

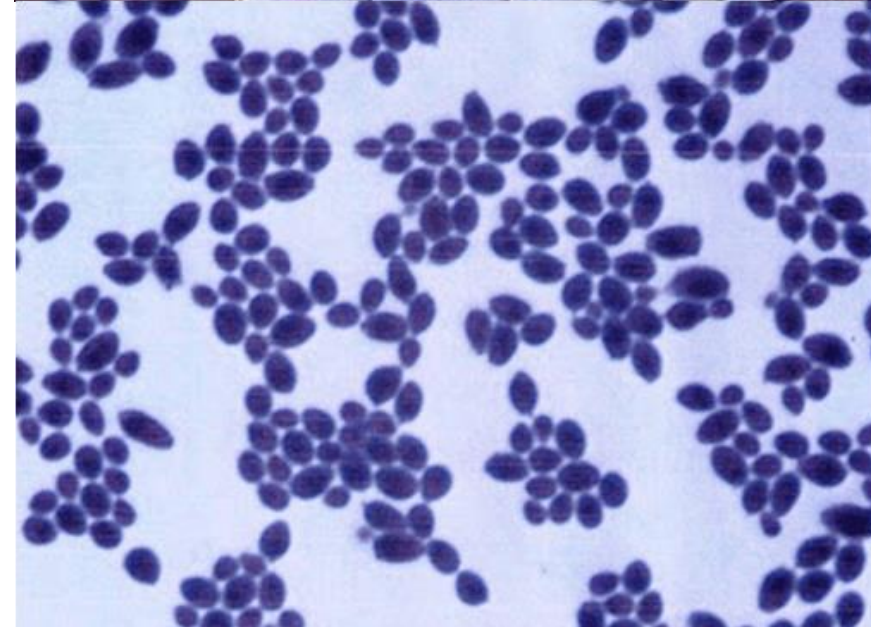
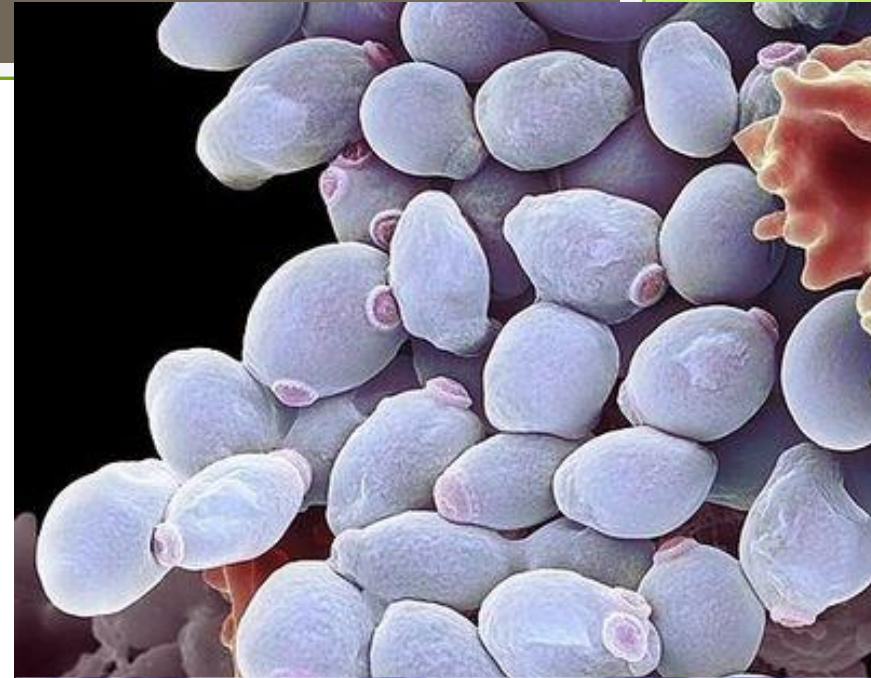


Přímé stanovení
počtu buněk v
Bürkerově komůrce

Vitální test
Kvasinky

Kvasinky

- heterotrofní **eukaryotní** organismy - tzn. buněčná stěna se liší od bakterií
- taxonomicky spadají pod vláknité houby - velikostí se řadí k mikromycetám = mikroskopické houby spolu s plísněmi
- buněčná stěna obsahuje **chitin, manan, glukany, proteiny**
- jednobuněčné, vytváří pseudomycelium i mycelium
- většinou **nízká teplotní odolnost** (usmrcení při 2-5 minutovém zahřívání na 56°C), spory jsou nepatrně odolnější
- mají schopnost zkvašovat mono-, di-, nebo trisacharidy na ethanol a CO₂
- Gramovo barvení - zdánlivě se barví G+, nicméně odlišná stavba buněčné stěny: silná vrstva peptidoglykanu zaměněna za polysacharidy (hlavně glukany a manany)
- podobně jako u bakterií se i zde složky buněčné stěny podílejí na virulenci a jsou významnými antigeny - využití v moderní diagnostice kvasinek



Kvasinky

- běžný výskyt: intestinální trakt, mukózní membrány, v půdě, na povrchu ovoce, na povrchu těla člověka, kůže - při přemnožení způsobují onemocnění

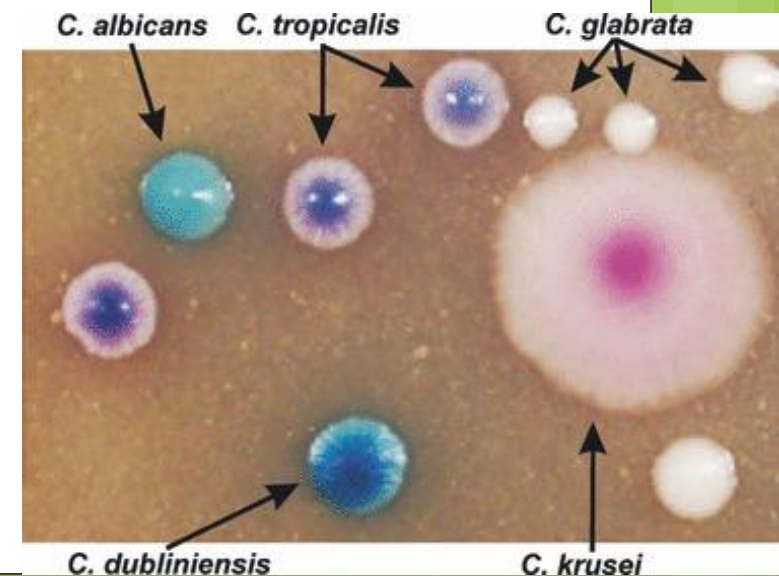
Zástupci

- *Saccharomyces*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Cryptococcus*, *Malassezia* a *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Rhodotula*, *Hansenula anomala*
- >20 druhů kvasinek způsobují lidské onemocněním hlavně *Candida albicans*

Onemocnění

- infekce úst, krku - bílé povlaky, zarudnutí, nechutenství, bolest při polknutí
- onemocnění pohlavních orgánů - zarudnutí, svědění, bolestivost (může být vyvoláno i antibiotickou léčbou - mikrobiální nerovnováha - přemnožení *Candida albicans*)
- invazivní kandidóza - závažné onemocnění, postihuje celé tělo, doprovázené horečkou/ zimnicí

typická nemocniční infekce, obecně např. v USA 45000 případů za rok (*Candida auris*)



Životní cyklus kvasinek

V průběhu normálního životního cyklu jsou kvasinky **haploidní**, tedy mají **1 kopii od každého chromozomu**.

Rozmnožování haploidních buněk = **asexuálně = mitóza**

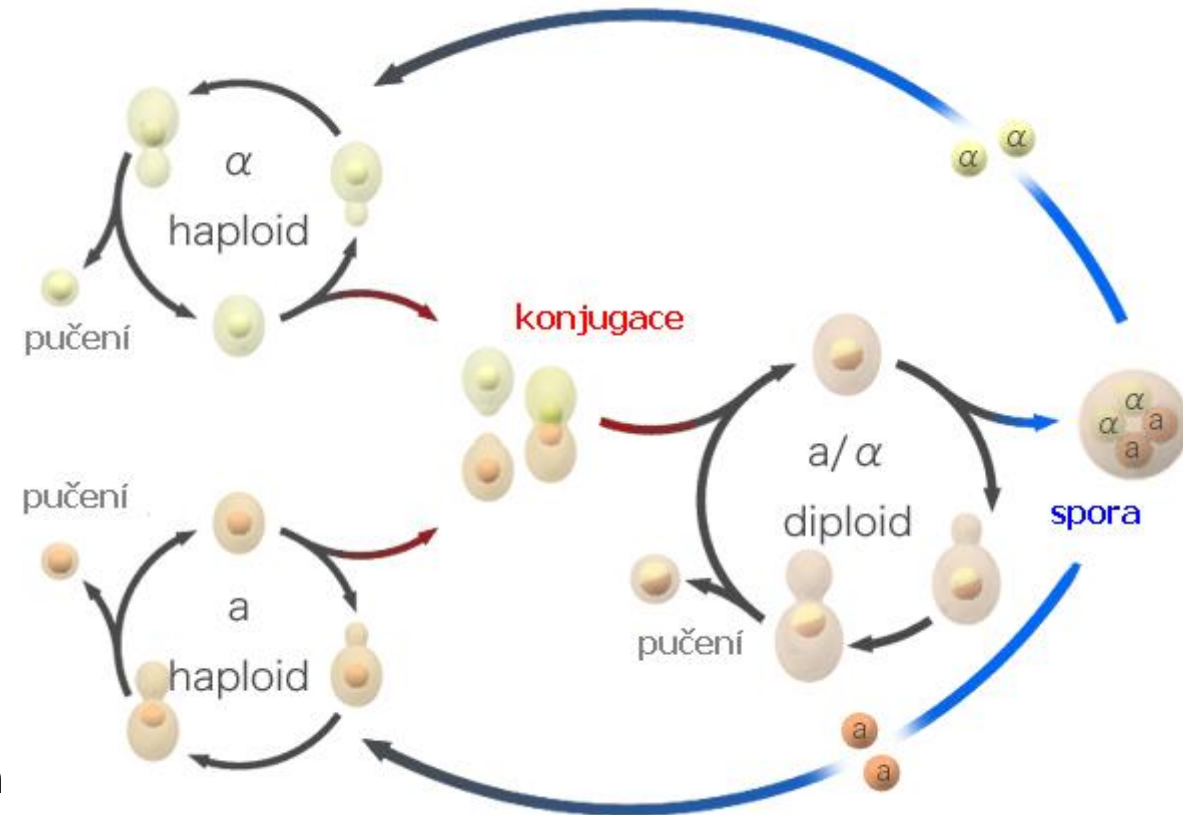
- dceřiná buňka vyrůstá na pólu
- při dosažení dospělosti - konec růstu - vytváří přehrádku uprostřed buňky
- přehrádka dělí mateř. buňku do 2 ekvivalentních buněk dceřiných
- dělicí cyklus trvá při optimálních podmínkách 3 hodiny

Pokud je bohatá etapa následována nutričním deficitem

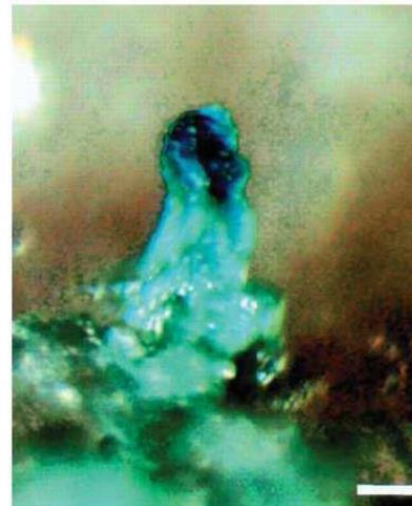
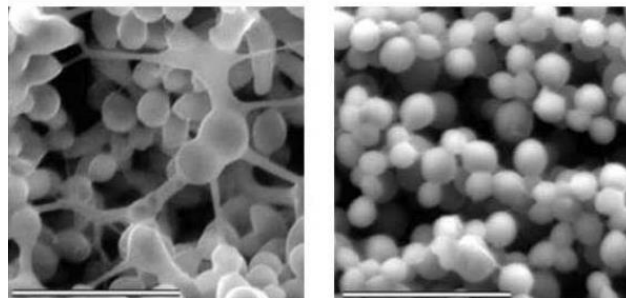
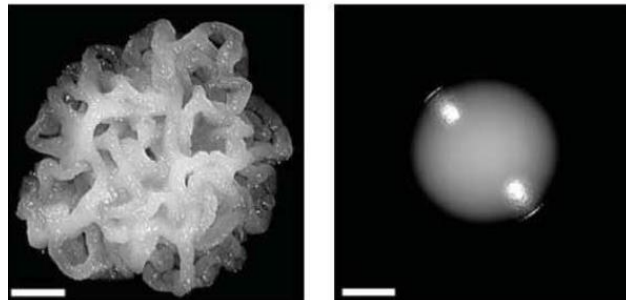
- partnerské typy konjugují a fúzí na koncích
- následuje fúze jader – vytvoří se **diploidní buňka = zygota**
- zygoty - štěpí se středově jako haploidní ALE JSOU DELŠÍ A ŠIRŠÍ než haploidní
- po vytvoření zygot běžně následuje okamžitě meióza následována sporulací
- produkt sporulace je **4-sporový zygotický konglomerát**
- tento útvar autolyzuje a uvolňuje haploidní spory - odolné vůči delšímu období stresu

Při zlepšení životních podmínek = nástup nutričně bohaté etapy

- spory začnou znovu růst, tedy započne nový cyklus haploidních buněk



Laboratorní x wild type



Využití

- potravinářství (pivo, víno, pekařské droždí, krmná biomasa)
- ethanol; rody: *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia*, *Rhodotula*, *Zygosaccharomyces*, *Clavispora*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia*, *Cryptococcus*, *Monilia*)
- GMO – rekombinantní proteiny
- HBsAg – vakcína; *Pichia pastoris*
- modelový systém (*S. pombe*, *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*) – buněčný cyklus, biofilm, nádory, metabolismus léků, sekreční dráhy; modelový organismus pro studium lidských nemocí
- **Patogenita**
- *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia* a *Trichosporon*
- ale i *Geotrichum*, *Rhodotula*, *Saccharomyces*, *Hansenula anomala*

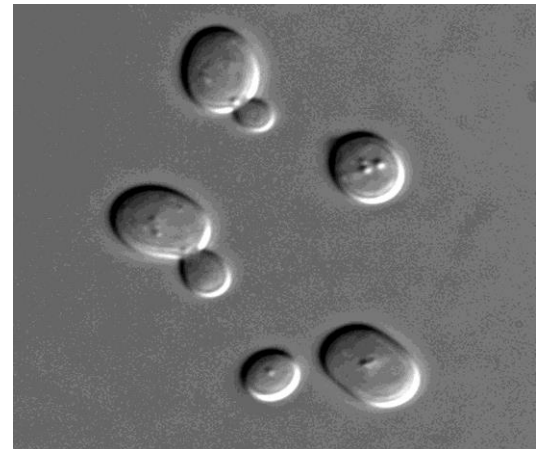
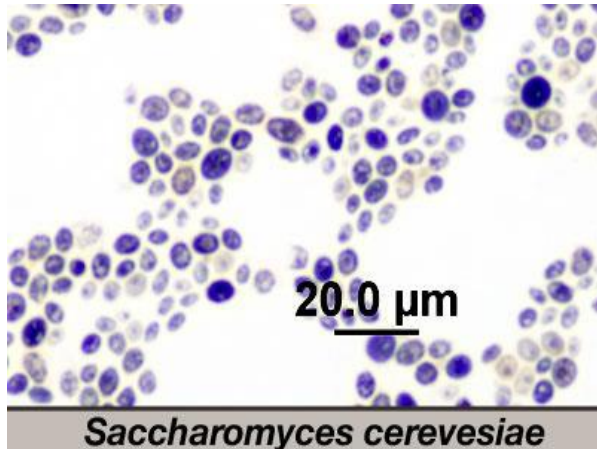
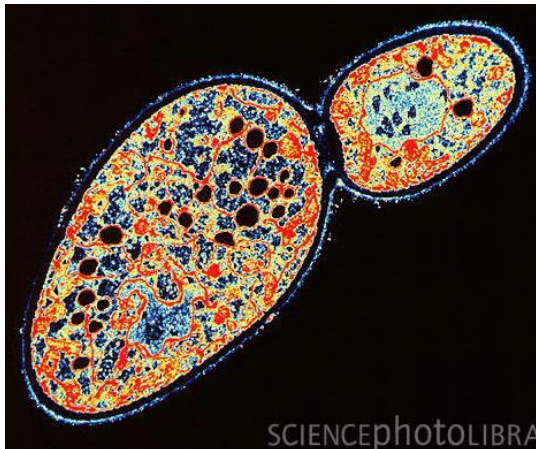
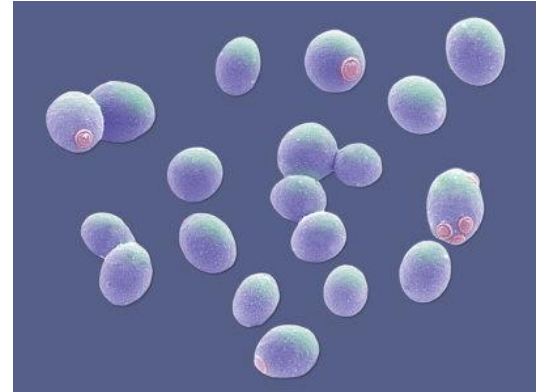
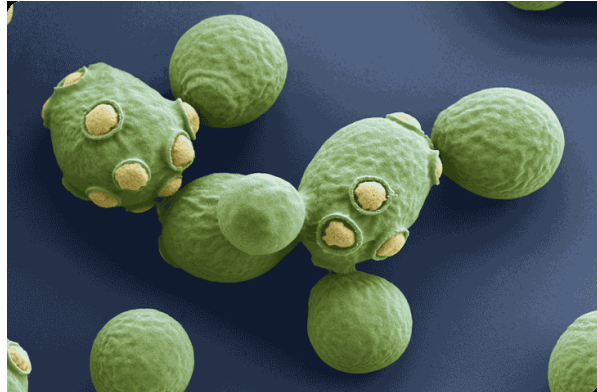
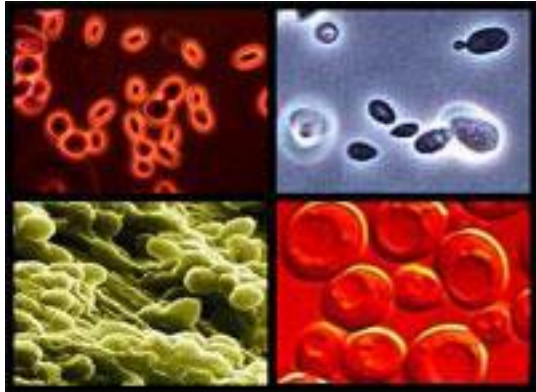
Kvasinky



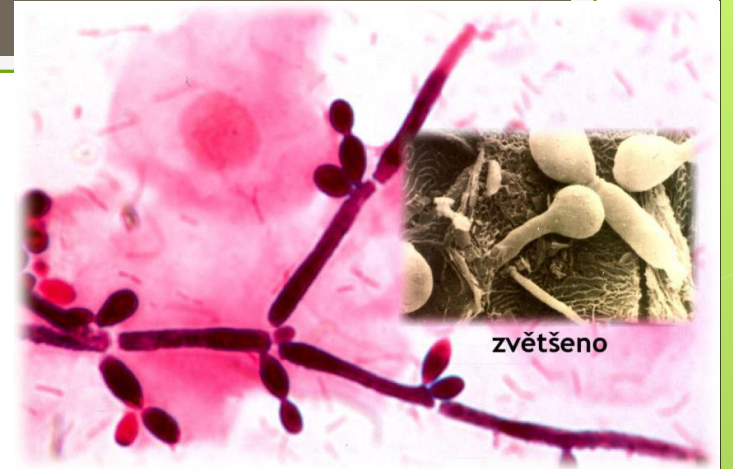
...*Saccharomyces cerevisiae*!



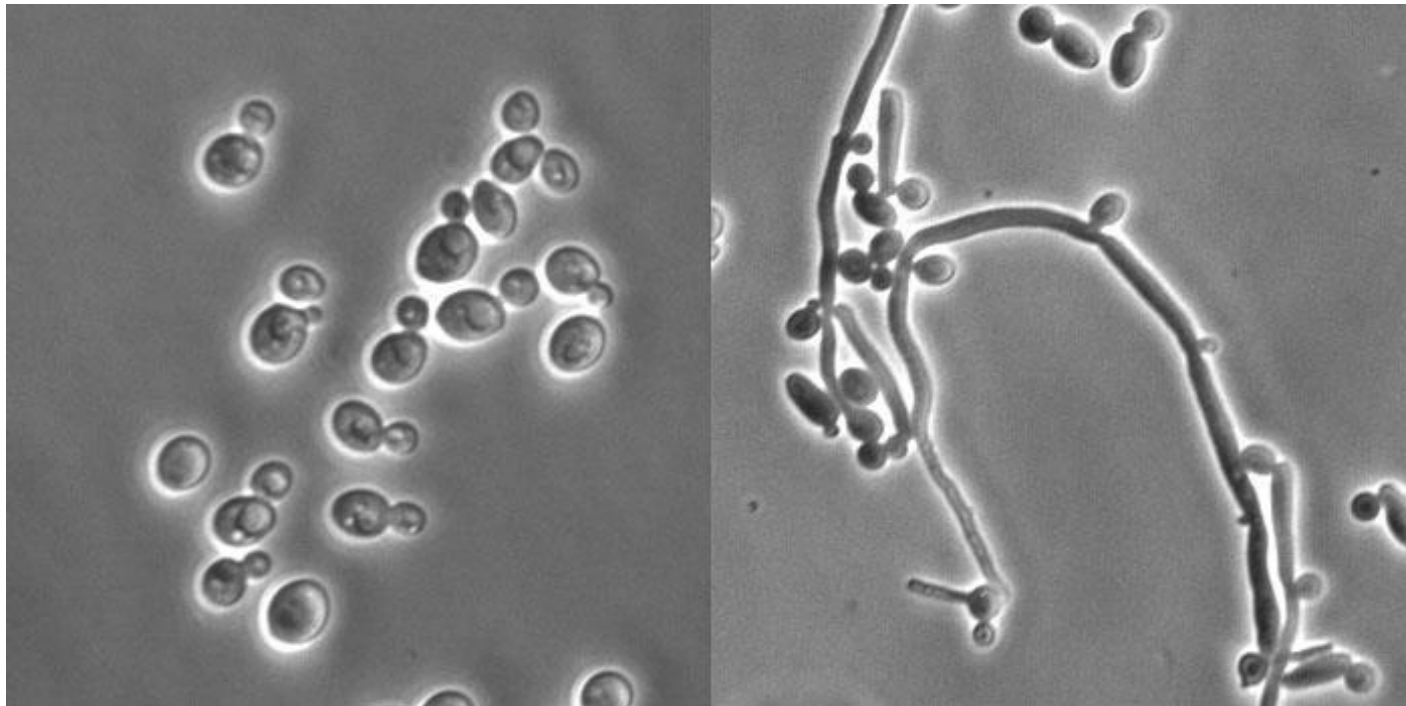
Saccharomyces



Candida



Kvasinkovitá forma – nepatogenní Tvorba mycelia – patogenní forma





Hustopeče. **Pomník kvasinky vinné** - Pískovcová plastika z r. 2007 představuje 70.000násobnou zvětšeninu vinné kvasinky. Je zapsaná v knize českých rekordů jako největší zvětšenina živého organismu.

Stanovení počtu buněk

- o **metody nepřímé** (kultivační)
- o **metody přímé** – počítání buněk pomocí mikroskopu, bez kultivace
- o počítací komůrka (skleněná destička s počítací mřížkou)
 - o Bürkerova – zde jsou dvě počítací mřížky s políčky umístěny uprostřed sklíčka – viz obrázek
 - o Thomova
- o pozn.: fixovaný barvený preparát (živé a mrtvé buňky nelze odlišit)

Vitální test

- o slouží ke zjištění okamžitého stavu populace = % živých a mrtvých buněk
- o princip propustnosti membrán mrtvých vs. živých buněk pro netoxická barviva (methylenová modř)
 - mrtvé - cytoplazmatická membrána už není semipermeabilní - barvivo pronikne dovnitř buňky
 - pozorujeme modré buňky
 - živé - barvivo nepropustí – buňky zůstávají neobarvené

V praxi se využívá při kontrole životaschopnosti mikroorganismů během technologických procesů. Sleduje se jejich odpověď na přidavek či úbytek různých látek či na probíhající fyzikální proces.

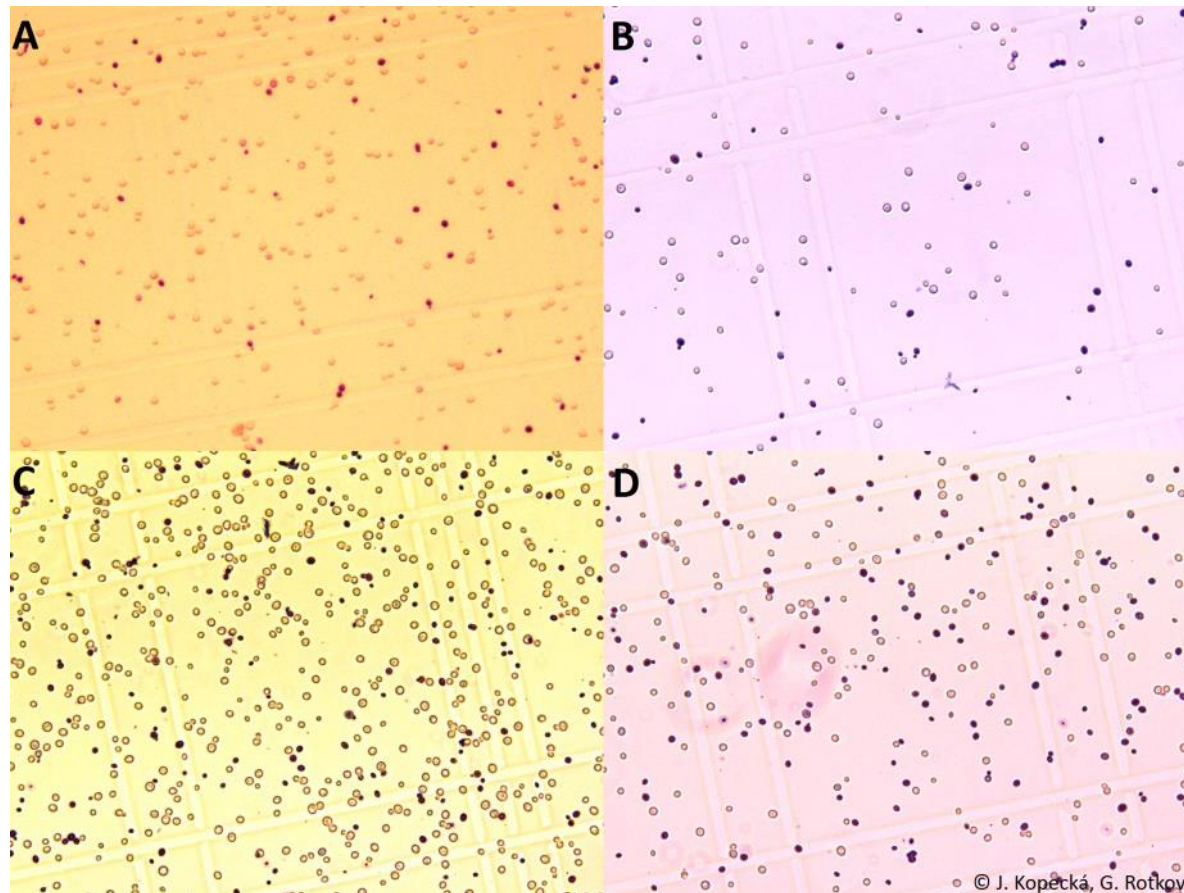


Postup

- **suspenze kvasinkových buněk** – do Erlenmeyerovy baňky se sterilní destilovanou vodou dát kulturu kvasinek (pekařské droždí nebo z PM naočkovanou sbírkovou kulturu) a promíchat
- připravit a popsat **4 zkumavky** (0, 7, 14, 21 minut) a do každé napipetovat **1 ml suspenze**
- první zkumavka - **kontrolní vzorek** - pro zjištění počtu živých buněk v čase **0 minut**
- ostatní zkumavky vložit do lázně na **61 °C** na dobu na nich uvedenou (**7, 14, 21 minut**) – poznačit si do poznámek čas 0, od kterého se následující časy počítají
- do zkumavky **0 (kontrolní vzorek)** kápnout 2 kapky methylenové modři (tento postup opakovat s každou další zkumavkou po daném čase ve vodní lázni) a připravit si **Bürkerovu komůrku**
- **krycí sklíčko dát na Bürkerovu komůrku a do prohlubně Bürkerovy komůrky nanést kapku suspenze**
- po usazení buněk (1 až 2 minuty) **spočítat živé** (neobarvené) a **mrtvé** (modré) buňky (objektiv 40x = celkové zvětšení 400x)
- pro každý čas spočítat buňky v 10 čtvercích (pouze v těch velkých); pokud se buňky nachází na hraně velkého čtverce, spočítat buňky na vybraných dvou hranách

Obarvené buňky při vitálním testu

v čase 0 (A) a po působení při teplotě 61°C ve vodní lázni po 7 (B), 14 (C) a 21 minutách (D)

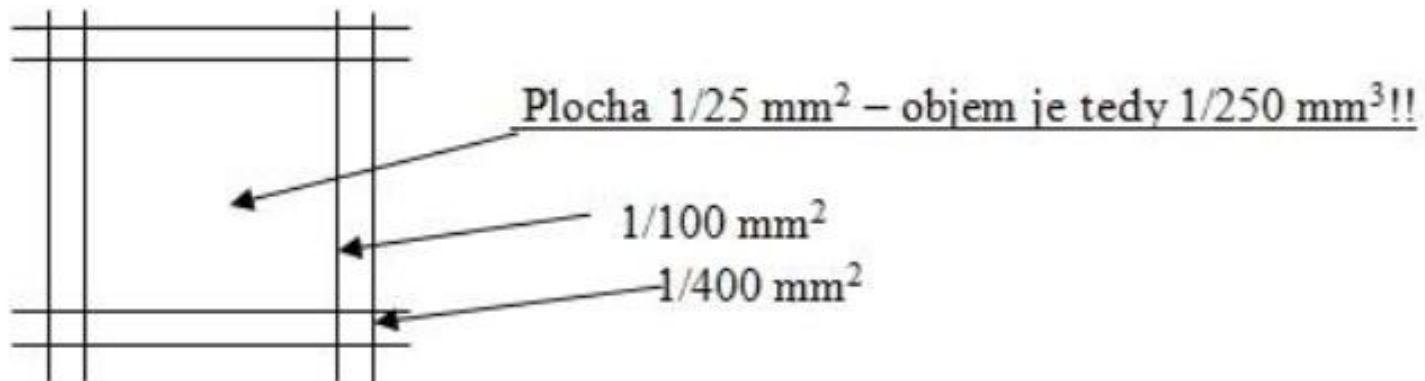


Výpočet celkového počtu buněk

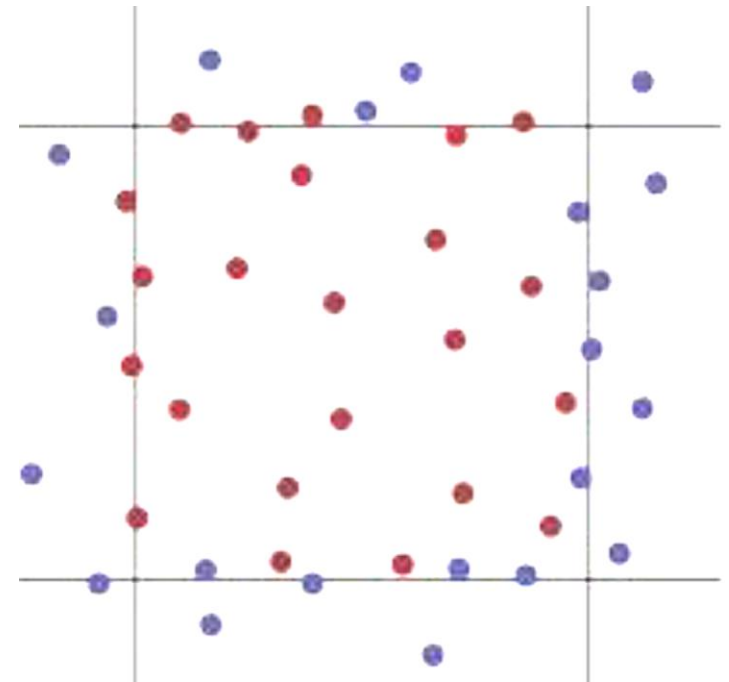
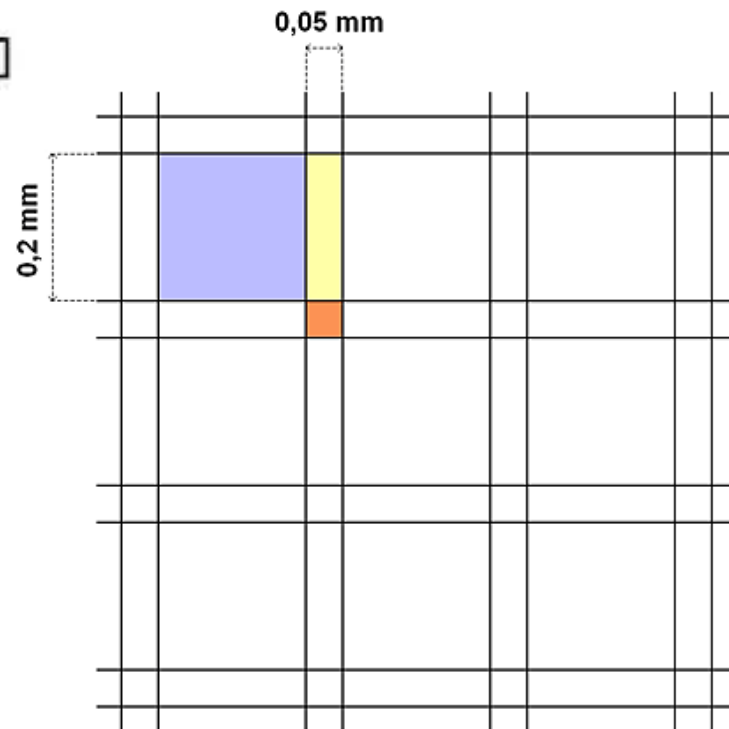
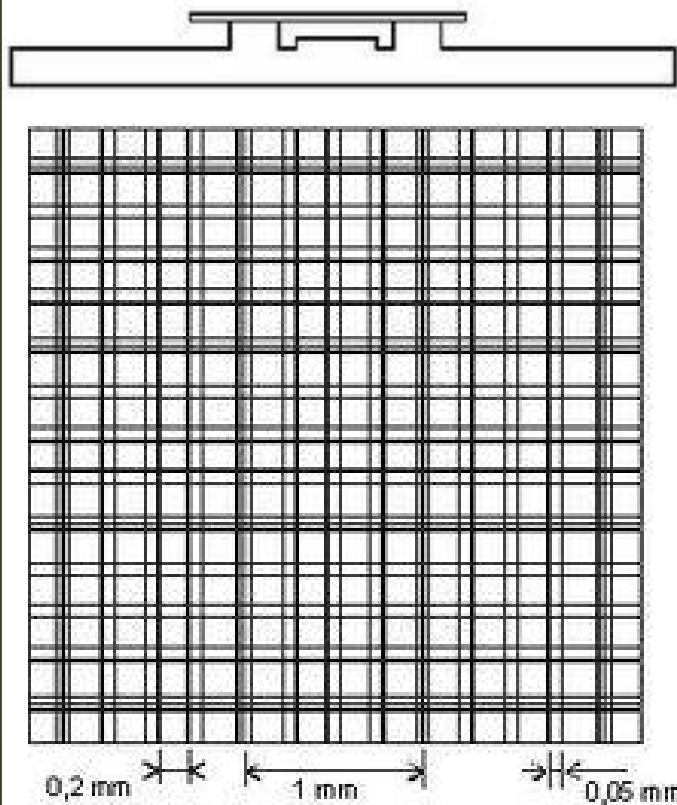
- $N \text{ v } 1 \text{ ml} = (\text{součet buněk živých a mrtvých} / 10) \times 250 \times 1000$

- $N = \text{celkový počet buněk}$

Počet políček



Bürkerova komůrka (skleněná destička s počítací mřížkou)



!! Počítat jen 2 strany – levou + horní nebo spodní + pravou

Pozn.: červeně jsou znázorněny buňky, které se započítávají do celkového počtu buněk v políčku

Podklady pro vyhotovení protokolu

Příslušný protokol budete mít vložen v IS. Do něj si vyplníte úvodní část pomocí prezentace a také pomocí skript, která již v IS máte.

Na následujících obrázcích budete mít nákresy pohledů na Bürkerovu komůrku - v mikroskopu – s políčky a buňkami. Ve vámi vybraných **10 políčkách** budete počítat v daných časech (0, 7, 14 a 21 minut) **živé** (nezbarvené) a **mrtvé** (modře zbarvené) buňky.

Počítá se jen v tom velkém čtverci (znázorněný modře).

Pokud se buňky nachází na hraně, počítají se pouze ze dvou zvolených stran

K výpočtu použijte vzorec z prezentace.

Na základě těchto výpočtů vyplníte tabulku v protokolu a vytvoříte graf. V závěru tento úkol vyhodnotíte.

