

Příprava nativního preparátu

Pozorování živých a mrtvých buněk kvasinek

Vitální test

Úvod:

stručně z teorie

Materiál:

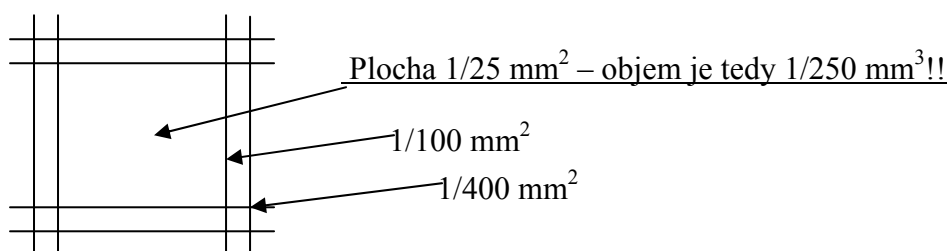
- Erlenmeyerova baňka
- Zkumavky
- Pipety, kapátko
- Krycí a podložní sklíčko
- Sterilní destilovaná voda
- Vodní lázeň, teploměr
- Zásobní kvasinková kultura
- Mikroskop
- Bürkerova komůrka
- Methylenová modř
- Filtrační papír

Postup:

- Připravíme si suspenzi kvasinkových buněk z pekařského droždí: 0.5 ml zásobní kultury kvasinek napipetujeme do 5 ml sterilní destilované vody v Erlenmeyerově baňce
- Z ní pipetujeme po 1 ml suspenze do každé ze 4 zkumavek
- První zkumavka se bude zpracovávat jako startovní vzorek pro zjištění počtu živých buněk při pokojové teplotě při začátku pokusu
- Ostatní zkumavky umístíme do horké vodní lázně (60°C)
- Druhá zkumavka je vytažena po 5 minutách
- Zchladíme studenou vodou
- Třetí po 10ti a poslední po 15ti minutách
- Stanovíme počet živých a mrtvých buněk v jednotlivých zkumavkách a to tak, že do prohlubně Bürkerovy komůrky nanese kapku suspenze a zakryjeme krycím sklem. K okraji krycího sklíčka přikápneme methylenovou modř, na opačné straně ji odsajeme filtračním papírem, až je celý preparát zbarven modře.
- P 2 až 5ti minutách se buňky usadí a mrtvé jsou obarveny modře
- Pozorujeme pod mikroskopem při vhodném zvětšení max 40x10
- Počítáme živé nezbarvené buňky a mrtvé namodralé buňky v deseti čtverečcích
- Buňky ležící na levé a spodní straně do počtu zahrnujeme, na pravé a horní straně ne
- Postup opakujeme pro suspenze kvasinek v jednotlivých časových intervalech pro každou zkumavku
- Zjistíme tak narůstající počet mrtvých nabarvených buněk
- Počet buněk musíme stanovit pro 1 mm³ a z toho následně pro 1 ml!!
- Stanovíme koncentraci buněk v Erlenmeyerově baňce a sestrojíme graf závislost přežívajících kvasinkových buněk na délce doby vystavení zvýšené teplotě

Nákres:

čtvereček Bürknerovy komůrky, rozdělený na další, s jednotlivými údaji dopočtu do 1mm:



Vyhodnocení:

1) Tabulka

Čas (min)	Počet živých b. V 10ti čtvercích	Počet mrtvých b. V 10ti čtvercích	Celkový počet b. v 10ti čtvercích	Procento přežívajících buněk
0				
5				
10				
15				

2) Výpočet celkového počtu buněk v 1 ml:

- vycházíme z 1 mm^3 , (který pak vynásobíme 1000 pro 1 ml)
- k 1 mm^3 se dopravujeme ze součtu všech buněk (živých i mrtvých) z 10-ti počítaných čtverečků (pro dostatečný průměr) a vyděleno zpátky počtem 10ti čtverečků. Toto číslo N (v čase nula je to N_0) následně násobíme 250ti (abychom se dostali k objemu nad čtverečkem a převedli tak mm^2 na mm^3) a následně násobíme 1000 (tak získáme 1ml)

N v deseti čtverečcích = $\boxed{\text{součet buněk živých a mrtvých ve všech čtvercích}}$

Počítá se deset čtverečků, aby byla dostatečná hodnota pro průměrný počet buněk ve čtverečku jednom...

Z toho N v 1 mm^3 = $\boxed{\text{součet buněk živých a mrtvých} / 10} \times \boxed{250}$

(celkový počet z deseti čtverečků dělíme deseti a násobíme objemem; to platí, pokud počítáme z velké plošky; z nejmenší by se násobilo 4000; v násobení je tedy již zahrnuta hloubka 0,1 mm)

N v 1 ml: $\boxed{\text{součet buněk živých a mrtvých} / 10} \times \boxed{250} \times \boxed{1000}$

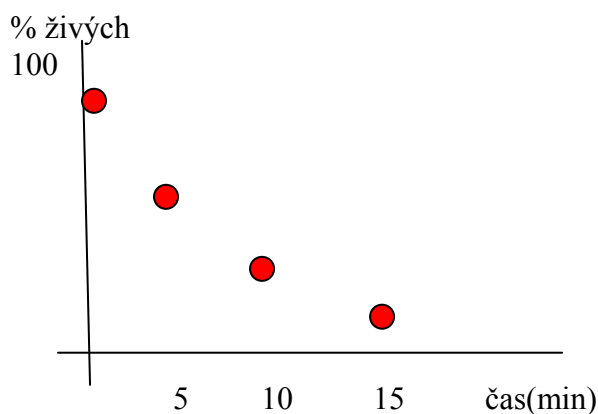
My jsme do zkumavky očkovali 1ml, nenásobíme tedy žádným dalším ředěním. Kdybychom do 5ml vody pipetovali 0,1 ml buněk z Erlenky, násobili bychom ještě 10ti.

3) Vitální test

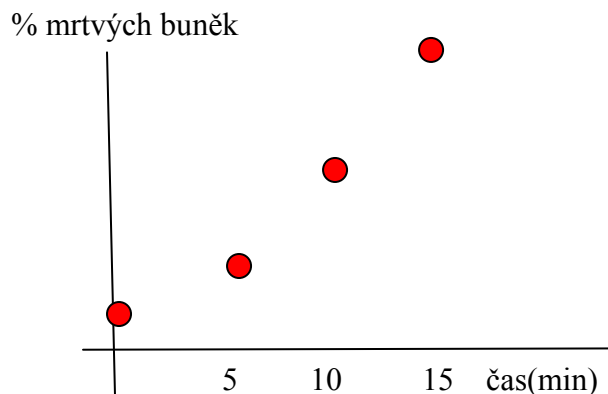
Graf závislosti počtu přežívajících (či naopak mrtvých) kvasinkových buněk na době jejich vystavení zvýšené teplotě

- osa y: čas (minuty)
- osa x: % přežívajících (mrtvých) buněk
- pro každé číslo N v každém čase je potřeba sečíst počty živých (nebo mrtvých) buněk – kolik tvoří % z celkového počtu
- vypočítáme tak pro všechny časové intervaly.

Př: Graf nelineární závislosti (Vy tvoříte v excelu) počtu přežívajících kvasinkových buněk na době jejich vystavení zvýšené teplotě (60°C, intervaly 0, 5, 10 a 15 minut):



Př: Graf závislosti (Vy tvoříte v excelu) počtu mrtvých kvasinkových buněk na době jejich vystavení zvýšené teplotě (60°C, intervaly 0, 5, 10 a 15 minut):

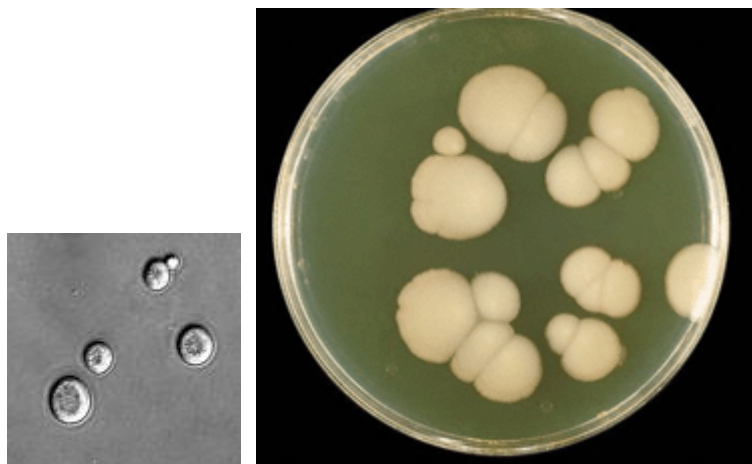


Závěr:

Docházelo k úbytku buněk? Byl plynulý? Byly dobře rozeznatelné mrtvé a živé buňky?

Teoretická část:

Proč určovat % přežívajících buněk? Vitální test má v praxi značný význam při kontrole mikroorganismů během technologického procesu. Sledujeme jejich odpověď (změnu počtu) na přidavek či úbytek různých látek či na fyzikální proces. Buňky použité ve cvičení patří mezi eukaryontní kvasinkové organismy.



Kvasinky:

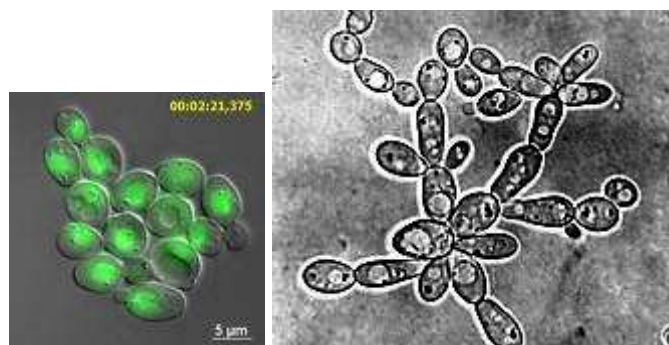
na agaru tvoří větší kolonie než jsou kolonie bakteriální, Gramovým barvením se barví také, a to G+.

Rozlišení mrtvých buněk:

- 1) nepřímé - kultivační test – počítáme **CFU plotnovou metodou**, zdoluhavé, ale přesné
- 2) přímé – test vitality, umožňující zjistit **okamžitý stav populace**

Z výsledků testu vitality lze okamžitě rozhodovat o zasažení do technologického procesu během kultivace buněk. Test je založen na propustnosti membrány mrtvých buněk: cytoplazmatická membrána u mrtvých buněk není semipermeabilní, barvivo se dostává dovnitř. Živé buňky barvivo nepropustí nebo jej odbourají. K barvení se využívá **netoxických barviv**. Roztok methylenové modři je zředěný a pufrovaný fosfátem, pH = 4,6.

Počet buněk stanovujeme např. v B. komůrce, což je skleněná destička podložního skla s počítací mřížkou. Prostor mezi podložním a krycím sklíčkem má u různých komůrek různou hloubku (např. 0,1mm) a je na komůrce vždy vyznačen. Plocha čtverečku je $0,0025 \text{ mm}^2$. Při hloubce komůrky 0,1mm je objem nad každým čtverečkem $0,00025 \text{ mm}^3$, čili $1:4000 \text{ mm}^3$.



Saccharomyces cerevisiae