

# Preparazione del terreno **WL solido**

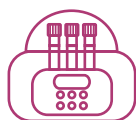
**Obiettivo** Preparare il terreno WL (Wallerstein Laboratory) in forma solida per la crescita non selettiva su piastra dei lieviti.

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



# Materiali e reagenti

- WL Nutrient Agar in polvere
- Acqua deionizzata
- Cucchiaino
- Navicella da pesata o carta stagnola
- Becher o beuta graduati da 1L
- Cilindro graduato da 500 ml
- Ancoretta magnetica
- Bottiglia da 1L resistente al calore
- Scotch da autoclave
- Ampicillina sterile 100 mg/L
- Bifenile sterile 400 mg/L
- Spatole sterili
- Piastre Petri sterili monouso
- Parafilm®
- Pennarello



## Strumenti

- Bilancia
- Autoclave
- Piastra magnetica riscaldante
- Cappa biologica a flusso laminare o becco Bunsen



## Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Guanti per il calore



## Tempo

Circa due ore per la preparazione, la sterilizzazione in autoclave e la solidificazione del terreno nelle piastre Petri



# Procedimento

- 1.** Per preparare 1L di terreno WL, con una bilancia pesare 75 g di WL Nutrient Agar in polvere, aiutandosi con un cucchiaino e una navicella da pesata. Trasferire la polvere in un becher graduato da 1L.
- 2.** Con un cilindro trasferire circa 500 ml di acqua deionizzata nel becher e mescolare la soluzione con una ancorotta su piastra magnetica, riscaldata a 70°C, fino alla completa dissoluzione della polvere.
- 3.** Portare la soluzione a volume di 1L nel becher, aggiungendo acqua deionizzata fino a raggiungere la tacca indicatrice corrispondente.
- 4.** Trasferire il terreno WL in una bottiglia da 1L resistente al calore, precedentemente marcata con scotch da autoclave con la dicitura “WL terreno solido” e la data di preparazione.
- 5.** Sterilizzare il terreno, ponendo la bottiglia in autoclave a 121°C per 15-20 minuti. Assicurarsi che il tappo non sia chiuso ermeticamente.
- 6.** Al termine del processo di sterilizzazione, lasciare raffreddare il terreno fino al raggiungimento di una temperatura tale per cui la bottiglia possa essere maneggiata senza scottarsi (circa 50°C).
- 7.** Accendere la cappa biologica a flusso laminare e pulire il piano di lavoro con Etanolo 70%.
- 8.** Sotto cappa biologica, pesare e aggiungere al terreno 100 mg di Ampicillina sterile (concentrazione finale nel terreno: 100 mg/L) e 400 mg di Bifenile sterile (concentrazione finale: 400 mg/L) per favorire la crescita dei lieviti. Mescolare bene la soluzione.
- 9.** Preparare le piastre Petri, marcandole con il nome del terreno e la data, e colare 20-25 ml circa di terreno WL nel centro di una piastra Petri, evitando la formazione di bollicine. Distribuire il terreno in maniera uniforme. Lo spessore del terreno in piastra deve essere all'incirca di 1 cm.
- 10.** Lasciare raffreddare le piastre sotto cappa con il coperchio semichiuso per

permettere la solidificazione dell'agar.

- 11.** Quando il terreno sarà completamente solidificato, procedere con la semina dei microrganismi, seguendo il protocollo “Lavaggio degli acini d'uva e semina su piastra dei lieviti” (sezione: “Biologia ambientale”). In alternativa, chiudere le piastre con il Parafilm® e conservarle a 4°C capovolte e al riparo dalla luce.
- 12.** 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.

## Note

- Il terreno WL è un terreno non selettivo che consente la crescita di diversi tipi di lieviti, muffe e di alcuni batteri presenti in prodotti fermentati, come il vino e la birra.
- La composizione del terreno WL (pH finale:  $5.5 \pm 0.2$ ) è la seguente:

• Triptone	5 g/L
• Estratto di lievito	4 g/L
• Glucosio	50 g/L
• Potassio fosfato di idrogeno	0.55 g/L
• Cloruro di potassio	0.425 g/L
• Calcio cloruro	0.125 g/L
• Solfato di magnesio	0.125 g/L
• Cloruro di ferro	0.0025 g/L
• Solfato di manganese	0.0025 g/L
• Verde di bromocresolo	0.022 g/L
• Agar batteriologico	15 g/L
- Il verde di bromocresolo fornisce una colorazione blu-verde petrolio al terreno, che con la crescita dei microrganismi e l'abbassamento del suo pH, cambia colorazione virando verso il verde-giallo paglierino.
- Verificare sulla confezione di WL Nutrient Agar acquistata la giusta quantità di polvere da pesare per preparare un litro di terreno. Per questo protocollo è stato utilizzato il terreno WL della ditta produttrice Scharlau (codice: 01-210-500).
- Per favorire la crescita dei lieviti, rispetto ad altri tipi di microrganismi come batteri o muffe, vengono aggiunti rispettivamente Ampicillina e Bifenile; per favorire, invece, la crescita di batteri e muffe a discapito dei lieviti deve essere aggiunto Actidione (100 mg/L).
- Il Bifenile è insolubile in acqua, per cui è preferibile sciogliere la polvere misurata in pochi ml di alcol etilico e poi versarla nel terreno.
- Nel caso in cui non si disponga di polveri sterili di Ampicillina e Bifenile, è possibile risospendere le polveri secondo le indicazioni della ditta produttrice e sterilizzare le soluzioni sotto cappa biologica tramite filtrazione con siringa 0.22 µm. Alternativamente, è possibile misurare e versare la polvere di Bifenile nel terreno e sterilizzare la soluzione in autoclave. Questa seconda opzione è applicabile solo al Bifenile, in quanto è termoresistente. Per l'Ampicillina seguire solo il primo metodo descritto.
- Questo protocollo può essere realizzato anche in assenza di una cappa biologica a flusso laminare: è sufficiente un banco da laboratorio, precedentemente pulito con Etanolo 70%, e la fiamma di un becco Bunsen (fare attenzione al rischio incendio!), vicino alla quale colare le piastre.
- 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 e al prelievo del materiale biologico.
- La piastra magnetica facilita e velocizza la dissoluzione delle polveri; in sua mancanza, bisognerà mescolare manualmente la soluzione.
- Per mantenere la sterilità delle piastre Petri aprire e chiudere la confezione sotto il flusso della cappa biologica o vicino alla fiamma del becco Bunsen.