

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.

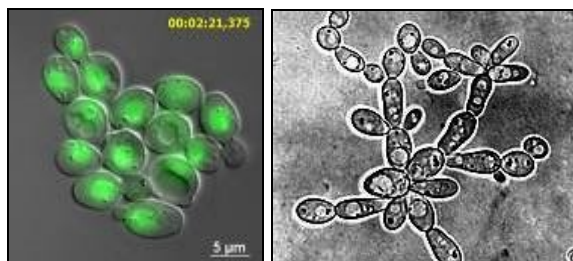
V tomto cvičení se seznámíme s metodou přímého počítání buněk **vitálním testem** = barvením nativního preparátu, která nám umožní rozlišit a spočítat živé a mrtvé buňky a tím zjistit **okamžitý stav populace** sledovaných buněk. Test je založen na propustnosti membrány mrtvých buněk: cytoplazmatická 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. Svě 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 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

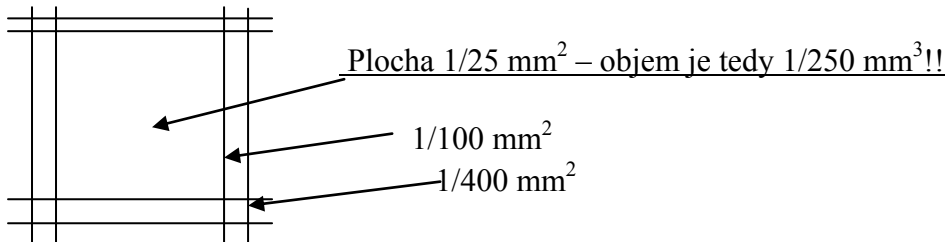
- Stanovíme počet živých a mrtvých buněk v jednotlivých zkumavkách a to tak, že do prohlubně Bürkerovy komůrky nanese kapku suspenze a zakryjeme krycím sklem. K okraji krycího sklíčka přikápneme methylenovou modř, na opačné straně ji odsajeme filtračním papírem, až je celý preparát zbarven modře.



- Po 2 až 5ti minutách se buňky usadí a mrtvé jsou obarveny modře, živé žlutozeleně
- Pozorujeme pod mikroskopem při vhodném zvětšení max 40x10
- 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 mm³ 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 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 mm^3 , 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:

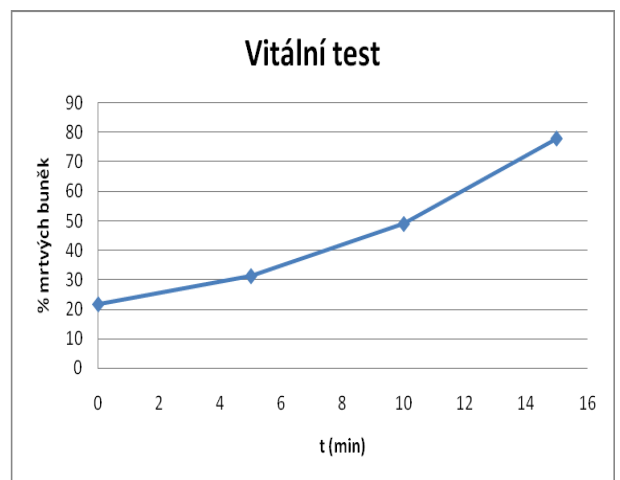
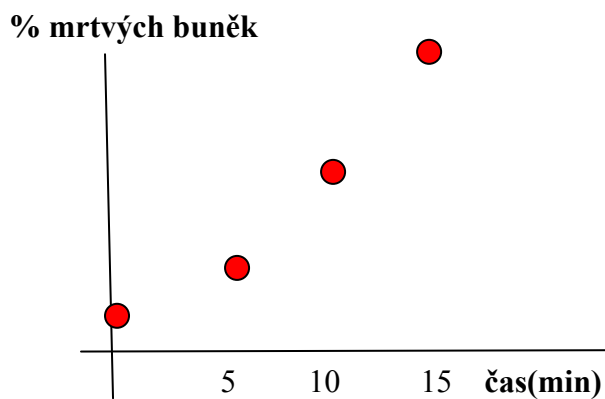
$223/10 \cdot 250 \cdot 1000 = \dots\dots$ buněk v 1 ml

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?