

La conta dei lieviti tramite la crescita su piastra

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 conta delle colonie che crescono dopo aver trasferito un'aliquota di coltura su piastra con terreno solido. Questo metodo si basa sul paradigma "una cellula, una colonia": da una singola cellula si originano per divisione diverse centinaia di cellule identiche che formano una colonia visibile a occhio nudo. La conta delle colonie su piastra è abitualmente usata anche per i batteri.

Obiettivo

Determinare il numero di cellule di lievito presenti in una coltura contando le colonie cresciute su piastra.

Procedimento

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. Usando un'ansa a L, piastrare 20 µl della diluizione 3 o della diluizione 4 su una piastra con terreno solido YPD (vedi protocollo 'Preparare il terreno di coltura per i lieviti').
4. Porre la piastra a 30°C per una notte o a temperatura ambiente per due giorni o fino a quando le colonie iniziano a essere visibili.
5. Contare quante colonie sono cresciute su una piastra.
6. Per ottenere una conta il più possibile precisa, preparare almeno 2 o 3 piastre per ogni diluizione, contare le colonie e calcolare la media dei valori.
7. Per calcolare il numero di cellule presenti nella coltura di partenza è necessario tenere conto di alcuni parametri tra cui il fattore di diluizione, usando la seguente formula.

$$\text{numero colonie} \times \text{fattore di diluizione} \times \frac{1}{\text{volume piastrato}} \times \text{volume della coltura di partenza}$$

Esempio: sulla piastra in cui sono stati piastrati 20 µl (= 0,02 ml) della diluizione 3 sono cresciute 164 colonie, quante cellule sono presenti nella coltura di partenza preparata come descritto al punto 1?

$$164 \times 10^3 \times \frac{1}{0,02 \text{ ml}} \times 10 \text{ ml} = 8,2 \times 10^7$$

La coltura di partenza contiene $8,2 \times 10^7$ cellule.



Tempo previsto

30 minuti

Materiali e reagenti

- ✓ Bustina di lievito in polvere (acquistabile al supermercato)
- ✓ Acqua del rubinetto o terreno liquido YPD
- ✓ Piastre con terreno solido YPD
- ✓ Anse a L (sterili)
- ✓ Provette da 15 ml

Strumentazione

- ✓ Bilancia
- ✓ Micropipetta con relativi puntali