

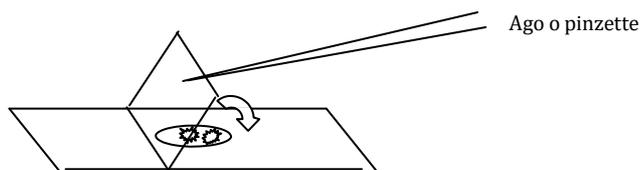
LABORATORIO di BIOLOGIA CELLULARE

“La microscopia ottica e l'osservazione delle cellule”

Osservazione di cellule "a fresco"

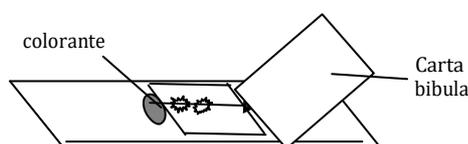
Con questo termine si intende l'osservazione di cellule sopravvivenenti, preparate in modo tale da poter essere facilmente osservate al microscopio ottico.

In generale l'oggetto da osservare viene posto al centro di un vetrino portaoggetti, in una goccia d'acqua (o di soluzione salina isotonica per alcune preparazioni di cellule animali) e coperto con un vetrino coprioggetti, adagiato sulla goccia con attenzione, in modo da evitare la formazione di bolle d'aria.



L'osservazione va sempre **iniziata con un obiettivo a basso ingrandimento**. Una volta scelta la zona da osservare e messo bene a fuoco il microscopio, passare ai successivi ingrandimenti, regolando ogni volta fuoco, illuminazione e diaframma di contrasto.

Dopo aver osservato la preparazione può essere interessante colorarla, facendo penetrare tra i due vetrini una soluzione di qualche colorante (per esempio blu di metilene all'1%).



Per fare questo, porre con una pipetta una piccola goccia della soluzione di colorante sul margine del vetrino coprioggetti e aiutare la diffusione del colorante tra i due vetrini assorbendo un po' del liquido dal lato opposto con un pezzetto di carta assorbente.

Osserviamo cellule appartenenti ad organismi diversi.

CELLULE PROCARIOTICHE

Le cellule procariotiche hanno generalmente dimensioni comprese tra 0.5 e 2 μm .

1. Batteri dello yogurt

Lo yogurt rappresenta una coltura di batteri certamente non patogeni facile da procurarsi e quindi molto adatta per un'esercitazione. Negli yogurt in commercio i batteri più frequentemente presenti sono il *Lactobacillus bulgaricus* e lo *Streptococcus thermophilus*.

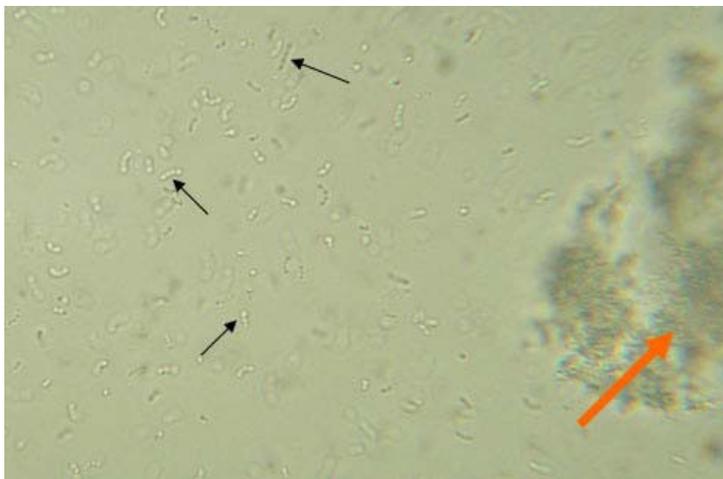
Procedimento

Diluire una piccola quantità di yogurt con acqua di rubinetto. Osservare al microscopio, a forte ingrandimento.

Osservazione

Si osserveranno batteri (freccie nere) di forme diverse (bacilli, cocchi, a volte riuniti in catenelle) riconoscibili per costanza di forme e dimensioni, tra fiocchi di caseina coagulata (freccia rossa).

Un'eventuale colorazione con blu di metilene farà spiccare i batteri in azzurro scuro, mentre i coaguli di caseina resteranno pressoché non colorati.



CELLULE EUCARIOTICHE

Le cellule eucariotiche hanno generalmente dimensioni comprese tra i 20 e i 50 μm .

1. Organismi Unicellulari: lievito

Il lievito di birra (*Saccharomyces cerevisiae*) è un fungo unicellulare, utilizzato per la produzione della birra e per la panificazione. Si trova facilmente in commercio.

Procedimento

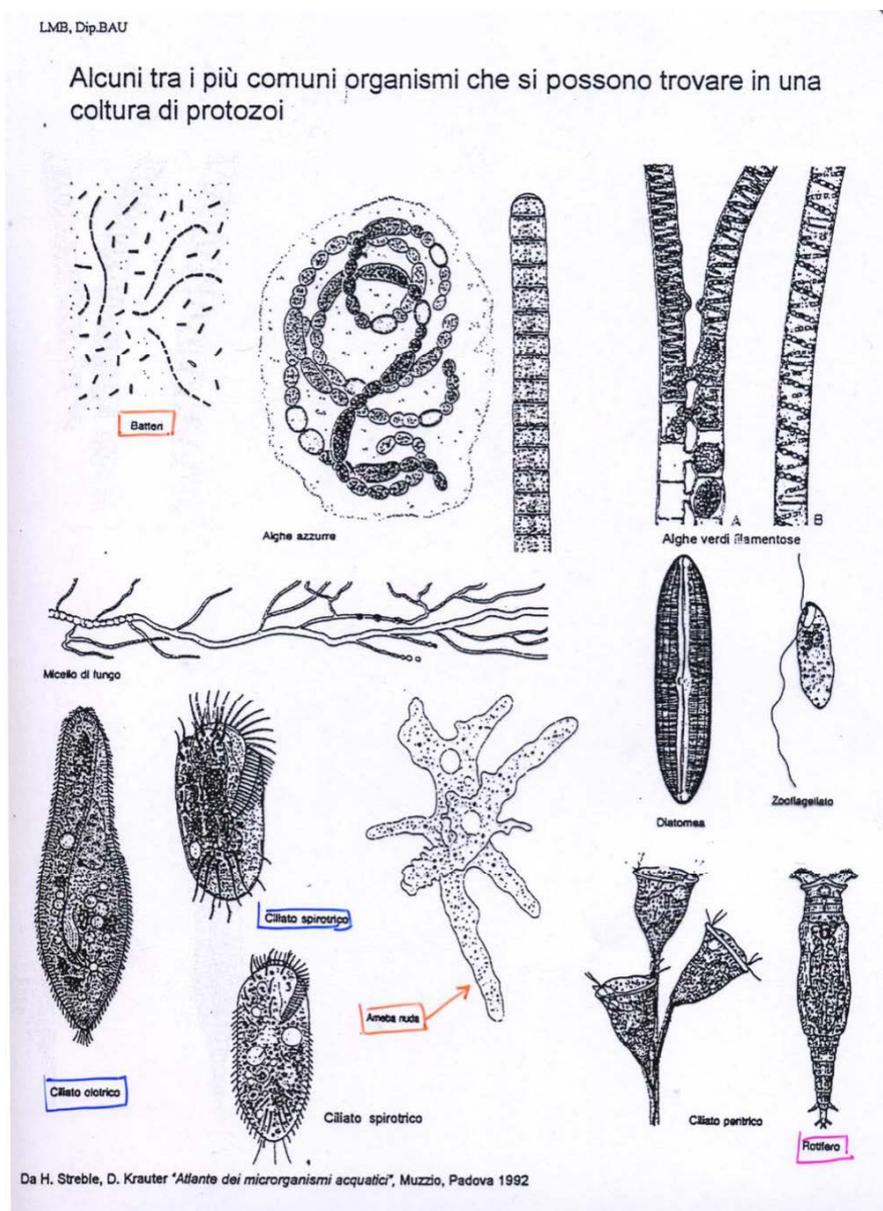
Prelevare un piccolo frammento (grande come un chicco di caffè) da un panetto di lievito, metterlo in pochi ml d'acqua di rubinetto in una piccola beuta o provetta e, con una forte agitazione, preparare una sospensione, di cui osservare una goccia.

Osservazione

Le cellule del lievito sono molto piccole, a forte ingrandimento si intravede un vacuolo ed il nucleo.

2. Organismi Unicellulari: protozoi

Per preparare una coltura di protozoi, riempire d'acqua un recipiente a bocca larga e aggiungere qualche goccia di latte, in modo da ottenere una soluzione appena opalescente. Aggiungere acqua, fanghiglia, foglie marcescenti provenienti da uno stagno o una fontana. Il latte offrirà il nutrimento per una rapida crescita batterica, che a sua volta rappresenterà il nutrimento per una grande diversità di protozoi. La tavola acclusa mostra alcuni degli organismi più frequenti in questo tipo di colture.



Procedimento

Prelevare una goccia dalla coltura, preferibilmente dalla patina superficiale o dal fondo, per avere una maggiore ricchezza di organismi. Non è consigliabile alcuna colorazione.

Osservazione

Si osserverà una grande varietà di organismi, in gran parte unicellulari, ma anche coloniali, come molte alghe azzurre, o pluricellulari, come i funghi e i rotiferi. Il calore della sorgente di illuminazione provocherà il riscaldamento e il disseccamento della goccia di coltura e la morte dei suoi abitanti.

La fagocitosi

Si può osservare la fagocitosi da parte dei protozoi somministrando loro lieviti colorati facilmente riconoscibili all'interno dei vacuoli di endocitosi.

Procedimento

Aggiungere ad un piccolo volume di coltura di protozoi qualche goccia di una sospensione di lieviti colorati con Rosso Congo (il Rosso Congo è un colorante e insieme un indicatore che passa dal rosso vivo, in ambiente neutro, al blu, in ambiente acido).

Osservazione

Dopo qualche minuto si osserveranno, nei grossi protozoi ciliati, vacuoli di fagocitosi contenenti lieviti colorati in rosso vivo. Con il passare del tempo il colore dei lieviti fagocitati passerà al blu scuro, a causa dell'acidificazione dell'ambiente acido del vacuolo.

3. Organismi pluricellulari: cellule vegetali

Una delle preparazioni più facili di cellule vegetali (di solito di dimensioni maggiori rispetto a quelle animali) si ottiene realizzando una "spellatura" ossia la separazione dello strato di parenchima superficiale da foglie o bulbi.

Procedimento

Prendere, ad esempio, una cipolla (*Allium cepa*), preferibilmente rossa, e tagliarla in quattro. Dalla superficie dei catafilli distaccare un piccolo lembo del tessuto epidermico, incidendo con un ago e tirando con pinzette sottili. Il frammento prelevato andrà rapidamente deposto in una goccia d'acqua posta sul portaoggetti, evitando il disseccamento. Non occorre colorazione.

Osservazione

Nelle zone ben distese del tessuto isolato si osserveranno cellule di forma poliedrica allungata (come in Fig a), con citoplasma che, nel caso della cipolla rossa, risulta intensamente colorato dai pigmenti caratteristici. Evidenti le pareti cellulari.

La plasmolisi

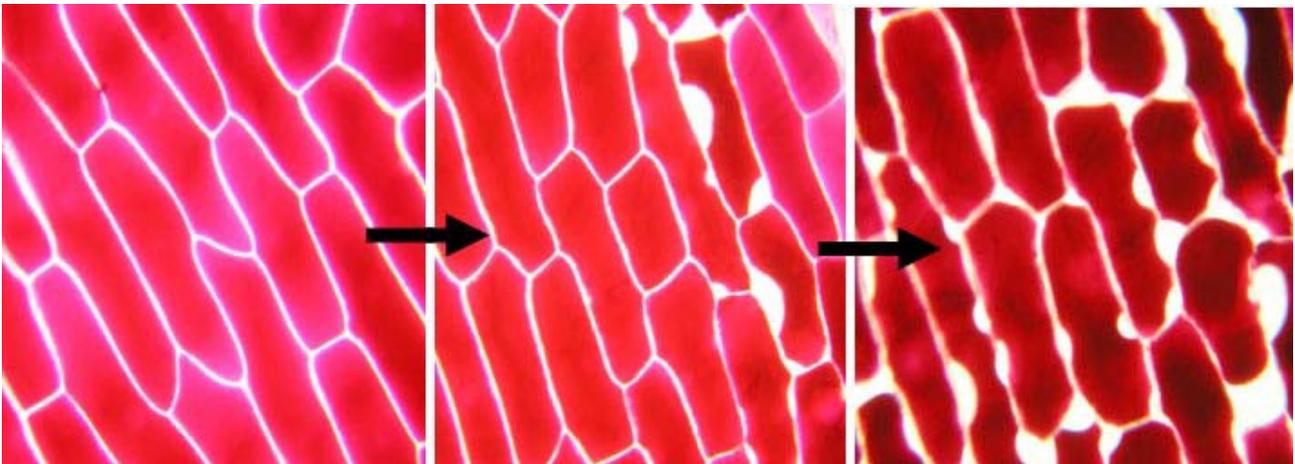
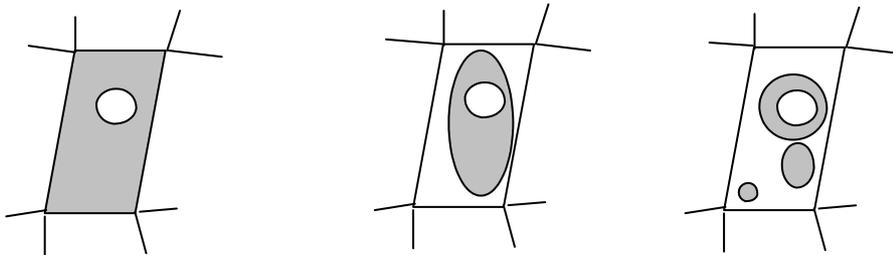
Cellule poste in una soluzione ipertonica perdono acqua per osmosi, dato che la membrana plasmatica (spessore 7.5 nm) si comporta come una membrana semipermeabile. La diminuzione di volume e la deformazione della cellula sono indicate con il termine di plasmolisi.

Procedimento

Preparare cellule dall'epidermide della cipolla, come indicato al punto precedente. Far scorrere tra coprioggetto e portaoggetto una soluzione concentrata di saccarosio (50%).

Osservazione

Si osserverà il "raggrinzirsi" delle cellule, che può arrivare fino alla frammentazione del citoplasma. La parete cellulare, liberamente permeabile al saccarosio, mantiene dimensioni e forma originali la sua rigidità.



a

b

c

E' possibile ripristinare la condizione di partenza aggiungendo sul vetrino una soluzione ipotonica (NaCl 0.2%) o fortemente ipotonica (acqua distillata).

4. Organismi pluricellulari - cellule animali: epitelio mucosa boccale

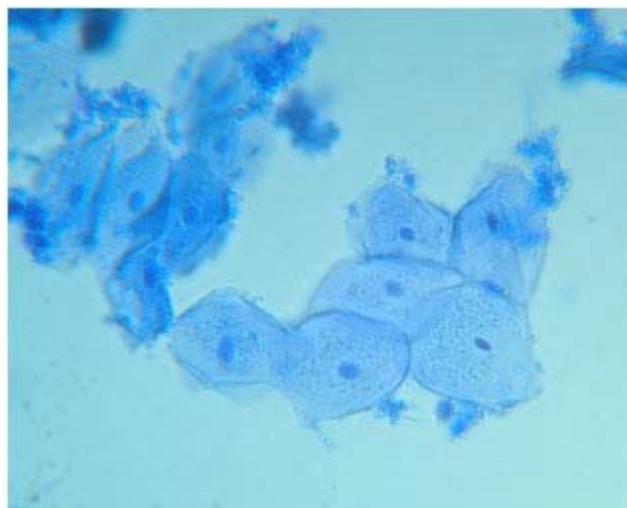
Uno dei pochi esempi di cellule animali preparabili a fresco con grande semplicità è rappresentato dalle cellule di sfaldamento dell'epitelio pavimentoso pluristratificato della mucosa boccale.

Procedimento

Prelevare dalla superficie della propria lingua le cellule di sfaldamento, passando due o tre volte con delicatezza uno stuzzicadenti. Deposare le cellule sopra il vetrino portaoggetti ed aggiungere una goccia d'acqua (o di soluzione salina isotonica, NaCl 0,9%). Osservare le cellule non colorate e poi colorare la stessa preparazione.

Osservazione

Si osserveranno numerosissime cellule appiattite, poligonali, con un piccolo nucleo ben evidente e numerose granulazioni nel citoplasma (foto a sinistra). Queste strutture sono ben colorabili dal blu di metilene (foto a destra).



5. Organismi pluricellulari - cellule animali: epitelio vibratile dei mitili

L'epitelio vibratile, cioè ciliato (ciglia: 0.25 μ m diametro, tra i 5 e i 10 μ m di lunghezza), delle branchie dei molluschi lamellibranchi può essere facilmente esaminato in condizioni di sopravvivenza.

Procedimento

Il materiale più adatto sono le cozze o mitili (*Mytilus galloprovincialis*), che possono essere conservati vivi in frigorifero, avvolti in uno strofinaccio umido, anche per una settimana. Aprire la conchiglia (con un cacciavite piuttosto che con un coltello, per evitare incidenti), facendo attenzione a non versare l'acqua di mare in essa contenuta. Raccogliere quest'acqua in un piccolo recipiente, con una pipetta Pasteur. Le branchie appariranno come delle delicate lamine di color marrone. Prelevarne un piccolo frammento con forbicine e pinzette e deporlo in una goccia d'acqua di mare sul portaoggetti, coprendo con il coprioggetti.

Osservazione

Si osserveranno lunghe file di cellule cubiche o cilindriche (foto a sinistra), munite di lunghe ciglia vibratili (box nella foto a sinistra e ingrandimento nella foto a destra). Notare la sincronia del battito ciliare e il movimento "a campo di grano".

