

La colorazione con blu di metilene per valutare la sopravvivenza dei lieviti a diverse temperature

a cura di V. Soglio

Saccharomyces cerevisiae, il lievito più comunemente usato nei laboratori di ricerca, cresce in modo ottimale dividendosi ogni 90 minuti se posto in un terreno di coltura ricco (vedi protocollo 'Preparare il terreno di coltura per i lieviti') e a una temperatura di 28-30°C. Esporre i lieviti a temperature elevate anche per un breve intervallo di tempo può comprometterne la sopravvivenza. Nell'esperimento riportato in questo protocollo si osserva questo fenomeno usando un colorante, il blu di metilene, che consente di discriminare le cellule vive da quelle morte.

Obiettivo

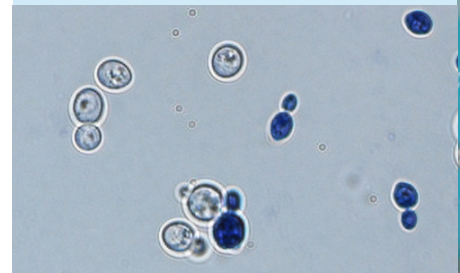
Verificare la sopravvivenza dei lieviti a diverse temperature attraverso la colorazione con blu di metilene e l'osservazione al microscopio ottico.

Procedimento

1. Numerare 3 provette da 1,5 ml e trasferire in ciascuna 300 µl di terreno liquido YPD (vedi protocollo 'Preparare il terreno di coltura per i lieviti').
2. Toccare con uno stuzzicadente una colonia di lievito cresciuta su una piastra di terreno solido YPD e stemperare in una delle provette preparate.
3. Dopo aver chiuso la provetta miscelare il contenuto usando il vortex o invertendo più volte.
4. Ripetere la procedura descritta al punto 2 e 3 per le altre 2 provette preparate.
5. Incubare per 10 minuti la provetta 1 a 30°C, la provetta 2 a 50°C, la provetta 3 a 95°C.
6. Trasferire una goccia della coltura della provetta 1 su un vetrino portaoggetto.
7. Aggiungere una goccia di blu di metilene, miscelare con uno stuzzicadente e coprire con un vetrino coprioggetto.
8. Ripetere la procedura descritta ai punti 6 e 7 anche per le provette 2 e 3.
9. Lasciare i vetrini a temperatura ambiente per 5-10 minuti e osservarli al microscopio.
10. Contare le cellule colorate di blu e determinare la percentuale di sopravvivenza a quella temperatura.

Osservazioni

- Il blu di metilene entra per diffusione all'interno delle cellule di lievito e di conseguenza tutte le cellule si colorano di blu. Non appena le cellule vitali percepiscono la presenza del colorante si attivano per espellerlo, mentre le cellule morte, in cui tutti i processi metabolici sono ormai spenti, non mostrano alcuna risposta. Al microscopio si può valutare la vitalità delle cellule in base al colore: quelle trasparenti sono vive, mentre quelle blu sono morte.



Tempo previsto

1 ora

Materiali e reagenti

- ✓ Piastra di terreno solido YPD su cui sono cresciute colonie di lievito
- ✓ Terreno liquido YPD
- ✓ Provette da 1,5 ml
- ✓ Stuzzicadenti (sterili)
- ✓ Vetrini porta e copri oggetto
- ✓ Soluzione di blu di metilene in acqua allo 0,05%
- ✓ Pipette pasteur

Strumentazione

- ✓ Blocchetto termostato o bagnetto
- ✓ Microscopio ottico
- ✓ Vortex (facoltativo)

Le figure riportate di seguito mostrano i risultati dell'esposizione delle colture di lievito a diverse temperature. Sono immagini acquisite al microscopio ottico a ingrandimento 40x.

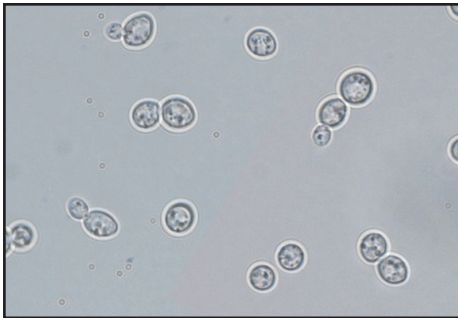


Figura 1
Coltura di lieviti incubata a 30°C: tutte le cellule sono trasparenti (vive).

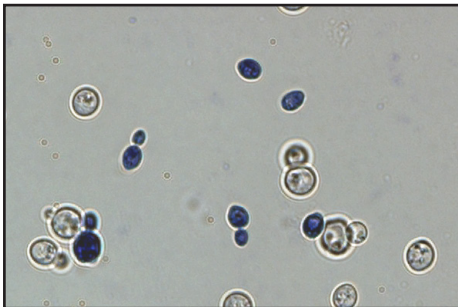


Figura 2
Coltura di lieviti incubata a 50°C: si osservano sia cellule trasparenti (vive) che cellule blu (morte), la sopravvivenza è circa del 50%.

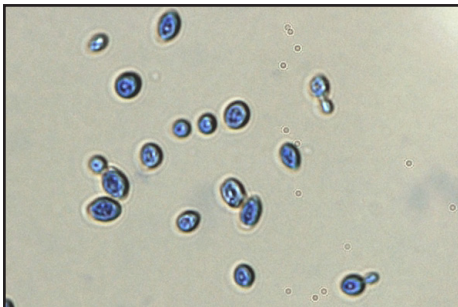


Figura 3
Coltura di lieviti incubata a 95°C: tutte le cellule sono blu (morte), la sopravvivenza è pari a 0.