

## La conta dei lieviti tramite la misurazione della densità ottica

a cura di V. Soglio

*I metodi per determinare il numero di cellule di lievito presenti in una coltura sono molteplici, quello presentato in questo protocollo prevede la misurazione della densità ottica o assorbanza utilizzando uno spettrofotometro. Questo parametro indica la torbidità della coltura ed è proporzionale al numero di cellule presenti: maggiore è la densità, maggiore è il numero di cellule di lievito. Al fine di determinare in modo assoluto il numero di cellule di un campione è necessario costruire una curva standard impiegando uno degli altri metodi di conta cellulare. Anche la misurazione della densità ottica, come la conta delle colonie è largamente usata per i batteri.*

### Obiettivo

Determinare il numero di cellule di lievito presenti in una coltura attraverso la misurazione della sua densità ottica.

### Procedimento 1

#### Conta dei lieviti presenti in una coltura a concentrazione ignota

Usando il vortex o invertendo più volte, miscelare bene la coltura di lievito in modo tale che le cellule non formino aggregati.

- Trasferire 1 ml di coltura in una cuvetta pulita e predisporre una cuvetta per il bianco, contenente 1 ml di acqua del rubinetto o di terreno liquido YPD in base a quale mezzo è stato usato per far crescere o diluire il lievito.
- Impostare lo spettrofotometro a una lunghezza d'onda pari a 600 nm e leggerne il valore di densità ottica.
- Inserire le cuvette una alla volta partendo dal bianco.
- Per limitare il margine di errore, preparare almeno 2 o 3 repliche, misurare la densità ottica di ciascuna e calcolare la media dei valori.
- Calcolare il numero di cellule per ml sapendo che un'  $OD_{600}$  (densità ottica misurata a una lunghezza d'onda di 600 nm) pari a 0,1 è equivalente a circa  $1 \times 10^6$  cellule per ml.

Esempio: una coltura di lievito ha dato un valore di  $OD_{600} = 0,703$ , qual è la sua concentrazione?

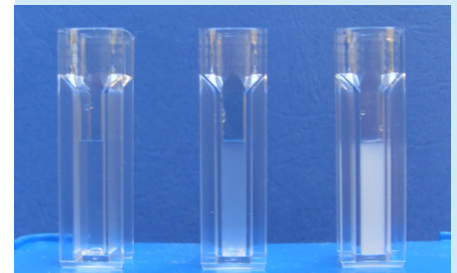
$$\frac{0,703 \times 10^6}{0,1} = 7,03 \times 10^6$$

La coltura contiene  $7,03 \times 10^6$  cellule per ml.

### Procedimento 2

#### Preparazione dei campioni per la curva standard

La curva standard è un grafico in cui sull'asse delle ascisse è riportato il valore di la densità ottica e su quello delle ordiante il numero di cellule contenute in quel campione per unità di volume. Essa serve per determinare il numero di cellule presenti in una campione ignoto a partire dal suo



#### Tempo previsto

1 ora

#### Materiali e reagenti

- ✓ Coltura liquida di lieviti a concentrazione ignota
- ✓ Acqua del rubinetto o terreno liquido YPD
- ✓ Piastre con terreno solido YPD
- ✓ Anse a L (sterili)
- ✓ Provette da 15 ml
- ✓ Cuvette per spettrofotometro
- ✓ Carta millimetrata

#### Strumentazione

- ✓ Spettrofotometro
- ✓ Vortex (facoltativo)

valore di la densità ottica, questa deduzione è possibile grazie alla diretta proporzionalità che esiste tra i due valori.

- In 4 provette preparare una diluizione seriale di una coltura di lieviti (vedi protocollo 'Preparazione di una coltura di lieviti').
- Denominare ciascuna diluizione come segue: standard 1 (la più concentrata), standard 2, standard 3, standard 4 (la meno concentrata).
- Determinare per ciascuna diluizione dello standard il numero di cellule, utilizzando come metodo di conta uno di quelli illustrati nei protocolli 'La conta di lieviti tramite la crescita su piastra' e 'La conta dei lieviti tramite l'utilizzo di un vetrino con reticolo'.

#### Conta dei lieviti presenti in una coltura a concentrazione ignota

- Preparare due diluizioni seriali della coltura a concentrazione ignota e denominarle diluizione 1 e diluizione 2 (vedi protocollo 'Preparazione di una coltura di lieviti').
- Usando il vortex o invertendo più volte, miscelare bene il contenuto di tutte le provette (4 standard e 2 diluizioni della coltura a concentrazione ignota).
- Trasferire 1 ml di ciascuna provetta in cuvette pulite, predisporre una cuvetta per il bianco, contenente 1 ml di acqua del rubinetto o di terreno liquido YPD in base a quale mezzo è stato usato per far crescere e diluire il lievito.
- Impostare lo spettrofotometro a una lunghezza d'onda pari a 600 nm.
- Inserire le cuvette una alla volta secondo il seguente ordine: bianco, standard 1, standard 2, standard 3, standard 4, diluizione 1, diluizione 2 e leggerne il valore di densità ottica.
- Per ottenere una conta il più possibile precisa, preparare almeno 2 o 3 cuvette per ciascun campione, misurare la densità ottica di ciascuna e calcolare la media dei valori.
- Su un foglio di carta millimetrata riportare in un grafico i valori di la densità ottica e il numero di cellule per unità di volume dei campioni standard, determinato con uno degli altri metodi di conta.
- Tracciare la curva standard (una retta) unendo i punti.
- Riportare il valore di la densità ottica delle diluizioni del campione a concentrazione ignota e risalire al numero di cellule per unità di volume usando la curva standard.

#### Osservazioni

- Il procedimento 1 è più semplice da realizzare, ma consente una conta meno accurata. Esso si basa sulla regola "un'  $OD_{600}$  pari a 0,1 è equivalente a circa  $1 \times 10^6$  cellule per ml", valida per per molti ceppi di lievito, ma si tratta di una approssimazione. Per poter contare le cellule in modo più preciso è necessario seguire quanto descritto nel procedimento 2 costruendo una curva standard.

#### Referenze

Wei Xiao. "Yeast Protocols" Humana Press