

Raport z oceny systemu do liczenia komórek drożdży oraz określania ich żywotności – SDM dla Miodosytnictwa

Część I – mikrobiologiczna

Wprowadzenie

Opracowany **System Detekcji Mikroorganizmów dla Miodosytnictwa** to aplikacja która w szybki i łatwy sposób pozwala kontrolować proces fermentacji określając koncentrację i żywotność komórek drożdży poprzez automatyczne ich rozpoznawanie (żywe, martwe) i zliczanie. System składa się z zestawu mikroskopowego (mikroskop optyczny + kamera mikroskopowa + dedykowane oprogramowanie) oraz aplikacji do rejestrowania wcześniej wykonanych i zapisanych obrazów mikroskopowych które są przesyłane na serwer w celu analizy. Następnie przeanalizowane dane wracają do aplikacji i mogą być zaprezentowane jako końcowy wynik badania. Odpowiednie oprogramowanie umożliwia automatyczne określenie stężenia komórek i żywotności (stosunek żywych/martwych) danej populacji drożdży. Aby określić żywotność, komórki drożdży muszą zostać wcześniej zabarwione fioletem metylenowym. Oba parametry (stężenie komórek i żywotność) można mierzyć jednocześnie. Użytkownik otrzymuje wynik, zależnie od stężenia komórek w zawiesinie, w czasie od 30 sek. do max. 3 min.

Materiały i metodyka badań

Określanie stężenia komórek i żywotności różnych szczepów drożdży w celu walidacji działania opracowanego systemu sprawdzono przy użyciu następujących metod:

- Ręczna ocena za pomocą komory Thoma
- Ręczna ocena za pomocą kamery FAST READ 102
- Automatyczna ocena za pomocą SDM dla Miodosytnictwa

W celu przeprowadzenia walidacji ww. metodami do badania wykorzystano 3 szczepy drożdży:

- *Saccharomyces cerevisiae* (Johannisberg M/35)
- *Saccharomyces cerevisiae* (Coobra – miód pitny)
- *Saccharomyces cerevisiae* (Bulldog Mead Yeast & Nutrient)

Ww. szczepy drożdży hodowano na podłożu płynnym YPD (Biosolute®) – hodowla statyczna w temp. 26 °C.

Dla każdego szczepu przygotowano 3 główne hodowle (H1, H2, H3). Do tego celu wykorzystano 100 ml płynnego podłoża YPD umieszczonego w kolbie typu Erlenmeyer

(250 ml), które zaszczepiono 1,2 ml prehodowli (24-godzinnej) danego szczepu. Warunki poszczególnych hodowli:

H1 – 2 dni, inkubacja w temp. 26 °C, ciągłe wytrząsanie przy 80 obr./min.

H2 – 9 dni, inkubacja w temp. 26 °C, ciągłe wytrząsanie przy 80 obr./min.

H3 – 9 dni, inkubacja w temp. 26 °C, ciągłe wytrząsanie przy 80 obr./min., następnie 24h w temp. 37 °C

Hodowla **H3** była hodowlą o obniżonej żywotności. W tym celu po zakończonej inkubacji w temp. 37 °C połowę hodowli przeniesiono do oddzielnego naczynia i poddano procesowi podgrzewania (100 °C, 10 min.) w celu zabicia komórek drożdży. Następnie obie części ponownie zmieszano i poddano dalszym etapom analizy.

Analizę wszystkich szczepów drożdży z poszczególnych hodowli przeprowadzono w płynie Ringera oraz w brzeczce, w celu sprawdzenia wpływu zastosowanej matrycy na wynik badania. Każda hodowla (H1, H2, H3) została poddana analizie z wykorzystaniem zastosowanych metod w 3 powtórzeniach.

Brzeczka miodową przygotowano wg. ogólnodostępnej receptury a następnie poddano procesowi gotowania (warzenia). Tak przygotowana brzeczka była wyjściową matrycą do dalszych analiz.

Komórki drożdży, przed przystąpieniem do analizy wybraną metodą poddano procesowi oczyszczania. W tym celu objętość 45 ml zawiesiny wirowano przez 5 min przy RCF = 1800 x g. Powstały osad zawieszono w wodzie dejonizowanej i ponownie odwirowano.

Przygotowanie zawiesin do analizy:

- **Płyn Ringera**

Po dwukrotnym wirowaniu, komórki drożdży zostały zawieszone w płynie Ringera. Gęstość zawiesiny ustalono na 2×10^8 kom/ml za pomocą densytometru.

- **Brzeczka miodowa**

Po dwukrotnym wirowaniu, komórki drożdży zostały zawieszone w wodzie, a następnie uprzednio przygotowana brzeczka miodowa została nimi zaszczepiona w odpowiedniej ilości. Gęstość zawiesiny ustalono na 2×10^7 kom/ml za pomocą densytometru.

Przygotowanie odczynników do analizy:

- **Fiolet metylenowy 3RAX**

Odczynniki:

- Fiolet metylenowy 3RAX
- 0,1M bufor glicynowy (pH 10,6)
- Woda destylowana

1. Rozpuścić 0,1 g fioletu metylenowego w 100 ml wody destylowanej (np. używając kolby miarowej o poj. 100 ml) -> 0,1% roztwór roboczy.
2. Wymieszać 10 ml r-r roboczego z 90 ml buforu glicynowego -> 0,01% roztwór barwiący gotowy do użycia.

- **Bufor glicynowy**

Odczynniki:

- 1M roztwór NaOH
- Glicyna
- Woda destylowana

1. Rozpuścić 0,75 g glicyny w 70 ml wody.
2. Za pomocą roztworu NaOH oraz przy użyciu pH-metru ustalić pH na 10,6.
3. Uzupełnić objętość do 100 ml wodą destylowaną.

Instrukcja przygotowania próbki do analizy:

1. Rozcieńczenie próbki
 - Pobierz próbkę do badań
 - Rozcieńcz próbkę tak aby w pojedynczym sektorze (najmniejszym kwadracie) komory znajdowało się 10-100 komórek drożdży
 - przygotuj cylinder miarowy (poj. 100 ml) napełniony wodą
 - do próbki typu Falcon (poj. 50 ml) dodaj odpowiednią liczbę wody oraz zawiesiny drożdży tak aby otrzymać pożądane stężenie
 - zakręć i dobrze wymieszaj
 - pobierz 1 ml zawiesiny do próbki typu Eppendorf
 - Jeśli próbka nie wymaga rozcieńczenia pobierz 1 ml zawiesiny i przejdź do kolejnego etapu
2. Barwienie próbki w celu przeprowadzenia testu żywotności
 - Przygotuj statyw i umieść w nim 3 próbki (Eppendorf):
 - próbka z pobraną zawiesiną drożdży do analizy
 - próbka z roztworem fioletu metylenowego 0,01 % (procedura przygotowania w załączniku)
 - pusta próbka
 - Wymieszaj próbkę z roztworem barwiącym w odpowiedniej proporcji (1:1)
 - do pustej próbki dodaj 0,5ml zawiesiny drożdży
 - następnie dodaj 0,5 ml roztworu barwiącego
 - inkubuj 5 min w temp. pokojowej (ok. 25 °C)
3. Przygotowanie preparatu mikroskopowego (kamera FAST READ 102 – 10 próbek)
 - Do wybranej komory (1-10) dodaj pipetą automatyczną ok. 10 µl badanej próbki tak aby wewnątrz komory wypełniło się w całości
 - Umieść kamerę zliczeniową pod mikroskopem, naprowadź na odpowiednią komorę (1-10) i używając obiektywu o pow. 10x lub 20x znajdź siatkę z

składającą się z 10 dużych kwadratów w których znajduje się 16 mniejszych tzw. sektorów

- Zmień powiększenie obiektywu na 40x i wykonaj 10 zdjęć wybranych sektorów (po jednym z każdego dużego kwadratu), tak aby widoczne były krawędzie wybranego sektora oraz znajdujące się w nim komórki drożdży
4. Zapisane zdjęcia z badanej próbki umieść na serwerze, określ podstawowe parametry badanej próbki i poddaj analizie tak aby uzyskać wynik badania.

Kompletne zestawy mikroskopowe wraz z odczynnikami przygotowanymi wg. powyższych procedur oraz opracowane instrukcje i materiały video (w formie elektronicznej) zostały przekazane podmiotom należącym do konsorcjum w celu wykonania dalszych badań własnych.

Krótką charakterystyka użytej metody

• Komora Thoma

Komora Thoma lub inaczej hemocytometr to komora zliczeniowa, która służy do określania liczby komórek poprzez bezpośrednie liczenie pod mikroskopem świetlnym. Komora Thoma to szklana płytka (porównywalna do grubszego szkła mikroskopowego) z czterema podłużnymi rowkami wyciętymi na środku, tak że na środku powstają trzy paski. Paski na zewnątrz są nieco wyższe niż środkowy. Na środkowym pasku znajduje się wytrawiona siatka. Siatkę tę tworzą pionowe i poziome linie wydzielające 16 dużych kwadratów, z których każdy zawiera 16 kwadratów mniejszych o boku długości 0,05 mm. Zatem powierzchnia każdego małego kwadratu wynosi 0,0025 mm². Ponieważ siatkę tworzą prostopadłościany o powierzchni podstawy równej 0,0025 mm² i wysokości 0,1 mm, objętość tego prostopadłościanu wynosi 0,00025 mm³. Znając średnią liczbę komórek badanego drobnoustroju (np. drożdży) określoną na podstawie liczby ich występowania w 80 kolejnych prostopadłościanach (małych kwadratach) można określić stężenie tego drobnoustroju w 1 ml zawiesiny za pomocą określonego wzoru.

$$Ld [kom./ml] = \frac{\sum \text{zliczonych komórek}}{\text{liczba małych kwadratów}} * 4 * 10^6 * DF$$

Ld – całkowita liczba komórek w 1 ml

$4 * 10^6$ – stała przeliczeniowa

DF – rozcieńczenie

Aby określić żywotność populacji drożdży, komórki traktuje się roztworem barwiącym – fioletem metylenowym. Próbkę miesza się w stosunku 1:1 z roztworem fioletem metylenowym i inkubuje w temp. pokojowej przez okres 5 min. Barwnik ten wnika do komórek. Żywe komórki mogą neutralizować barwnik i pod mikroskopem świetlnym wydają się bezbarwne. Natomiast martwe komórki są fioletowe, ponieważ nie mogą

neutralizować barwnika. Licząc wszystkie komórki oraz komórki fioletowe (martwe), można obliczyć żywotność populacji drożdży zgodnie ze wzorem.

$$\text{żywotność [\%]} = 100 - \left(\frac{\text{liczba zliczonych komórek martwych} * 100}{\text{liczba wszystkich zliczonych komórek (żywe + martwe)}} \right)$$

- **Kamera FAST READ 102**

Kamery do badania osadów, elementów morfotycznych oraz zawiesin drobnoustrojów FAST READ 102 wykonane są z PMMA (poli(metakrylan metylu)) tzw. szkło akrylowe. Na każdej płytce znajduje się 10 komór pomiarowych do których wprowadza się badaną próbkę. Na powierzchnię każdej z komór naniesiona jest 10-polowa siatka pomiarowa, co pozwala na dokładne policzenie elementów komórkowych w zawieszynie. Kamery FAST READ 102 cechuje łatwość użytkowania oraz duża dokładność oznaczenia. Sposób wykonania linii siatki zapewnia jednorodny rozkład elementów komórkowych na siatce. Objętość próbki przypadająca na siatkę jest ściśle określona i jednakowa we wszystkich kwadratach.

Na ograniczonym liniami siatki obszarze 2x5 mm wyznaczono 10 kwadratów o boku wynoszącym 1 mm. Z kolei każdy kwadrat o boku 1 mm podzielony jest na 16 kwadratów o boku równym 0,25 mm. Razem daje to 160 małych kwadratów (sektorów) o długości boku 0,25 mm i głębokości 0,1 mm, zatem objętość pojedynczego małego kwadratu wynosi 0,00625 mm³. Korzystając z odpowiedniego wzoru można określić stężenie danego drobnoustroju (np. drożdży) w 1 ml zawiesziny. Aby zwiększyć precyzję oznaczenia, do obliczania średniej ilości komórek w małym kwadracie, zliczono komórki z 80 małych kwadratów (5-ciu dużych).

$$Ld [\text{kom./ml}] = \frac{\sum \text{zliczonych komórek w } N \text{ dużych kwadratach}}{N} * 10^4 * DF$$

Ld – całkowita liczba komórek w 1 ml

10⁴ – stała przeliczeniowa (μl -> ml)

DF – rozcieńczenie

Żywotność populacji drożdży obliczono analogicznie jak w przypadku komory Thoma barwiąc uprzednio komórki fioletem metylenowym oraz wykorzystując powyższy wzór do obliczeń.

- **SDM dla Miodosytnictwa**

Ogólna zasada działania SDM dla Miodosytnictwa została już opisana na początku tego raportu. Zasadniczo automatyzuje on metody manualne, które są stosowane zarówno w komorze Thoma jak również w kamerach zliczeniowych FAST READ 102 z których korzysta SDM. Mikroskopowe obrazy komórek drożdży są przechwytywane i automatycznie oceniane pod kątem stężenia komórek. Komórki barwione fioletem metylenowym można również odróżnić

dzięki zastosowanemu rozpoznawaniu obrazu. Umożliwia to automatyczne określenie ilości martwych komórek, a tym samym obliczenie żywotności populacji drożdży. Obie wartości (całkowita liczba i żywotność) można określić jednocześnie (Rys. 1). Dodatkowo system ma możliwość śledzenia procesu fermentacji wybranego nastawu, a wyniki dostępne są w formie graficznej (Rys. 2, 3 i 4).

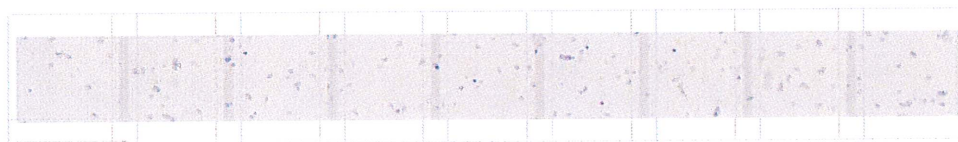
Dane badania

ID Badania: 94
Tytuł: test mcf 10
Kategoria: Miody pitne
Data wykonania: 2024-10-29 16:08
Wykonane przez: Konrad Jamka
Rozcieńczenie: 1:0
Opis: pakiet 3

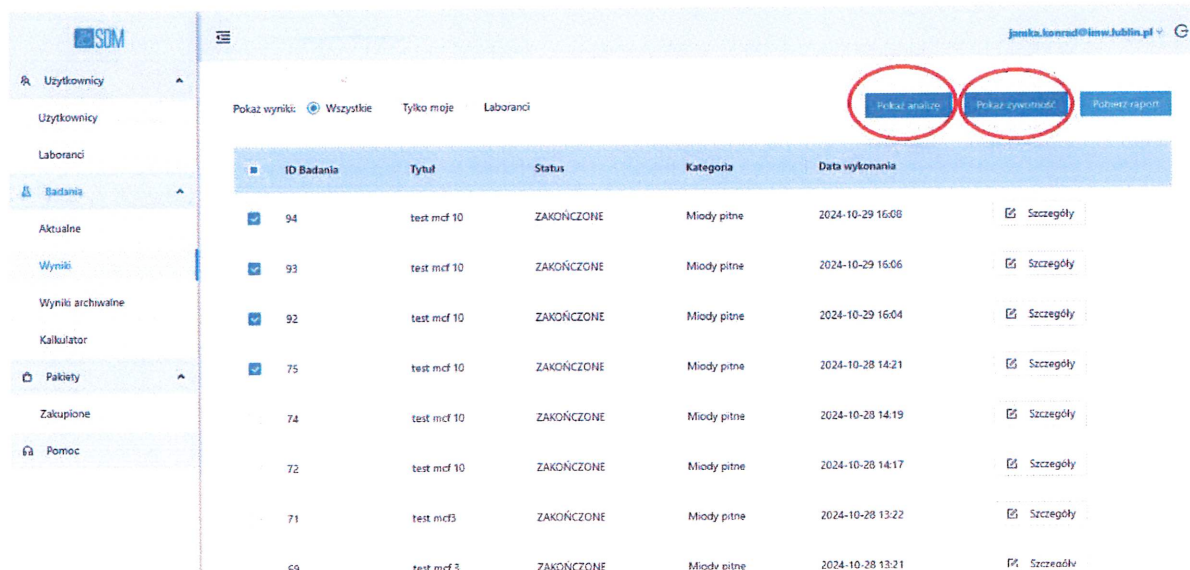
Wynik

Całkowita liczba komórek: 7.49 (mln kom/ml)
Liczba komórek żywych: 5.95 (mln kom/ml)
Liczba komórek martwych: 1.54 (mln kom/ml)
Żywotność: 79.48 (%)

Załączone zdjęcia



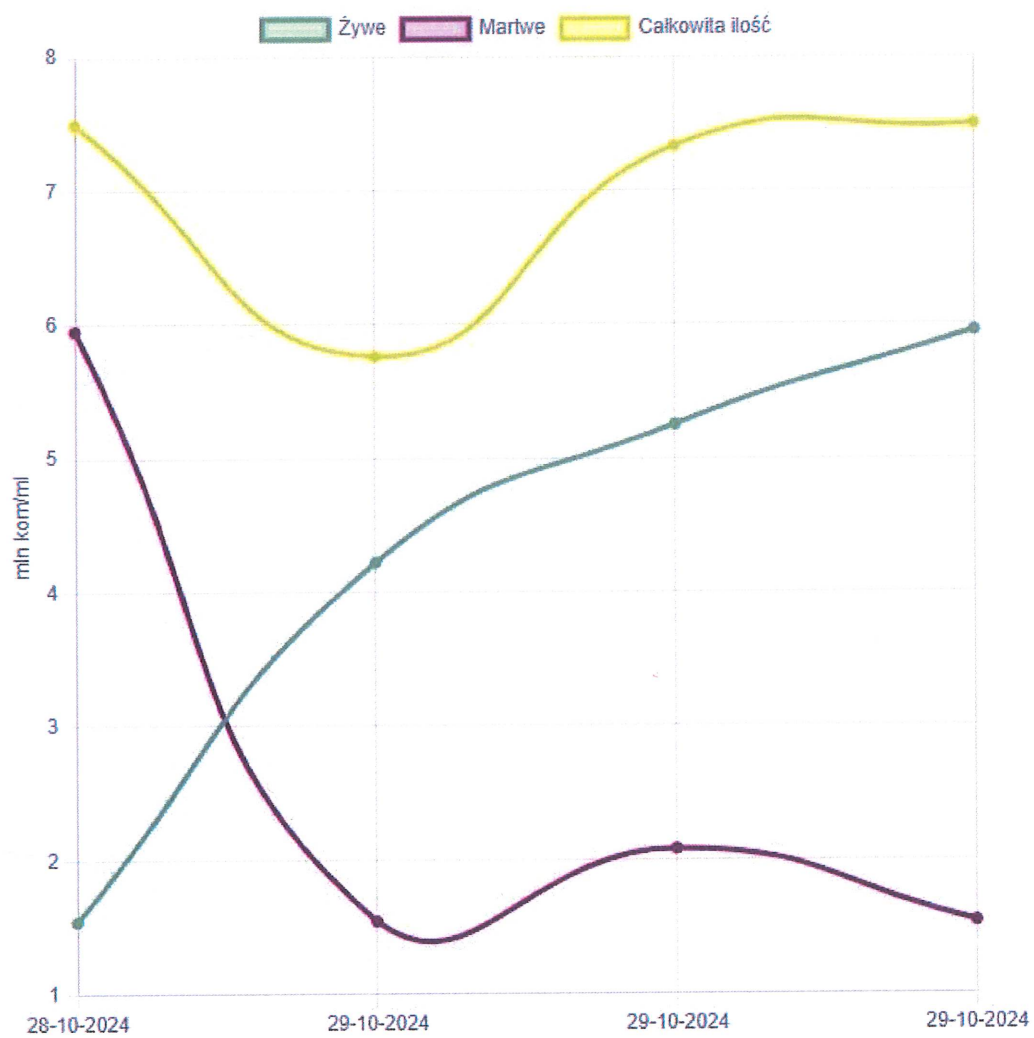
Rys. 1 Testowy wynik badania.



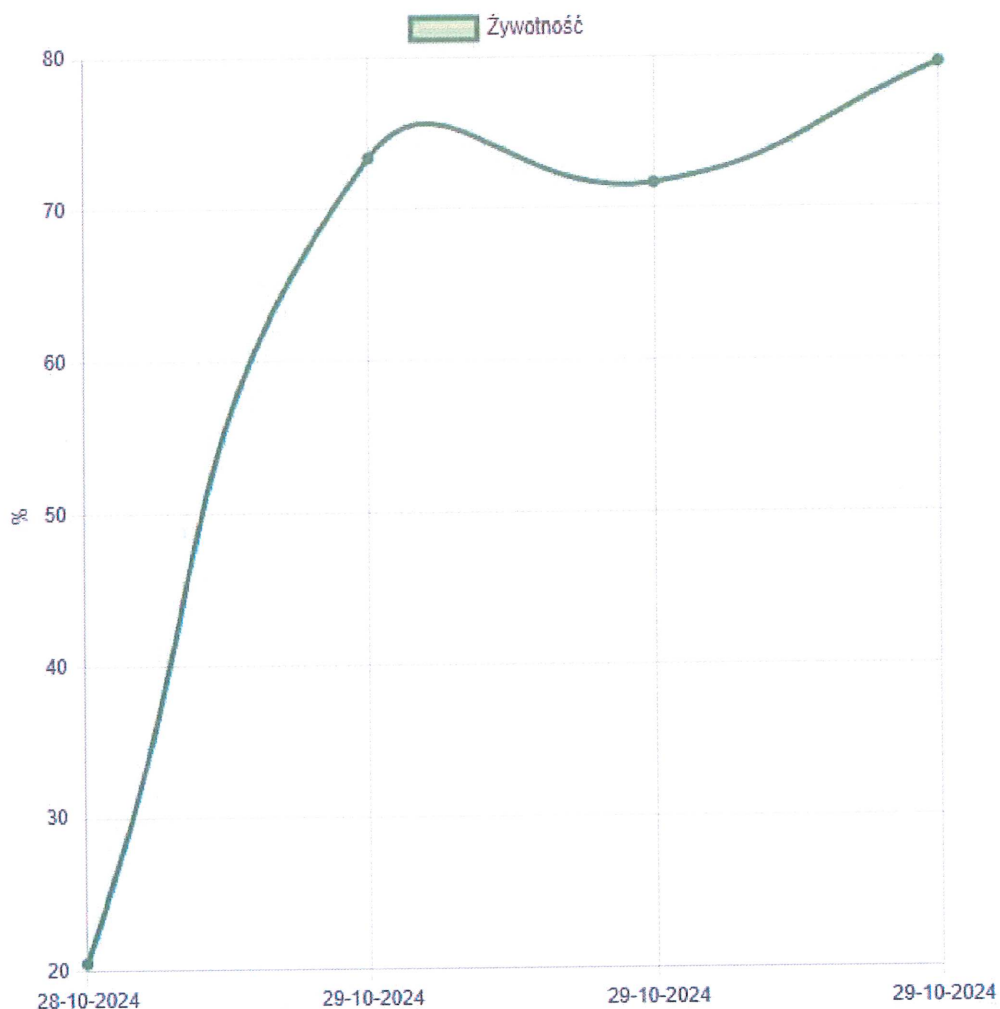
ID Badania	Tytuł	Status	Kategoria	Data wykonania	
94	test mcf 10	ZAKOŃCZONE	Miody pitne	2024-10-29 16:08	Szczegóły
93	test mcf 10	ZAKOŃCZONE	Miody pitne	2024-10-29 16:06	Szczegóły
92	test mcf 10	ZAKOŃCZONE	Miody pitne	2024-10-29 16:04	Szczegóły
75	test mcf 10	ZAKOŃCZONE	Miody pitne	2024-10-28 14:21	Szczegóły
74	test mcf 10	ZAKOŃCZONE	Miody pitne	2024-10-28 14:19	Szczegóły
72	test mcf 10	ZAKOŃCZONE	Miody pitne	2024-10-28 14:17	Szczegóły
71	test mcf 3	ZAKOŃCZONE	Miody pitne	2024-10-28 13:22	Szczegóły
69	test mcf 3	ZAKOŃCZONE	Miody pitne	2024-10-28 13:21	Szczegóły

Rys. 2 Wyniki zbiorcze przeprowadzonych badań.

Parametry raportu



Rys. 3 Analiza zbiorcza przedstawiająca liczbowe dane dot. całkowitej liczby komórek, komórek żywych i martwych.



Rys. 4 Żywotność [%]

Wykorzystanie 10-komorowych (10 próbek) kamer FAST READ 102 przyspiesza dodatkowo pracę i ogranicza również niedogodność związaną z każdorazowym czyszczeniem, jak w przypadku komory Thoma (wielokrotnego użytku).

Wyniki

Odpowiednie próbki, które zostały przygotowane do użycia w komorze Thoma oraz kamerze FAST READ 102, zostały również użyte do zliczania za pomocą SDM. Wyniki pomiarów różnymi metodami przedstawiono w Tabeli 1 (pomiarów komórek w płynie Ringera) i Tabeli 2 (pomiarów komórek w brzeczce). Odpowiednie wartości średnie i odchylenia standardowe przedstawiono graficznie na Rys. 5

1. Płyn Ringera

Tabela 1. Stężenie komórek i żywotność w trzech różnych populacjach szczepów drożdży z poszczególnych hodowli. Pomiar przeprowadzone za pomocą trzech analizowanych metod.

Hodowla	Komora Thoma		Kamera FAST READ 102		SDM dla Miodosytnictwa	
	Stężenie [kom./ml]	Żywotność [%]	Stężenie [kom./ml]	Żywotność [%]	Stężenie [kom./ml]	Żywotność [%]
Saccharomyces cerevisiae (Johannisberg M/35)						
1	1,59 x 10 ⁸	99,56	1,86 x 10 ⁸	99,72	1,97 x 10 ⁸	99,03
	1,88 x 10 ⁸	98,92	2,01 x 10 ⁸	99,21	1,93 x 10 ⁸	99,57
	1,66 x 10 ⁸	99,65	1,98 x 10 ⁸	98,99	2,13 x 10 ⁸	98,84
2	2,11 x 10 ⁸	99,62	2,40 x 10 ⁸	99,12	2,32 x 10 ⁸	95,98
	2,16 x 10 ⁸	98,45	2,21 x 10 ⁸	98,17	2,37 x 10 ⁸	98,25
	2,29 x 10 ⁸	98,37	2,04 x 10 ⁸	97,89	2,21 x 10 ⁸	97,98
3	1,97 x 10 ⁸	59,63	2,00 x 10 ⁸	65,23	2,03 x 10 ⁸	62,00
	2,01 x 10 ⁸	70,22	2,09 x 10 ⁸	66,97	2,11 x 10 ⁸	71,32
	1,94 x 10 ⁸	55,97	2,36 x 10 ⁸	61,29	2,27 x 10 ⁸	63,32
Saccharomyces cerevisiae (Cobra – miód pitny)						
1	1,88 x 10 ⁸	98,32	1,93 x 10 ⁸	98,45	2,35 x 10 ⁸	98,36
	1,79 x 10 ⁸	99,05	1,97 x 10 ⁸	97,69	1,80 x 10 ⁸	98,71
	1,72 x 10 ⁸	96,77	2,01 x 10 ⁸	99,67	1,90 x 10 ⁸	98,14
2	2,18 x 10 ⁸	98,63	2,22 x 10 ⁸	96,89	2,27 x 10 ⁸	97,98
	2,14 x 10 ⁸	98,47	2,44 x 10 ⁸	97,06	2,36 x 10 ⁸	96,39
	1,95 x 10 ⁸	98,03	2,05 x 10 ⁸	98,64	1,89 x 10 ⁸	97,46
3	2,71 x 10 ⁸	64,10	2,54 x 10 ⁸	62,98	2,39 x 10 ⁸	70,01
	2,51 x 10 ⁸	70,14	2,46 x 10 ⁸	66,32	2,82 x 10 ⁸	64,89
	2,24 x 10 ⁸	62,55	2,50 x 10 ⁸	59,87	2,44 x 10 ⁸	55,76
Saccharomyces cerevisiae (Bulldog Mead Yeast & Nutrient)						
1	1,56 x 10 ⁸	97,32	1,85 x 10 ⁸	96,85	1,72 x 10 ⁸	97,88
	1,86 x 10 ⁸	98,69	1,75 x 10 ⁸	97,14	1,81 x 10 ⁸	97,17
	1,69 x 10 ⁸	98,46	1,88 x 10 ⁸	99,23	1,91 x 10 ⁸	98,23
2	2,00 x 10 ⁸	99,66	2,11 x 10 ⁸	98,08	2,03 x 10 ⁸	99,01
	2,17 x 10 ⁸	99,24	2,33 x 10 ⁸	98,61	2,40 x 10 ⁸	97,69
	2,12 x 10 ⁸	99,70	2,06 x 10 ⁸	97,25	2,11 x 10 ⁸	96,55
3	2,04 x 10 ⁸	60,59	2,22 x 10 ⁸	62,03	1,99 x 10 ⁸	65,00
	2,06 x 10 ⁸	59,23	2,34 x 10 ⁸	64,14	2,04 x 10 ⁸	69,12
	2,31 x 10 ⁸	58,34	2,23 x 10 ⁸	54,23	2,39 x 10 ⁸	59,63

Wyjaśnienie

Hodowla 1 – 2 dni, inkubacja w temp. 26 °C, ciągłe wytrząsanie przy 80 obr./min.

Hodowla 2 – 9 dni, inkubacja w temp. 26 °C, ciągłe wytrząsanie przy 80 obr./min.

Hodowla 3 – 9 dni, inkubacja w temp. 26 °C, ciągłe wytrząsanie przy 80 obr./min., następnie 24h w temp. 37 °C (obniżona żywotność poprzez wymieszanie drożdży martwych i żywych)

2. Brzeczka miodowa

Tabela 2. Stężenie komórek i żywotność w trzech różnych populacjach szczepów drożdży z poszczególnych hodowli. Pomiar przeprowadzone za pomocą trzech analizowanych metod.

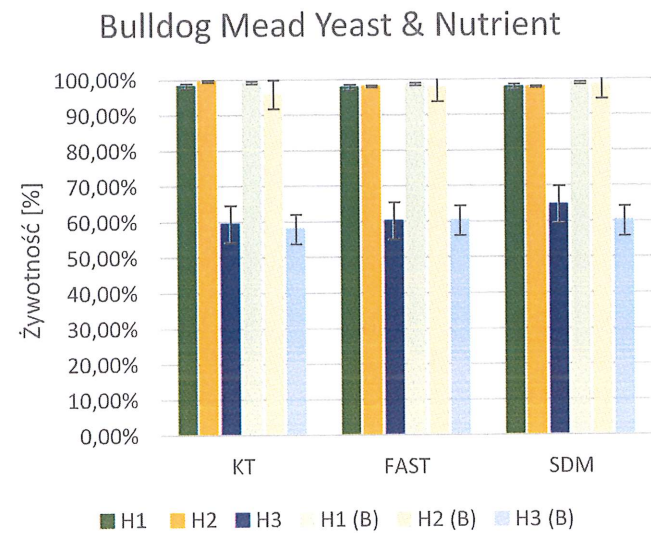
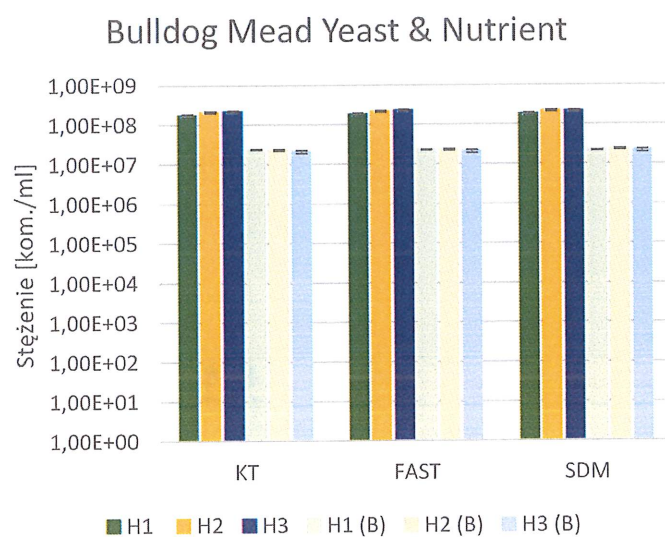
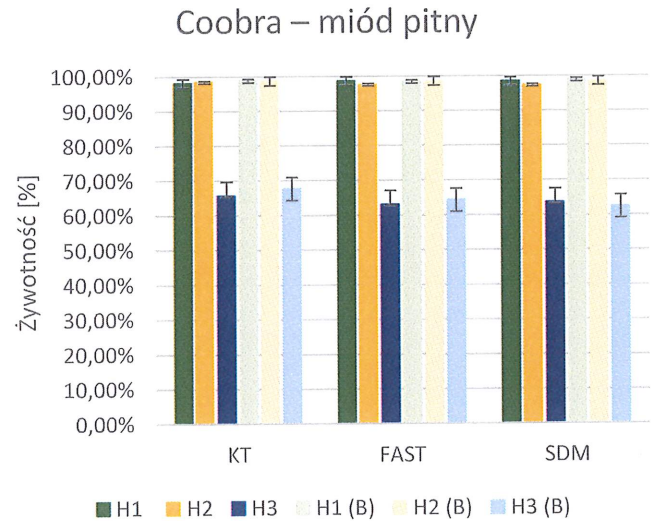
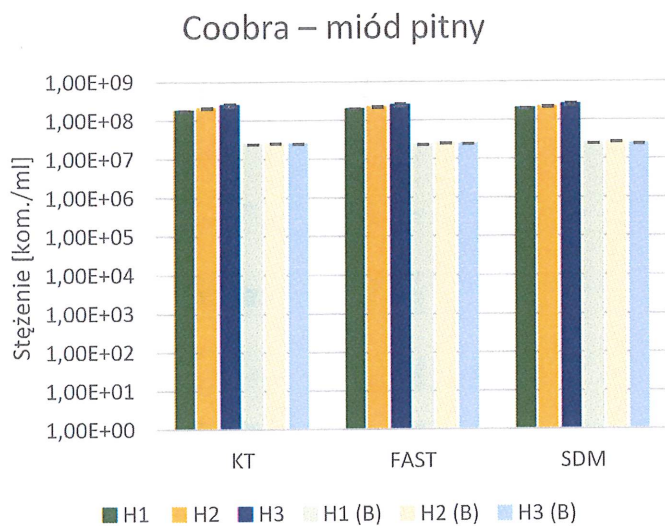
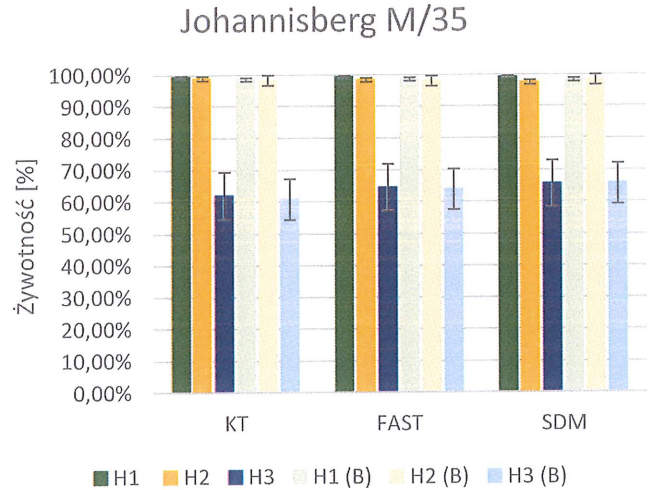
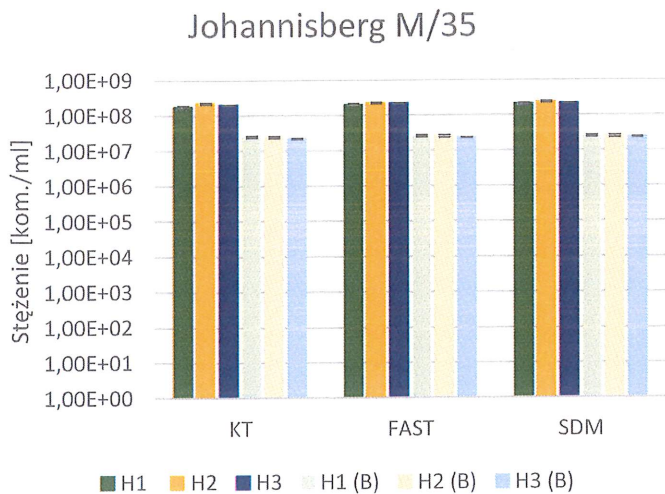
Hodowla	Komora Thoma		Kamera FAST READ 102		SDM dla Miodosytnictwa	
	Stężenie [kom./ml]	Żywotność [%]	Stężenie [kom./ml]	Żywotność [%]	Stężenie [kom./ml]	Żywotność [%]
Saccharomyces cerevisiae (Johannisberg M/35)						
1	2,66 x 10 ⁷	98,65	2,72 x 10 ⁷	97,68	2,47 x 10 ⁷	98,23
	2,48 x 10 ⁷	99,11	2,54 x 10 ⁷	99,23	2,73 x 10 ⁷	97,35
	2,33 x 10 ⁷	97,88	2,48 x 10 ⁷	98,64	2,24 x 10 ⁷	99,12
2	2,52 x 10 ⁷	96,36	2,63 x 10 ⁷	97,15	2,33 x 10 ⁷	96,33
	2,55 x 10 ⁷	99,01	2,39 x 10 ⁷	98,46	2,50 x 10 ⁷	99,85
	2,24 x 10 ⁷	99,47	2,49 x 10 ⁷	98,29	2,56 x 10 ⁷	98,61
3	2,18 x 10 ⁷	68,12	2,33 x 10 ⁷	66,23	2,33 x 10 ⁷	70,36
	2,23 x 10 ⁷	56,36	2,22 x 10 ⁷	64,34	2,39 x 10 ⁷	60,58
	2,14 x 10 ⁷	57,94	2,35 x 10 ⁷	60,99	2,29 x 10 ⁷	66,00
Saccharomyces cerevisiae (Cobra – miód pitny)						
1	2,29 x 10 ⁷	98,30	2,36 x 10 ⁷	98,23	2,30 x 10 ⁷	97,99
	2,44 x 10 ⁷	98,64	2,21 x 10 ⁷	97,64	2,28 x 10 ⁷	98,56
	2,41 x 10 ⁷	99,27	2,36 x 10 ⁷	99,32	2,66 x 10 ⁷	99,82
2	2,49 x 10 ⁷	97,38	2,56 x 10 ⁷	97,65	2,90 x 10 ⁷	98,87
	2,42 x 10 ⁷	98,75	2,33 x 10 ⁷	98,83	2,54 x 10 ⁷	97,13
	2,61 x 10 ⁷	99,79	2,60 x 10 ⁷	99,12	2,42 x 10 ⁷	99,45
3	2,52 x 10 ⁷	71,23	2,36 x 10 ⁷	70,14	2,44 x 10 ⁷	66,17
	2,43 x 10 ⁷	66,98	2,61 x 10 ⁷	63,46	2,27 x 10 ⁷	60,81
	2,35 x 10 ⁷	64,71	2,28 x 10 ⁷	59,31	2,39 x 10 ⁷	60,11
Saccharomyces cerevisiae (Bulldog Mead Yeast & Nutrient)						
1	2,30 x 10 ⁷	99,43	2,39 x 10 ⁷	99,59	2,07 x 10 ⁷	99,68
	2,38 x 10 ⁷	99,37	2,27 x 10 ⁷	98,15	2,17 x 10 ⁷	98,62
	2,36 x 10 ⁷	98,78	2,16 x 10 ⁷	97,98	2,22 x 10 ⁷	98,00
2	2,20 x 10 ⁷	91,22	2,10 x 10 ⁷	96,31	2,27 x 10 ⁷	96,83
	2,37 x 10 ⁷	98,64	2,27 x 10 ⁷	97,88	2,13 x 10 ⁷	99,02
	2,24 x 10 ⁷	97,48	2,46 x 10 ⁷	99,08	2,49 x 10 ⁷	99,23
3	1,85 x 10 ⁷	53,23	1,80 x 10 ⁷	55,63	2,01 x 10 ⁷	58,71
	2,10 x 10 ⁷	59,36	2,09 x 10 ⁷	60,88	2,17 x 10 ⁷	61,32
	2,22 x 10 ⁷	61,17	2,34 x 10 ⁷	64,28	2,23 x 10 ⁷	60,14

Wyjaśnienie

Hodowla 1 – 2 dni, inkubacja w temp. 26 °C, cięgie wytrząsanie przy 80 obr./min.

Hodowla 2 – 9 dni, inkubacja w temp. 26 °C, cięgie wytrząsanie przy 80 obr./min.

Hodowla 3 – 9 dni, inkubacja w temp. 26 °C, cięgie wytrząsanie przy 80 obr./min., następnie 24h w temp. 37 °C (obniżona żywotność poprzez wymieszanie drożdży martwych i żywych)



Rys. 5 Wykresy stężenia i żywotności. Legenda:

H1, H2, H3 – hodowla 1, 2, 3 w płynie Ringera; H1, H2, H3 (B) – hodowla 1, 2, 3 w brzeczce;
 KT – komora Thoma; FAST – kamera FAST READ 102; SDM – SDM dla Miodosytnictwa;

Omówienie wyników

Jeśli chodzi o określenie stężenia komórek, wyniki uzyskane za pomocą SDM dla Miodosytnictwa są porównywalne z wynikami zliczeń i obliczeń metodą z wykorzystaniem komory Thoma jak również kamery FAST READ 102. Pod względem żywotności, różne metody pomiaru wykazały jedynie minimalne różnice w przypadku wysokiej żywotności. Odchylenie standardowe było niewielkie. W przypadku hodowli drożdży o obniżonej żywotności (H3), różnice w pomiarach pomiędzy metodami były zauważalne aczkolwiek tylko w kilku przypadkach wyniosły >10%. Wyniki dot. żywotności komórek uzyskane w przypadku komory Thoma jak również kamery FAST READ 102, czyli metod ręcznego zliczania i określania żywotności w oparciu o intensywność zabarwienia poszczególnych komórek mogą nieznacznie różnić się od wyników uzyskanych poprzez SDM. Spowodowane jest to subiektywną oceną barwy komórki przez użytkownika, jak również w drugim przypadku, automatycznemu zaklasyfikowaniu danej komórki jako żywa/martwa poprzez algorytm mierzący intensywność zabarwienia.

Wnioski

Wyniki SDM dla Miodosytnictwa są porównywalne z wynikami uzyskanymi metodą mikroskopową z użyciem komory Thoma i kamery FAST READ 102, ponieważ wszystkie pomiary opierają się na tej samej zasadzie, czyli wykorzystują siatki przeliczeniowe o określonych i znanych parametrach dzięki czemu wynik może być przeliczony do docelowej jednostki [kom./ml]. Jednak korzystanie z SDM nie wymaga specjalnych kwalifikacji personelu w zakresie technik mikroskopowych, ponieważ do uzyskania wyniku wystarczy zaledwie 10 zdjęć preparatu wykonanych w różnych obszarach siatki, a nie jak w przypadku pozostałych metod, zliczenie komórek z 80 pól widzenia (małych kwadratów). Korzystając z komory Thoma/kamery FAST READ 102, wszystko musi być wykonywane ręcznie (liczenie komórek i obliczanie wyników), podczas gdy SDM automatyzuje te czynności podając gotowy wynik w bardzo krótkim czasie. Dzięki SDM stężenie komórek i żywotność można analizować w ramach jednego szybkiego pomiaru. Pomiary wykonane za pomocą SDM jak również pozostałych metod nie są zakłócone poprzez cząsteczki mogące występować w innej matrycy jaką jest brzezka miodowa. Rodzaj matrycy nie miał wpływu na wyniki przeprowadzonych analiz.

SDM jest bardzo dobrą, szybką i ekonomiczną alternatywą dla określania stężenia komórek i żywotności szczepów drożdży bez konieczności stosowania skomplikowanego sprzętu laboratoryjnego oraz czasochłonnych analiz mikroskopowych.