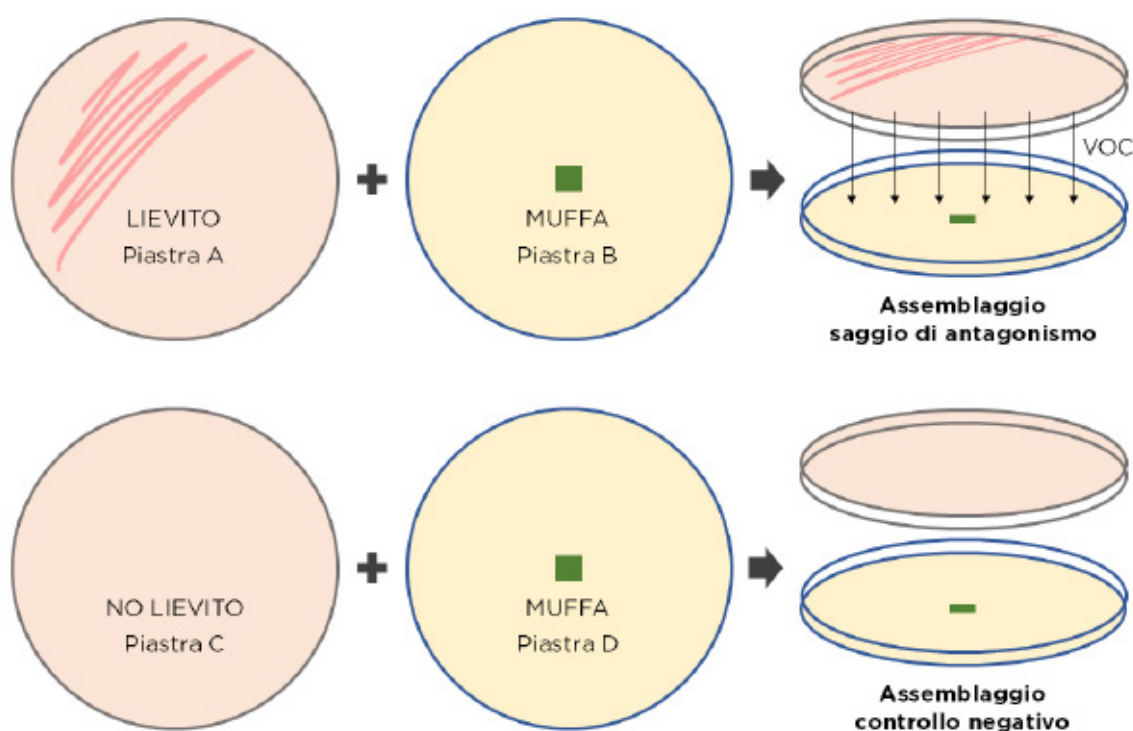
Procedimento

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. Il punto di partenza di questa attività è il protocollo "Studio dell'antagonismo diretto tra lieviti e muffe", disponibile nella sezione "Microbiologia", che consente di ottenere colonie di muffa da arancia su terreno PDA e colonie di lievito su terreno SDA da utilizzare per l'allestimento del saggio.
3. Esaminare le colture ottenute e selezionare una colonia di muffa e una colonia di lievito BS91 da utilizzare per l'allestimento del saggio.
4. Accendere la cappa biologica a flusso laminare, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70% e posizionare nella porzione centrale anse, bisturi e pinzetta sterili.
5. Preparare sotto cappa biologica due piastre Petri contenenti terreno PDA e due 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.

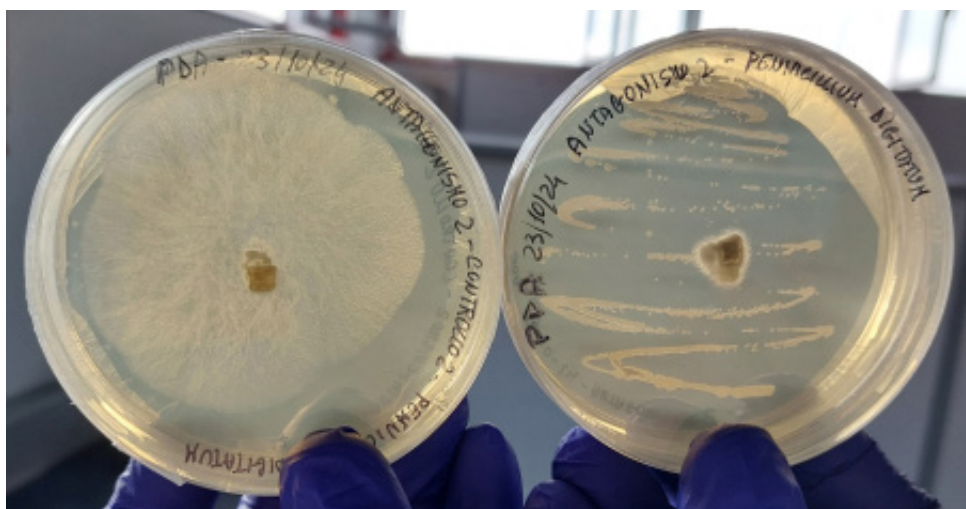
PIASTRA	TERRENO	INOCULO PREVISTO
A	SDA	Lievito BS91
B	PDA	Muffa
C	SDA	Nessun inoculo (controllo negativo)
D	PDA	Muffa (controllo negativo)

6. Aprire la piastra contenente il lievito BS91 e, utilizzando un'ansa sterile, prelevare una piccola quantità della colonia selezionata. Seminare il lievito sulla superficie della piastra A mediante uno striscio ondulatorio uniforme.

7. 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.
8. Con l'aiuto di una pinzetta sterile, trasferire il frammento al centro della piastra B, facendolo aderire delicatamente alla superficie dell'agar.
9. Ripetere i passaggi 7 e 8 sulla piastra D.
10. Dopo aver rimosso i coperchi delle piastre inoculate, assemblare le piastre A e B e le piastre C e D secondo lo schema riportato nell'illustrazione, ponendo le superfici agarizzate una di fronte all'altra in configurazione "face to face". Sigillare accuratamente i due sistemi con Parafilm®.



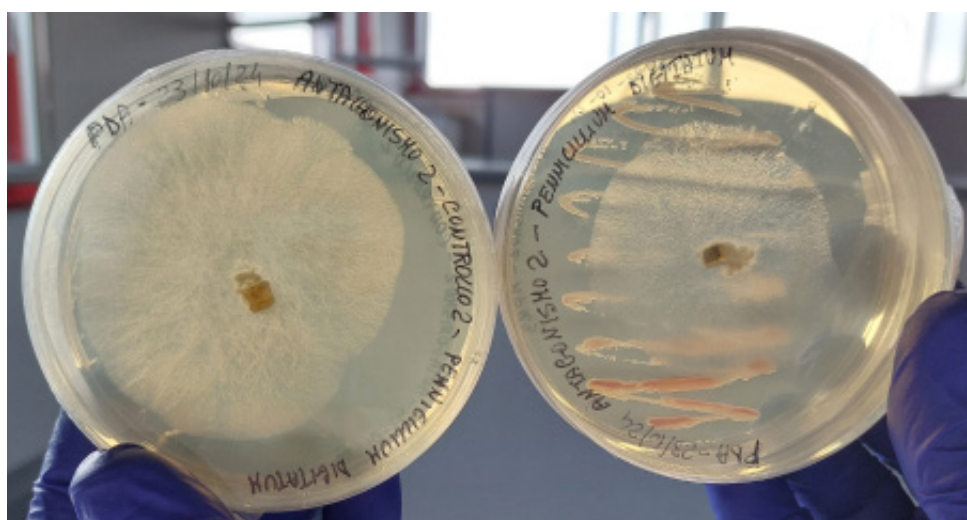
11. Trasferire le piastre così assemblate nell'incubatore con temperatura impostata a 25°C e mantenerle in coltura per 5 giorni.
12. Senza aprire il sistema "face to face", monitorare quotidianamente l'evoluzione dell'interazione tra i due microrganismi, confrontando la crescita della muffa nel saggio di antagonismo con quella osservata nel controllo negativo.
13. 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.
14. Per eventuali osservazioni successive, sigillare le piastre con Parafilm® e conservarle a 4°C per un massimo di due settimane.



Saggio di antagonismo indiretto tra muffa e lievito BS91 (destra) e relativo controllo inoculato esclusivamente con la muffa (sinistra). Il confronto tra le due piastre evidenzia l'effetto inibitorio dei composti organici volatili prodotti dal lievito sulla crescita della muffa.

Note

- I lieviti possono contrastare lo sviluppo delle muffe attraverso diversi meccanismi. Oltre alla competizione per nutrienti e spazio, alcuni ceppi producono composti organici volatili (volatile organic compounds, VOC), che diffondono nell'aria e possono interferire con la crescita dei microrganismi circostanti. Tra questi rientrano molecole appartenenti a diverse classi chimiche, come alcoli ed esteri.
- Il sistema "face to face" permette di studiare specificamente gli effetti dei VOC, poiché lievito e muffa crescono in compartimenti separati senza contatto fisico diretto e senza condividere il terreno di coltura. Il confronto con il controllo negativo, costituito dalla piastra PDA contenente la muffa assemblata con una piastra SDA non inoculata, consente di attribuire eventuali differenze osservate all'azione antagonistica dei VOC prodotti dal lievito. Nella prima immagine è riportato un esempio di questo fenomeno, evidenziato dalla significativa riduzione dell'estensione della colonia fungina rispetto al controllo.
- Per questa attività è stato utilizzato il lievito BS91 (*Wickerhamomyces anomalus*), ma il saggio può essere eseguito anche con altri ceppi dotati di attività antagonistica, come ad esempio MPR3 (*Metschnikowia pulcherrima*). Il confronto tra la prima e la seconda immagine mostra come differenti ceppi di lievito possano determinare livelli diversi di inibizione della crescita della muffa.



Saggio di antagonismo indiretto tra muffa e lievito MPR3 (destra) e relativo controllo inoculato esclusivamente con la muffa (sinistra). La crescita della muffa risulta ridotta rispetto al controllo, ma in misura inferiore rispetto a quanto osservato con il ceppo BS91.

- *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.*
- *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 favorire la ripresa della crescita dopo il trasferimento.*
- *Le piastre assemblate nel sistema "face to face" non devono essere capovolte durante l'incubazione. La piastra contenente il lievito deve rimanere sempre sovrapposta a quella contenente la muffa per evitare il distacco o lo spostamento del frammento fungino dalla superficie dell'agar.*
- *Durante l'incubazione, la sigillatura delle piastre con Parafilm® è fondamentale per limitare gli scambi di aria con l'ambiente esterno. In questo modo, viene favorito l'accumulo dei VOC rilasciati dal lievito e la loro interazione con la muffa. Per questo motivo, il sistema "face to face" non deve essere aperto durante il monitoraggio dell'esperimento, poiché la dispersione dei VOC potrebbe influenzare il risultato del saggio.*