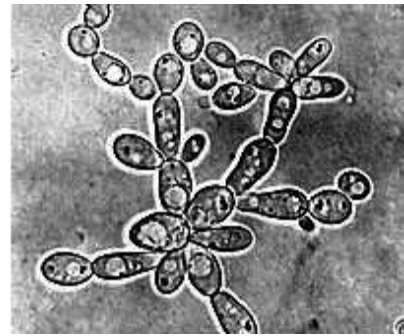


11 Vitální test - Pozorování živých a mrtvých buněk kvasinek

Úvod:

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.



Rozlišení mrtvých buněk:

- nepřímé - kulturační test - počítáme **CFU plotnovou metodou**, zdlouhavé, ale přesné
- přímé - test vitality (**okamžitý stav populace**)

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 mm². Při hloubce komůrky 0,1mm je objem nad každým čtverečkem 0,00025 mm³, čili 1:4000 mm³.

Materiál:

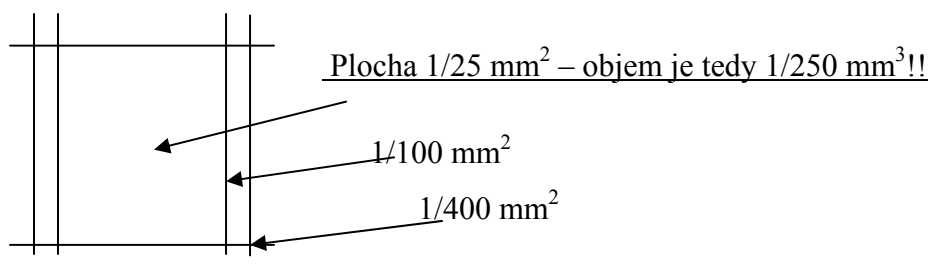
- Erlenmeyerova baňka
- Zkumavky
- Pipety, kapátko
- Krycí a podložní sklíčko
- Sterilní destilovaná voda
- Vodní lázeň, teploměr
- Zásobní kvasinková kultura
- Mikroskop
- Bürkerova komůrka
- Methylenová modř
- Filtrační papír

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 modří, 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

	0 minut		5 minut		10 minut		15 minut	
	*	†	*	†	*	†	*	†
1	160	20	86	7	68	33	33	26
2	107	9	69	11	81	22	24	23
3	117	10	107	10	58	25	35	14
4	112	21	126	13	49	14	39	25
5	120	18	114	12	44	21	46	34
6	136	11	83	17	57	16	28	31
7	164	16	105	18	38	23	20	32
8	175	18	137	20	49	23	20	33
9	160	18	97	8	64	27	25	39
10	135	15	118	19	32	22	19	32
Celkový součet	1386	156	1042	135	540	226	289	289
Procenta	89,9%	10,1%	88,5%	11,5%	70,5%	29,5%	50%	50%

Souhrn:

Čas (min)	Počet živých b. V 10ti čtvercích	Počet mrtvých b. V 10ti čtvercích	Celkový počet b. v 10ti čtvercích	Procento přežívajících buněk	Procento mrtvých buněk
0	1386	156	1542	89,9%	10,1%
5	1042	135	1177	88,5%	11,5%
10	540	226	766	70,5%	29,5%
15	289	289	578	50%	50%

2) Výpočet celkového počtu buněk v 1 ml:

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

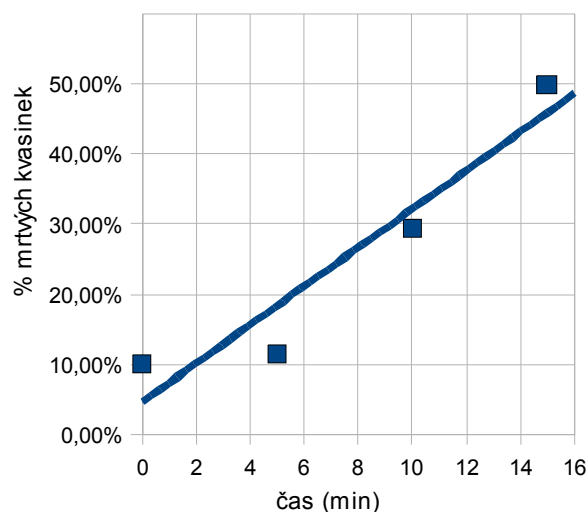
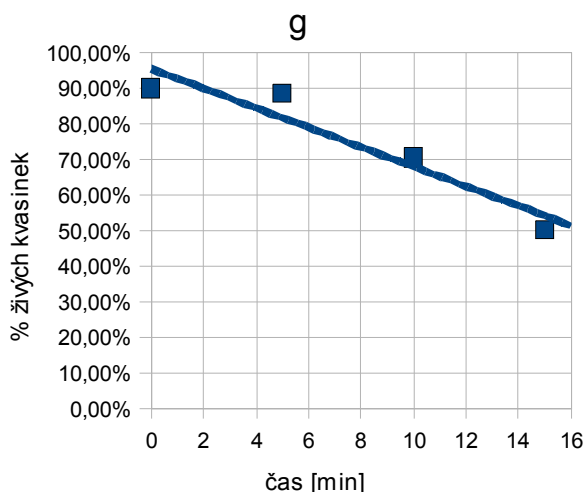
	0 minut	5 minut	10 minut	15 minut
N (celkový počet buněk v 1 ml)	38 550 000	29 425 000	19 150 000	14 450 000

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.

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



Závěr:

Docházelo k plynulému úbytku buněk. Živé a mrtvé buňky byly dobře rozeznatelné díky jejich schopnosti přijímat barvivo.