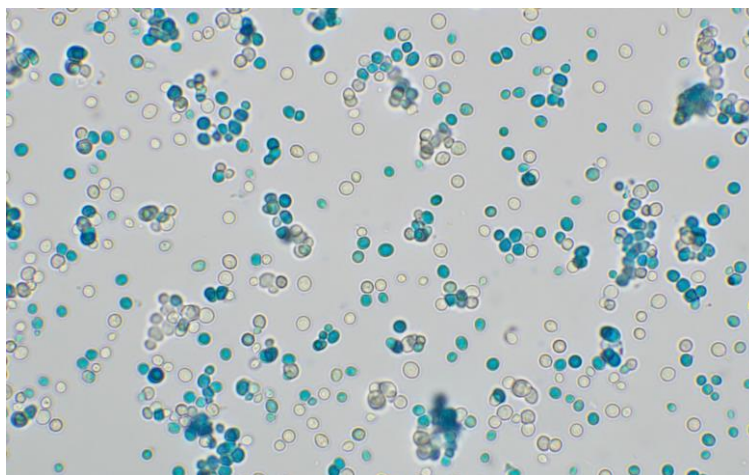


Stanovení vitality/viability buněčné kultury kvasinek použitím methylenové modři

Cíl, teorie:

Nejen pro kultivaci buněk mikroorganismů je důležité určení toho, jestli buňky, se kterými se pracuje jsou vitální/viabilní neboli živé. Stanovení je důležité i při práci s tkáňovými kulturami, ať již z rostlinných nebo živočišných buněk, při práci s protoplasty atd. V laboratorní praxi se k tomuto stanovení poměrně často používá přímé pozorování buněk v mikroskopu, ke kterým se přidá barvivo – methylenová modř, trypanová modř, eosin a barviva.

Připravujeme nativní mikroskopický preparát, kde u malých pozorovaných objektů, jakými jsou buňky kvasinek, můžeme použít postup s prosáváním barviva do mikroskopického preparátu. Postup v tomto případě také můžeme označovat jako postvitální barvení, protože použité barvivo methylenová modř, označuje mrtvé buňky, do kterých se dostává přes cytoplazmatickou membránu. Vitální/viabilní buňky transportují barvivo z buněk, proto zůstávají nezbarvené.



Obr.1: Mikroskopický preparát kultury kvasinek po působení teploty 62°C a barvení methylenovou modří. Zbarvené buňky – odumřelé. [Vymětalová]

Materiál a přístrojové vybavení:

Kultury různých druhů kvasinek ze skupiny hodnocené jako nepatogenní, které se vyskytují v běžně v okolním prostředí – *Saccharomyces cerevisiae*, apod., vortex, míchačka, zkumavky, kádinky 10 ml, 25 ml, pipetman 200 µl se špičkami, optický mikroskop, preparační souprava, podložní skříčka, imerzní olej, pipety, destilovaná voda, roztok methylenové modři, pracovní rukavice, nádoba na odpad

Vlastní pracovní postup

- a) Do zkumavky nebo kádinky napipetujeme 5 – 10 ml destilované vody a kličkou přidáme kulturu kvasinek a vytvoříme suspenzi.
- b) Použijeme vortex nebo míchačku a suspenzi důkladně promícháme.

- c) Odebereme 100 µl a přeneseme na podložní sklíčko.
- d) Překryjeme krycím sklíčkem a vytvoříme mikroskopický preparát.
- e) Ze zásobního roztoku methylenové modři, připravíme v digestoři ředěné barvivo. Pracujeme v rukavicích.
- f) Roztok ředěného barviva připipetujeme ke hraně krycího sklíčka a pomocí filtračního papíru prosajeme barvivo do preparátu.
- g) Mikroskopický preparát pozorujeme v mikroskopu a vyhodnotíme počty živých a odumřelých buněk.

Získané výsledky a vyhodnocení

Do protokolu velmi pečlivě popíšeme výsledky postvitálního barvení zhotoveného preparátu kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. V jednotlivých zorných polích vyhodnotíme počet živých a odumřelých buněk. Postup použijeme pro různé modifikace, můžeme použít počítání v počítací komůrce.

Diskuse a závěr

Zjistíme, s jakými výsledky se setkali další studenti ve skupině, provedeme diskusi.