COLORAZIONE AL BLU DI METILENE

Obiettivo
Il metodo serve a dare una stima della percentuale di cellule vive in un campione di lievito

Principio
Le cellule vive contengono enzimi capaci di ridurre il blu di metilene in un composto incolore. Quando le cellule sono immerse nel blu di metilene, quest'ultimo penetra nelle cellule e gli enzimi delle cellule viventi lo decolorano. Le cellule morte, all'interno delle quale gli enzimi sono inattivi, non reagiscono e la colorazione rimane blu. La percentuale di cellule incolori dà una stima della vitalità cellulare di una coltura.

Preparazione dei reattivi
I reattivi sono blu di metilene e citrato di sodio diidrato. Dissolvere il blu di metilene (10 mg) in 10 ml di acqua distillata. Aggiungere 2 g di citrato di sodio ed agitare fino alla completa dissoluzione dei sali. Filtrate su carta e diluire il filtrato in 100 ml di acqua distillata.

Materiale
Microscopio, vetrini e coprivetrini

Procedura
Miscelare la soluzione colorante con un volume uguale di una sospensione di lievito da analizzare. Mettere una goccia della sospensione su un vetrino da microscopio. La concentrazione di cellule deve essere compresa tra 40 e 60 cellule per ogni campo, utilizzando un ingrandimento di 600 X.
Esaminare circa 1000 cellule, tenendo in considerazione soltanto le gemme con dimensione superiore alla metà della cellula madre.

Risultati
Calcolare la percentuale di cellule non colorate, che equivale alla vitalità della coltura

Note
I metodi di colorazione utilizzati per la valutazione della vitalità sono implicitamente meno precisi di quelli che permettono la valutazione delle cellule in grado di riprodursi. E' importante ricordare che il metodo al blu di metilene misura la presenza di enzimi particolari e che questi enzimi possono essere presenti in cellule incapaci di riprodursi oppure che esse, pur presenti possono non essere in grado di reagire con il colorante.
L'esperienza ha mostrato che l'affidabilità del metodo è inversamente proporzionale alla percentuale di cellule vive presenti in un campione. Se, quindi, il metodo al blu di metilene ha il vantaggio di essere molto rapido, è necessario sottolineare che esso dà una stima della vitalità e non un valore assoluto, per ottenere il quale bisogna ricorrere ad altre metodiche.

Bibliografia :
1. EBC Yeast Group, Journal of the Institute of Brewing, 1962, 68, 14
2. Rocken, W., and Strauss, M. Monatsschrift für Brauerei, 1976, 5, 209