

La conta dei lieviti tramite l'utilizzo di un vetrino con reticolo

a cura di V. Soglio

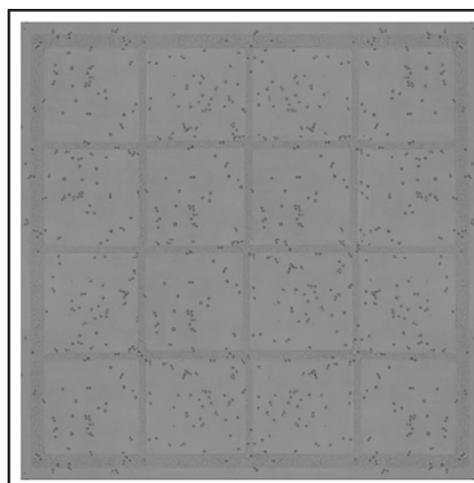
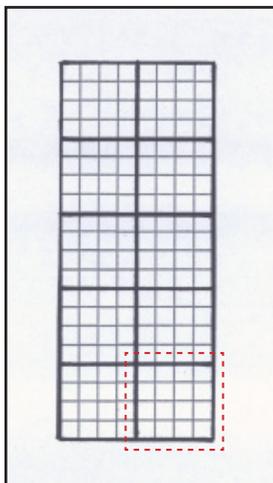
I metodi per determinare il numero di cellule di lievito presenti in una coltura sono molteplici, quello presentato in questo protocollo prevede l'impiego di un vetrino portaoggetto su cui è disegnato un reticolo. Le maglie del reticolo delimitano dei quadrati che individuano le aree entro cui contare le cellule presenti nel volume di campione alloggiato nello spazio, detto camera, che si crea tra portaoggetto e coprioggetto. Questo metodo di conta trova un ampio uso in ambito diagnostico, per esempio per la conta delle cellule in campioni di sangue o urine, o in ambito scientifico per la conta di lieviti, batteri o cellule cresciute in vitro. In commercio esistono diversi tipi di vetrini con reticolo, uno dei più diffusi e noti è chiamato 'camera di Burkner'.

Obiettivo

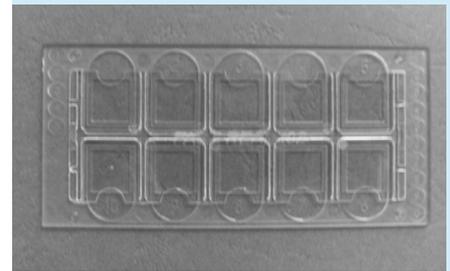
Determinare il numero di cellule di lievito presenti in una coltura utilizzando un vetrino con reticolo.

Procedimento

Il modello di vetrino usato in questo esperimento consente di fare 10 misurazioni, infatti un singolo vetrino ha 10 camerette (vedi immagine a lato del titolo). Ciascuna cameretta ha un reticolo costituito da 10 quadrati di lato 1 mm (tratteggio rosso nella figura sotto a sinistra). L'immagine a destra mostra come appare lo stesso quadrato di lato 1 mm al microscopio ottico.



1. Pesare 1 g di lievito in polvere e scioglierlo in 10 ml di acqua del rubinetto o di terreno liquido YPD (vedi protocollo 'Preparare il terreno di coltura per i lieviti').
2. Preparare una diluizione seriale come descritto nel protocollo 'Preparazione di una coltura di lieviti'.
3. Trasferire 7 μ l della diluizione 3 o della diluizione 4 all'interno della cameretta.
4. Posizionare il vetrino con reticolo sotto il microscopio ottico.
5. Contare le cellule che si trovano all'interno di un quadrato di lato 1 mm (riquadro rosso tratteggiato nella figura sopra).



Tempo previsto

30 minuti

Materiali e reagenti

- ✓ Bustina di lievito in polvere (acquistabile al supermercato)
- ✓ Acqua del rubinetto
- ✓ Terreno liquido YPD
- ✓ Vetrino con reticolo modello
- ✓ Provette da 15 ml

Strumentazione

- ✓ Bilancia
- ✓ Micropipetta con relativi puntali
- ✓ Microscopio ottico

6. Per ottenere una conta il più possibile precisa, contare le cellule presenti in almeno 3 quadrati e calcolare la media dei valori.

numero cellule contate x fattore per riportare la conta a 1 μ l x fattore di diluizione

7. Per calcolare il numero di cellule presenti nella coltura di partenza è necessario tener conto di alcuni parametri tra cui il fattore di diluizione, usando la seguente formula.

Il quadrato al cui interno si contano le cellule ha un lato di 1 mm, lo spessore tra vetrino portaoggetto e coprioggetto è di 0,1 mm, perciò il volume è di 0,1 μ l. Il fattore per riportare la conta a 1 μ l è 10, infatti 0,1 μ l x 10 = 1 μ l.

Esempio: la diluizione usata per la conta delle cellule è la diluizione 3, nel quadrato di lato 1 mm sono presenti 174 cellule, quante cellule per μ l ci sono nella coltura di partenza preparata come descritto al punto 1?

$$174 \times 10 \times 10^3 = 17,4 \times 10^5$$

La coltura di partenza contiene 17,4 x 10⁵ cellule per μ l.

Osservazioni

- La preparazione delle diluizioni è necessaria in quanto il campione sarebbe troppo concentrato e non consentirebbe di distinguere chiaramente le singole cellule e di contarle agevolmente.
- Oltre alla tradizionale camera di Burker, in commercio esistono diversi modelli di vetrini con reticolo per la conta delle cellule, quello illustrato in questo protocollo è il FAST-READ 102.