

Protokol č. 7

Pozorování živých a mrtvých buněk kvasinek

Vitální test

Cíl cvičení:

Bude se jednat o přímé nebo nepřímé stanovení počtu buněk? Stanovujeme počet živých nebo mrtvých buněk? Jak odlišíme živé a mrtvé buňky? Vztahujeme ke známému objemu? Účinek které fyzikální veličiny bude sledován? Jakým způsobem? K čemu slouží časové intervaly?

Teoretická část:

Seznámili jsme se již s nepřímým stanovením počtu buněk plotnovou metodou. Zdlouhavá, ale přesná plotnová metoda umožňuje spočítat pouze **počet živých buněk** – CFU/ml (colony forming units); domluvou bylo stanoveno, že každá z buněk vytváří jednu kolonii.

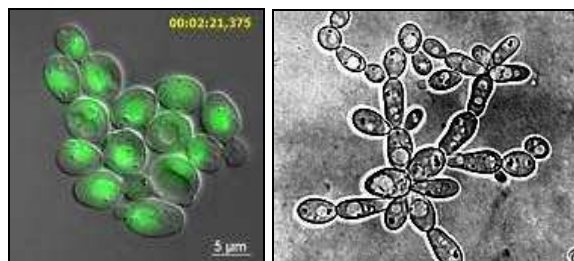
V tomto cvičení se seznámíme s metodou přímého počítání buněk **vitálním testem** = barvením nativního preparátu, která nám umožní rozlišit a spočítat živé a mrtvé buňky a tím zjistit **okamžitý stav populace** sledovaných buněk. Test je založen na propustnosti membrány mrtvých buněk: cytoplazmatická membrána u mrtvých buněk není semipermeabilní, barvivo se dostává dovnitř. Živé buňky se průniku barviva „brání“ svými kanálky v membráně; nepropustí jej tedy nebo jej odbourají. K barvení se využívá **netoxických barviv**. Roztok methylenové modři je zředěný a pufrovaný fosfátem, pH = 4,6.

Takto můžeme sledovat například působení zvýšené teploty na přežívání buněk a vitálním testem (nabarvením mrtvých buněk) sledovat úbytek živých buněk v určitých časových intervalech. Výhodou je rychlost, nízká spotřeba materiálu oproti metodě plotnové a možnost rozlišení poměru živých a mrtvých buněk. Nevýhodou je, že buňky již dál nelze kultivovat.

Proč určovat % přežívajících buněk? Vitální test má v praxi značný význam při kontrole životaschopnosti mikroorganismů během technologického procesu. Sledujeme jejich odpověď (změnu počtu) na přidavek či úbytek různých látek či na fyzikální proces. Z výsledků testu vitality lze okamžitě rozhodovat o zasažení do technologického procesu během kultivace buněk.

Počet buněk stanovujeme např. v Bürkerově nebo Thomově 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. Pracujeme tedy s **určitým objemem vzorku**. Plocha čtverečku je 0,0025 mm². Při hloubce komůrky 0,1mm je objem nad každým čtverečkem 0,00025 mm³, čili 1:4000 mm³. Známe objem vzorku, dopočítáváme většinou do hodnoty 1 ml.

Buňky použité ve cvičení patří mezi **eukaryontní kvasinkové organismy**.



Saccharomyces cerevisiae

Botanicky je řadíme mezi houby – vzhledem k jejich velikosti mezi mikromycety (mikroskopické houby) spolu s plísněmi. Své české jméno dostaly podle schopnosti zkvašovat mono-, di-, nebo trisacharidy na ethanol a CO₂. Kvasinky jsou většinou jednobuněčné organismy rozmnožující se pučením nebo dělením. Na pevných médiích tvoří kolonie a askospory. O kvasinkovitých mikroorganismech hovoříme v případě, pokud se kromě jednotlivých pučících buněk vytváří i vlákna (pravé a nepravé hyfy), které zpravidla netvoří vřetka. Většina má nízkou teplotní odolnost; usmrcuje je 2-5 minutové zahřívání na 56°C, spory jsou nepatrně odolnější.



Kvasinky:

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

Materiál:

- Kvasinková kultura
- Erlenmeyerova baňka, zkumavky
- Pipety, kapátko
- Sterilní destilovaná voda
- Vodní lázeň, teploměr
- 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

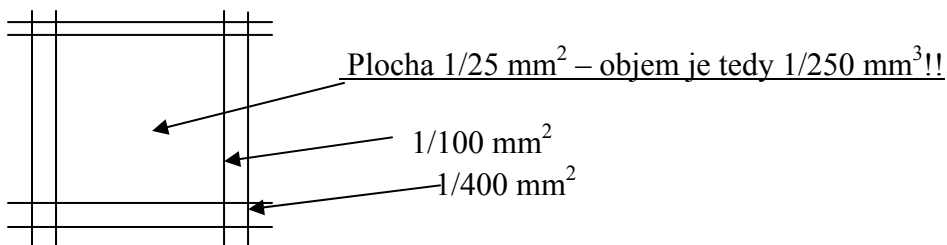
- Třetí po 10ti a poslední po 15ti minutách
- Stanovíme počet živých a mrtvých buněk v jednotlivých zkumavkách a to tak, že do prohlubně Bürkerovy komůrky nanese kapku suspenze a zakryjeme krycím sklem. K okraji krycího sklíčka přikápneme methylenovou modř, na opačné straně ji odsajeme filtračním papírem, až je celý preparát zbarven modře.



- Po 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 Bürkerovy 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	Součet živých a mrtvých buněk v 10ti čtvercích	Procento přežívajících buněk
0				
5				
10				
15				

2) Výpočet celkového počtu buněk v 1 ml vzorku v čase 0 minut

- vycházíme z 1 mm³, údaj pak vynásobíme 1000 pro hodnotu v 1 ml

- k 1 mm³ se dopracujeme ze součtu všech buněk (živých i mrtvých) z 10-ti počítaných čtverečků (pro dostatečný průměr) a vyděleno tímto počtem 10ti čtverečků. Toto číslo následně násobíme 250ti (abychom se dostali k objemu nad čtverečkem a převedli tak mm² na mm³) 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 mm³ = $\boxed{\text{součet buněk živých a mrtvých / 10}} \times \boxed{250}$

(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 pipetovali 1ml, nenásobíme tedy žádným dalším ředěním.

Příklad:

	lab.t./0 min.		60°C/5 min.		60°C/10 min.		60°C/15 min.	
	živé	mrtvé	živé	mrtvé	živé	mrtvé	živé	mrtvé
1	20	1	32	2	43	10	47	12
2	32	5	47	6	25	5	52	30
3	20	3	48	4	35	9	43	34
4	23	4	45	3	31	16	37	16
5	14	4	34	2	32	11	37	20
6	26	5	39	8	38	8	38	25
7	9	2	74	13	38	11	32	23
8	12	3	56	10	44	17	41	29
9	16	2	29	4	40	12	44	25
10	17	5	44	7	39	12	42	25
Celkem	189	34	448	59	365	111	413	239
%	84,75	15,25	88,36	11,64	76,68	23,32	63,34	36,67

Čas (min)	Počet živých b. V 10ti čtvercích	Počet mrtvých b. V 10ti čtvercích	Součet živých a mrtvých buněk v 10ti čtvercích	Procento mrtvých buněk
0	189	34	223	15,25
5	448	59	507	11,64
10	365	11	476	23,32
15	413	239	652	63,34

Výpočet celkového počtu buněk v čase 0 minut

a) N v 1ml v čase 0:

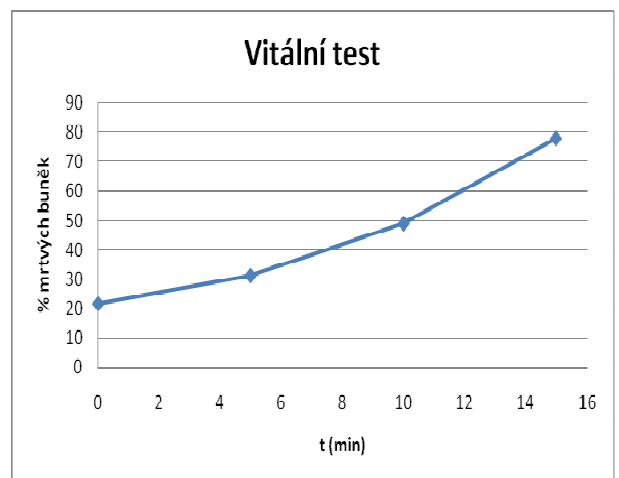
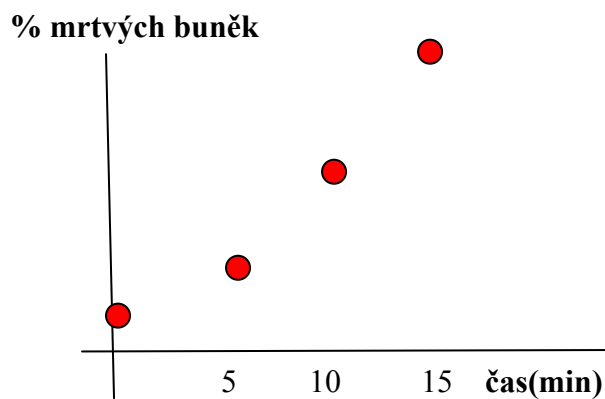
$223/10 \cdot 250 \cdot 1000 = \dots\dots$ buněk v 1 ml

3) Vitální test

Graf závislosti počtu mrtvých kvasinkových buněk na době jejich vystavení zvýšené teplotě

- osa y: čas (minuty)
- osa x: % mrtvých buněk (nebo živých buněk)
- v každém čase je potřeba sečíst počty živých a mrtvých buněk a vypočítat, kolik % tvoří mrtvé buňky z celkového počtu
- vypočítáme tak pro všechny časové intervaly.

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



Závěr:

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