

Esperienza 1: la conta delle cellule di lievito

La natura microscopica del lievito può essere facilmente illustrata grazie alla stima del numero delle cellule in un cubo di lievito comprato in commercio, confrontandolo col numero ottenuto con la popolazione umana sulla terra. Per arrivarci, si deve diluire le cellule del lievito nell'acqua, per ottenere dei numeri misurabili di cellule sulla capsula di Petri. Dopo l'incubazione a 30°C, ogni cellula viva produrrà una colonia sulla capsula di Petri.

Soggetti: diversi metodi di misura, lavoro in condizioni sterili, piccoli organismi, grandi numeri, formazione di colonie sulla capsula di Petri.

L'esperienza

- Prelevare da un cubo di lievito un piccolo pezzo di circa 1 g e posarlo sulla bilancia. Non è importante che il peso sia esattamente 1 g, ma bisogna comunque annotare il peso. Risospendere il pezzo di lievito in 10 ml d'acqua sterile.
- Fare delle diluzioni in serie nell'acqua sterile (vedi figura 1).

A titolo indicativo, una sospensione di lievito un po' torbida corrisponde a circa 10^7 cellule/ml, o un'assorbanza (OD = optic density) di 0,5. È possibile anche contare le cellule nella camera di Thoma (figura 2), o più facilmente con la camera di Kovas (figura 3). Questi metodi non indicano comunque il numero di cellule vive. Per ottenere il numero di cellule vive, bisogna seminare le cellule su una capsula di Petri.

- Seminare sulle capsule di Petri YPD e incubare 2 giorni a 30°C. Attenzione: annotare le capsule sul fondo (e non sul coperchio) con il nome e il numero dell'esperienza. Mettere le capsule all'ingiù nell'incubatrice a 30°C per evitare che le gocce della condensazione cadano sulle colonie.

Ad esempio: 0,25 g di lievito in 10 ml di acqua sterile. Si effettuano delle diluzioni in serie ($\rightarrow 10^{-2} \rightarrow 10^{-4} \rightarrow 10^{-6}$) e si semina 0,1 ml sul terreno di coltura della capsula di Petri. Dopo 2 giorni a 30°C, si contano 30 colonie. Questo corrisponde a circa 5×10^{11} cellule vive per cubo ($30 \text{ colonie} \times 10 \text{ ml} \times 10^7 \times 42 \text{ g (il peso del cubo)} \times 4$).

Materiale fornito:

Pipette sterili
Propipette
Pipette automatiche p200
Provette
Erlenmeyer sterile
Camera di Thoma (o Kovas)
Pipette Pasteur per stendere
Becher
Sacchi per scarti
Acqua sterile (per diluzione)
Capsule di Petri YPD
Etanolo

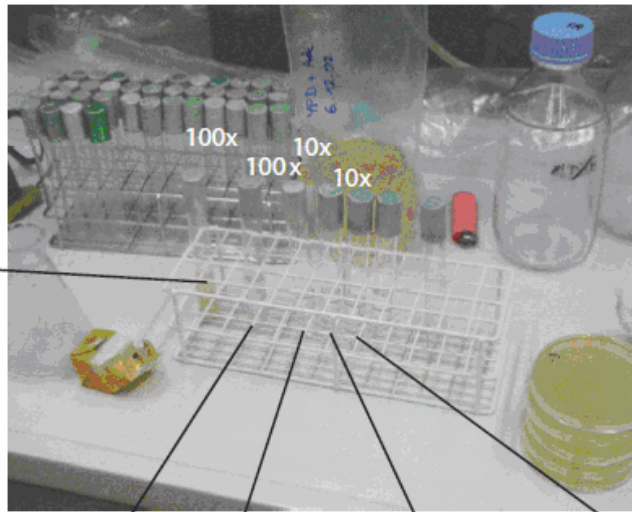
Materiale non fornito:

Becco Bunsen
Microscopio ottico
Bilancia
Cubi di lievito
Spettrofotometro (opzione)

Esempio dell'esperienza

Quante cellule ci sono in un cubo di lievito per fare la treccia della domenica mattina?

0,7 g di lievito in
10 ml d'acqua



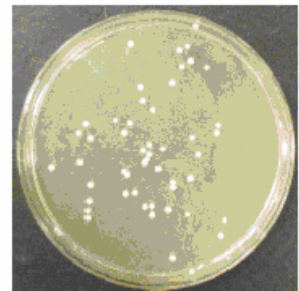
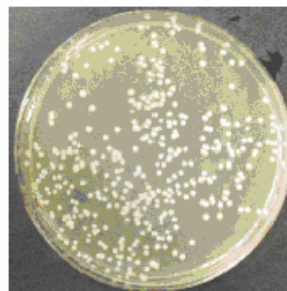
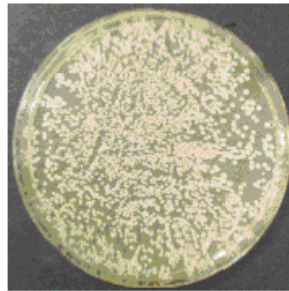
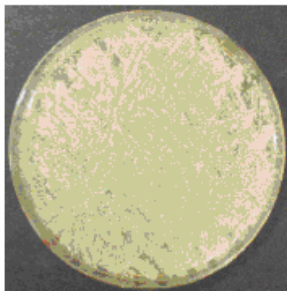
stendere 0,1 ml per
ottenere un fattore di
diluzione 10x

10^{-3}

10^{-5}

10^{-6}

10^{-7}



49 colonie

$40 \times 10 \times 10 \times 10 \times 100/\text{ml}$ d'acqua

$\times 10$ (per 10 ml)

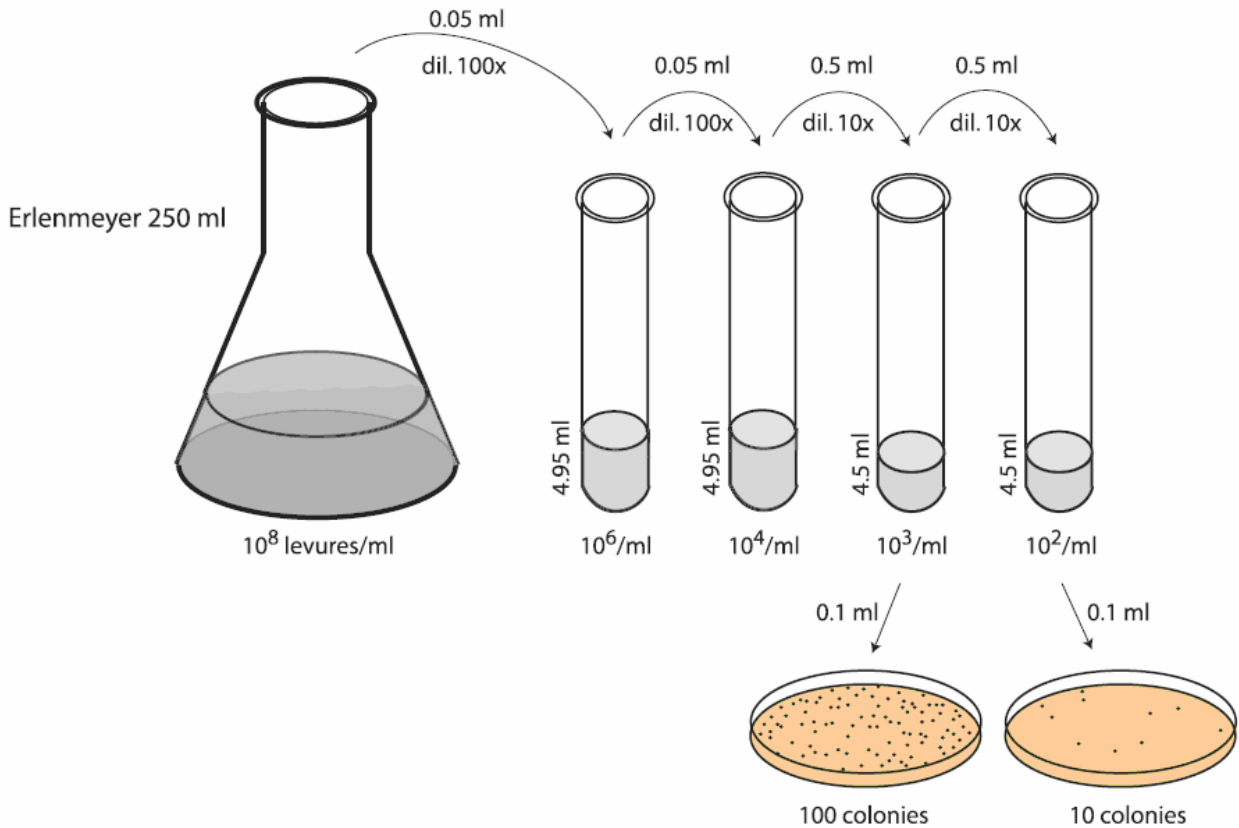
$\times 60$ (0,7 g di cubo da 42 g)

$= 29,4 \times 10^{10} = 2,9 \times 10^{11}$ cellule per cubo


290'000'000'000 cellule/cubo

Oggi gli umani sulla terra sono circa 7'000'000'000.

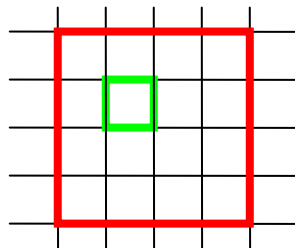
Principio di diluzione in serie



Camera di Thoma:

La camera di Thoma è formata da 16 quadrati grandi di $0,2 \text{ mm} \times 0,2 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^3 = 4 \times 10^{-6} \text{ ml}$. 

Il quadrato grande è composto di 16 quadrati piccoli. 



Il numero di cellule (N) contate in un quadrato grande corrispondono al numero di cellule in $4 \times 10^{-6} \text{ ml}$. Dunque $N \times (1/4 \times 10^{-6}) = N \times 2,5 \times 10^{-7} = \text{numero di cellule/ml}$.

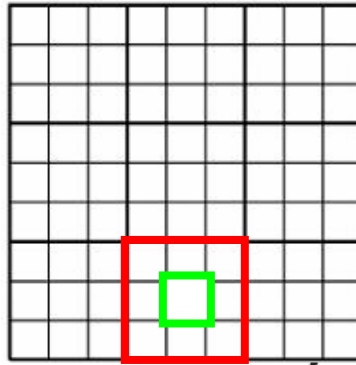
Non bisogna dimenticare di moltiplicare per il fattore di diluzione se necessario. Normalmente si contano 4 grandi quadrati.

Si contano le cellule all'interno e quelle che toccano i bordi in alto e a destra. Non si contano quelle che toccano i bordi in basso e a sinistra.

Camera di Kovas:

La camera di Kovas è usa e getta ed è costituita da 10 capsule individuali con griglie e quadratini per contare. Bisogna deporre circa 10 ml di liquido in una capsula.

Si trovano 9 quadrati grandi che contengono 9 quadrati piccoli:



Il numero di cellule (N) contate in un quadrato grande moltiplicate per 104, corrispondono al numero di cellule per ml. Non si deve dimenticare di moltiplicare per il fattore di diluzione se necessario.

Normalmente si contano 4 quadrati grandi.

Si contano le cellule all'interno e quelle che toccano i bordi in alto e a destra. Non si contano quelle che toccano i bordi in basso e a sinistra.