

La conta su piastra per valutare la sopravvivenza dei lieviti a diverse temperature

a cura di V. Soglio

Il lievito, in particolare il ceppo più diffusamente usato nei laboratorio di ricerca, Saccharomyces cerevisiae, è un organismo unicellulare eterotrofo che cresce in modo ottimale se viene tenuto alla temperatura di 28-30°C. In particolare a questa temperatura e in un terreno di crescita ricco, come il YPD, le cellule di lievito si dividono ogni 90 minuti. Esporre i lieviti a temperature elevate anche per un breve intervallo di tempo può comprometterne la sopravvivenza. Nell'esperienza riportata si può osservare questo fenomeno valutando la crescita dei lieviti su piastra dopo aver incubato la coltura a 30°C, 50°C o 95°C.

Obiettivo

Verificare la sopravvivenza dei lieviti a diverse temperature attraverso la crescita su piastra.

Procedimento

1. Numerare 3 provette da 1,5 ml e trasferire in ciascuna 300 µl di terreno liquido solido 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 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. Preparare 3 provette, denominate dil.1, dil.2, dil.3, contenenti ognuna 1 ml di terreno liquido YPD.
7. Trasferire 5 µl della coltura contenuta nella provetta 1 nella provetta dil.1 e miscelare usando il vortex o invertendo più volte.
8. Ripetere quanto descritto al punto 6 anche per le provette 2 e 3.
9. Usando un'ansa a L, piastrare 20 µl della coltura contenuta nella provetta dil.1 su una piastra con terreno solido YPD (vedi protocollo 'Preparare il terreno di coltura per i lieviti').
10. Procedere in modo analogo per le colture delle provette dil.2 e dil.3.
11. Porre le piastre a 30°C per una notte o a temperatura ambiente per due giorni o fino a quando le singole colonie diventano visibili.

Osservazioni

- Il passaggio di diluizione (punti 6, 7, 8) delle colture, dopo averle incubate all'opportuna temperatura e prima di piastrarle, permette di ottenere colonie ben visibili, distinguibili l'una dall'altra e facili da contare.
- Quando delle cellule vive di lievito sono trasferite su una piastra con terreno



Tempo previsto

50 minuti

Materiali e reagenti

- ✓ Piastra di terreno solido YPD su cui sono cresciute colonie di lievito
- ✓ Terreno liquido YPD
- ✓ Piastre con terreno solido YPD
- ✓ Provette da 1,5 ml
- ✓ Anse a L (sterili)
- ✓ Stuzzicadenti (sterili)

Strumentazione

- ✓ Blocchetto termostato o bagnetto
- ✓ Vortex (facoltativo)
- ✓ Micropipette e relativi puntali

solido iniziano a dividersi e ciascuna di esse dà origine a una colonia. A parità di volume piastrato, se compaiono numerose colonie significa che molte cellule della coltura di partenza erano vitali, mentre se sulla piastra non si formano colonie significa che l'esposizione a quella determinata temperatura è stata per loro letale.

Le figure riportate sotto mostrano i risultati dell'esposizione delle colture di lievito a diverse temperature.



Figura 1

Piastra su cui è stata trasferita un'aliquota della coltura di lieviti incubata a 30°C: si notano numerose colonie.



Figura 2

Piastra su cui è stata trasferita un'aliquota della coltura di lieviti incubata a 50°C: rispetto alla piastra della figura precedente si nota una diminuzione del numero di colonie.



Figura 3

Piastra su cui è stata trasferita un'aliquota della coltura di lieviti incubata a 95°C: si nota l'assenza di colonie.