

## 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.

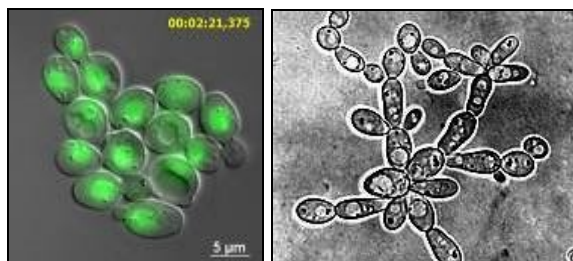
V tomto cvičení se seznámíme s metodou přímého počítání buněk **vitálním testem** = barvením nativního preparátu, která nám umožní rozlišit a spočítat živé a mrtvé buňky a tím zjistit **okamžitý stav populace** sledovaných buněk. Test je založen na propustnosti membrány mrtvých buněk: cytoplazmatická 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 s 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 procento přežívajících buněk? Vitální test má v praxi značný význam při kontrole životaschopnosti mikroorganismů během technologického procesu. Sledujeme jejich odpověď (změnu počtu) na přídavek či úbytek různých látek či na fyzikální proces. Z výsledků testu vitality lze okamžitě rozhodovat o zasažení do technologického procesu během kultivace buněk.

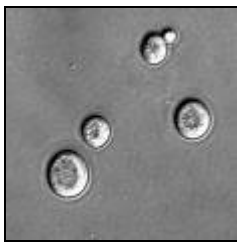
Počet buněk stanovujeme např. v Bürkerově nebo Thomově komůrce, což je skleněná destička podložního skla s počítací mřížkou. Prostor mezi podložním a krycím sklíčkem má u různých komůrek různou hloubku (např. 0,1mm) a je na komůrce vždy vyznačen. Pracujeme tedy s **určitým objemem vzorku**. Plocha čtverečku je 0,0025 mm<sup>2</sup>. Při hloubce komůrky 0,1 mm je objem nad každým čtverečkem 0,00025 mm<sup>3</sup>, čili 1:4000 mm<sup>3</sup>. 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 CO<sub>2</sub>. 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 vřeska. 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 *Saccharomyces cerevisiae* - sbírková a z pekařského droždí
- 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 ve sterilní destilované vodě v Erlenmeyerově baňce
- Z ní pipetujeme po 1 ml suspenze do každé ze 4 zkumavek



- Třetí po 14ti a poslední po 21 minutách

- 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 7 minutách
- Zchladíme studenou vodou

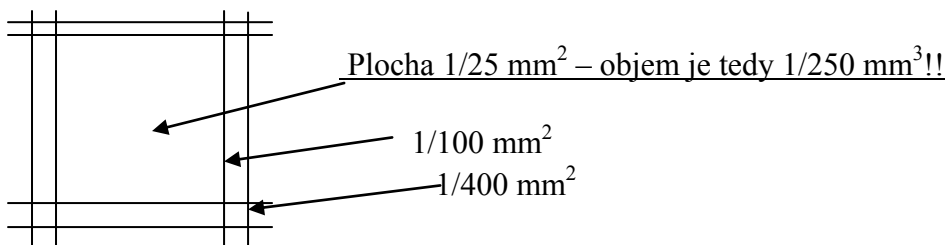
- Stanovíme počet živých a mrtvých buněk v jednotlivých zkumavkách a to tak, že do prohlubně Bürkerovy komůrky nanese kapku suspenze a zakryjeme krycím sklem. K okraji krycího sklíčka přikápneme methylenovou modř, na opačné straně ji odsajeme filtračním papírem, až je celý preparát zbarven modře.



- Po 2 až 5ti minutách se buňky usadí a mrtvé jsou obarveny modře, živé zůstávají nezbarvené, tedy žlutozelené
- Pozorujeme pod mikroskopem při vhodném zvětšení max 40 x 10
- Počítáme živé 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 mm<sup>3</sup> a z toho následně pro 1 ml!!
- Sestrojíme graf závislost přežívajících kvasinkových buněk na délce doby vystavení zvýšené teplotě

### Nákres:

čtvereček Bürkerovy komůrky, rozdělený na další, s jednotlivými údaji dopočtu do 1ml:



### 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  $1 \text{ mm}^3$ , údaj pak vynásobíme 1000 pro hodnotu v 1 ml

- k 1 mm<sup>3</sup> 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 mm<sup>2</sup> na mm<sup>3</sup>) 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<sup>3</sup>** =  $\boxed{\text{součet buněk živých a mrtvých} / 10} \times \boxed{250}$

(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:

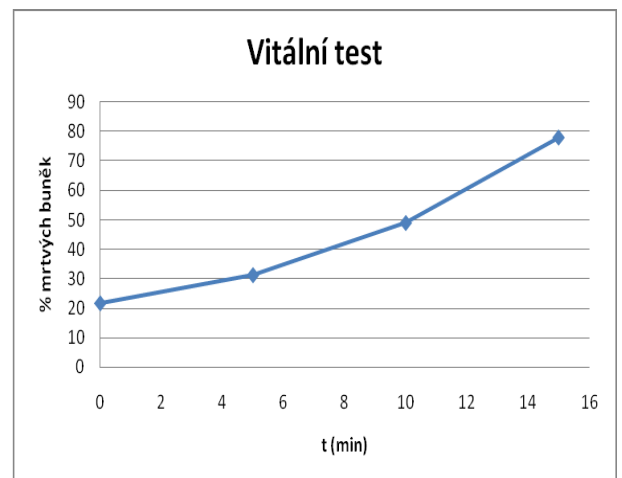
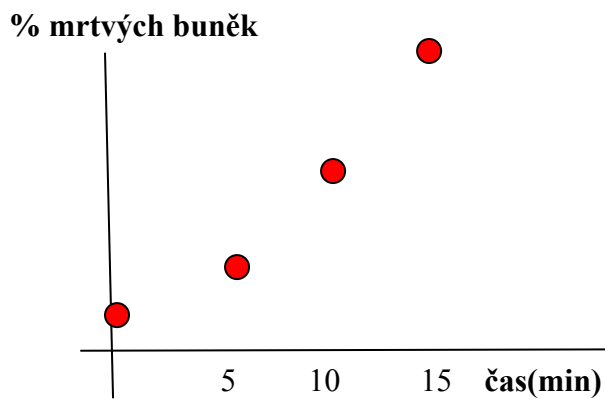
$223/10 \cdot 250 \cdot 1000 = \dots\dots$  buněk v 1 ml

### 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?