

Pozorování kvasinek, vitální test

Cíl: Vitální test – počítání živých a mrtvých buněk

Stanovení % přežívajících buněk

Vitální test

- slouží ke zjištění okamžitého stavu populace

= % živých a mrtvých buněk

(kontrola kvasinek během technologického procesu)

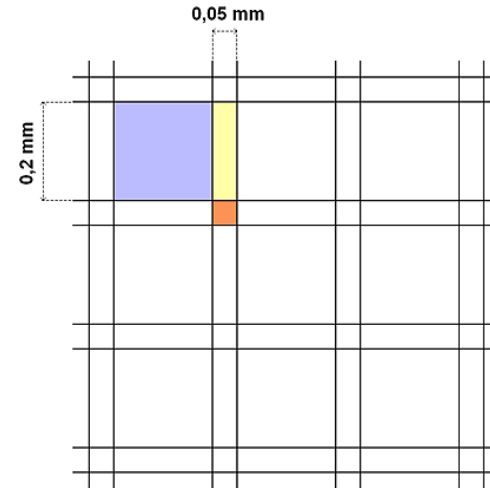
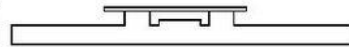
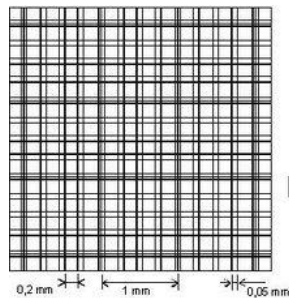
- propustnost membrán mrtvých buněk pro netoxická barviva
(metylénová modř)

→ tabulka (čas, počet živých a mrtvých buněk v 10-ti polích)

graf – závislost přežívajících/mrtvých buněk na čase

Přímé stanovení počtu buněk

- mikroskopicky v Bürkerově komůrce (skleněná destička s počítací mřížkou)

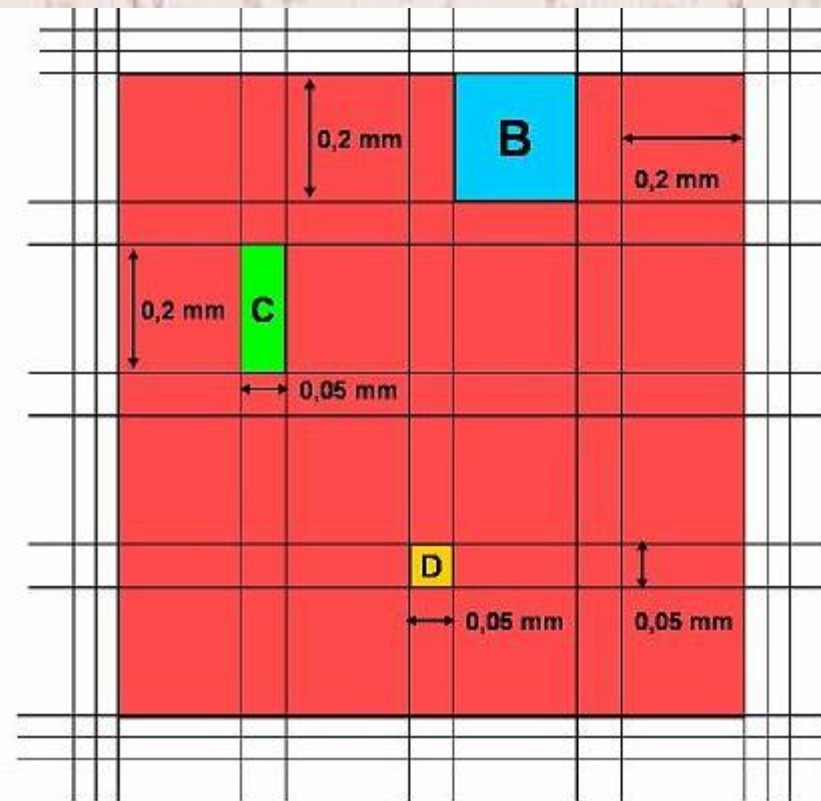
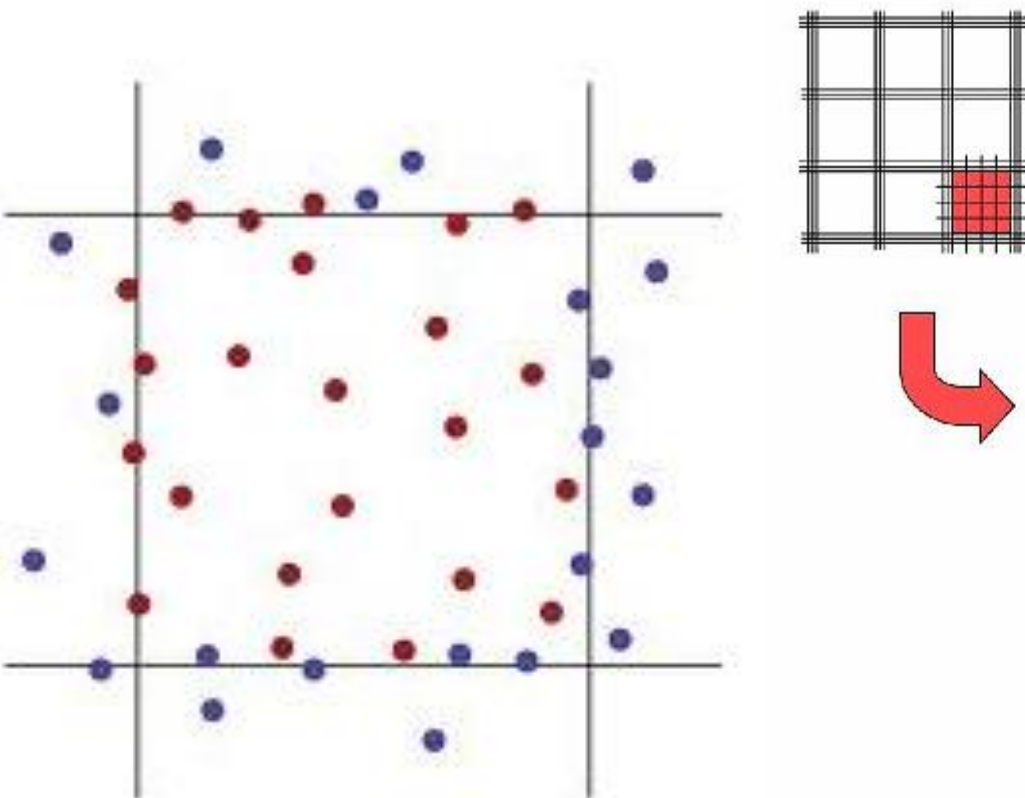
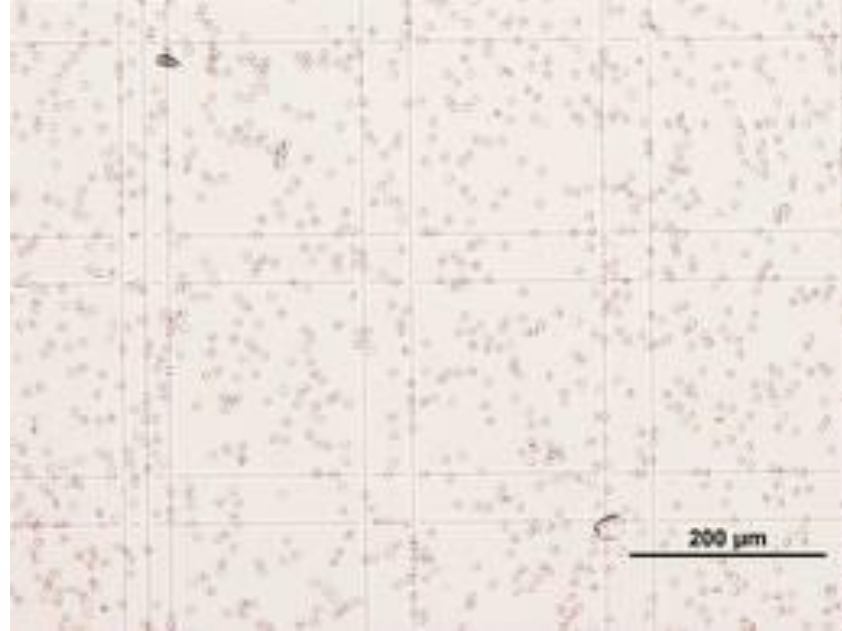


- prostor mezi podložním a krycím sklíčkem má u různých komůrek různou hloubku a je na komůrce vždy vyznačen
- při stanovení počtu buněk nejdříve ze známé hloubky komůrky dopočítáme objem vzorku ve čtverečku a následně počet buněk přepočítáme na 1 ml

Bürkerova komůrka

(skleněná destička s počítací mřížkou)

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

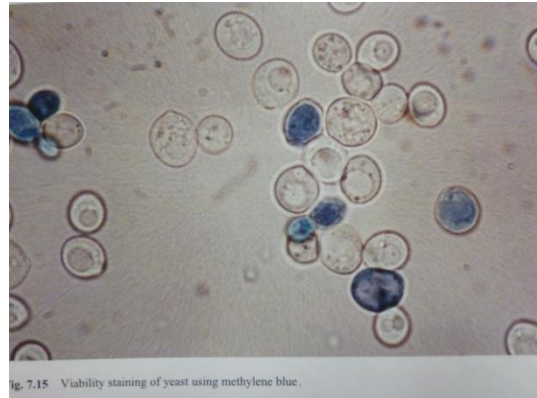


Kvasinky

- heterotrofní eukaryotní organismy
- dle Grama se barví jako G+, ale BS obsahuje **chitin, manan, glukany, proteiny (tedy nejsou Gram-pozitivní)**
- mají schopnost zkvašovat mono-, di-, nebo trisacharidy na ethanol a CO₂
- jednobuněčné, pseudomycelium i mycelium
- většinou **nízká teplotní odolnost** (usmrcení při 2-5 minutovém zahřívání na 56°C), spory jsou nepatrně odolnější

Kontrola kvasinek

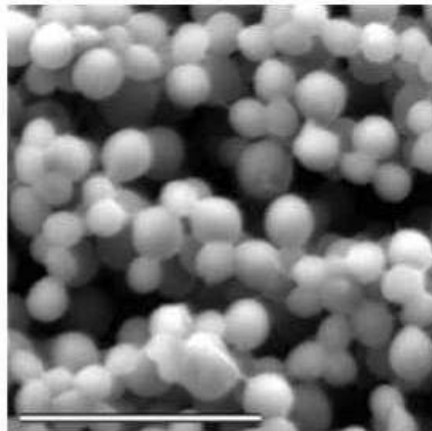
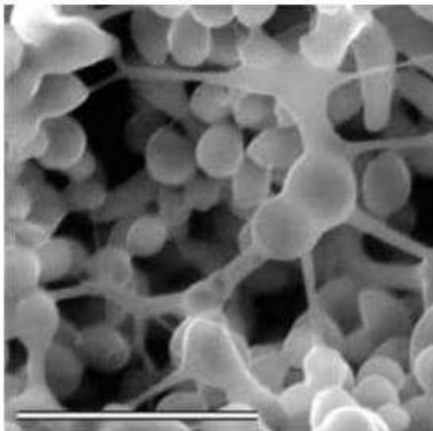
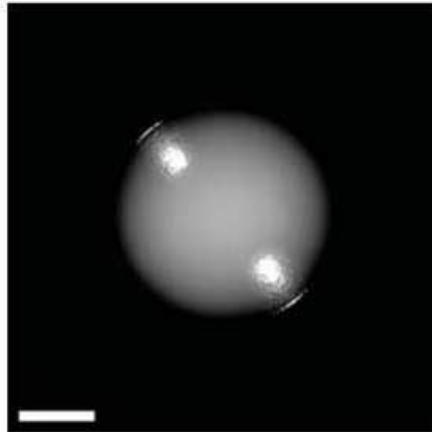
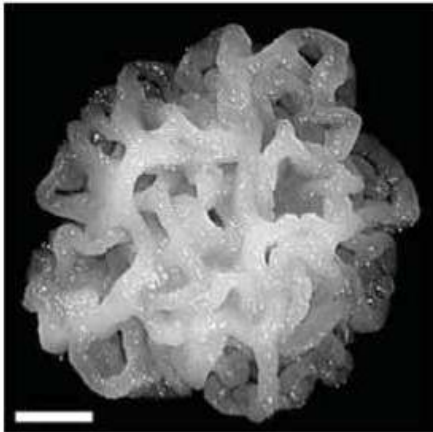
- vitální barvení



- acidifikační test
 - rozdíl pH po přidání glukózy do roztoku



Laboratorní x wild type



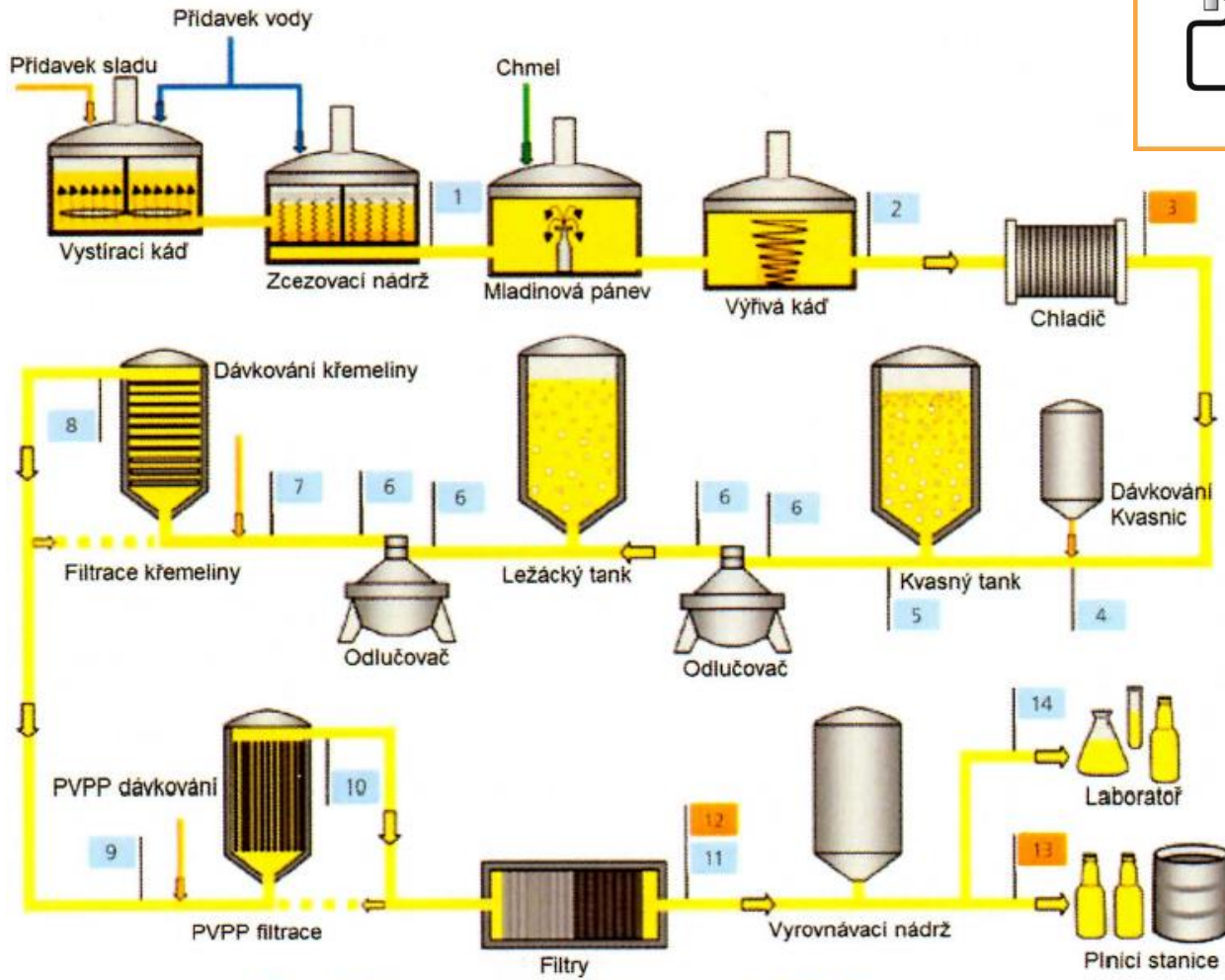
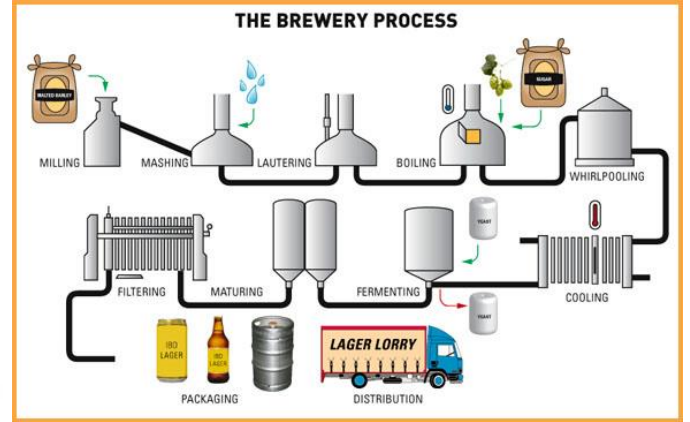
Využití

- potravinářství (pivo, víno, pekařské droždí, krmná biomasa)
- etanol (*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

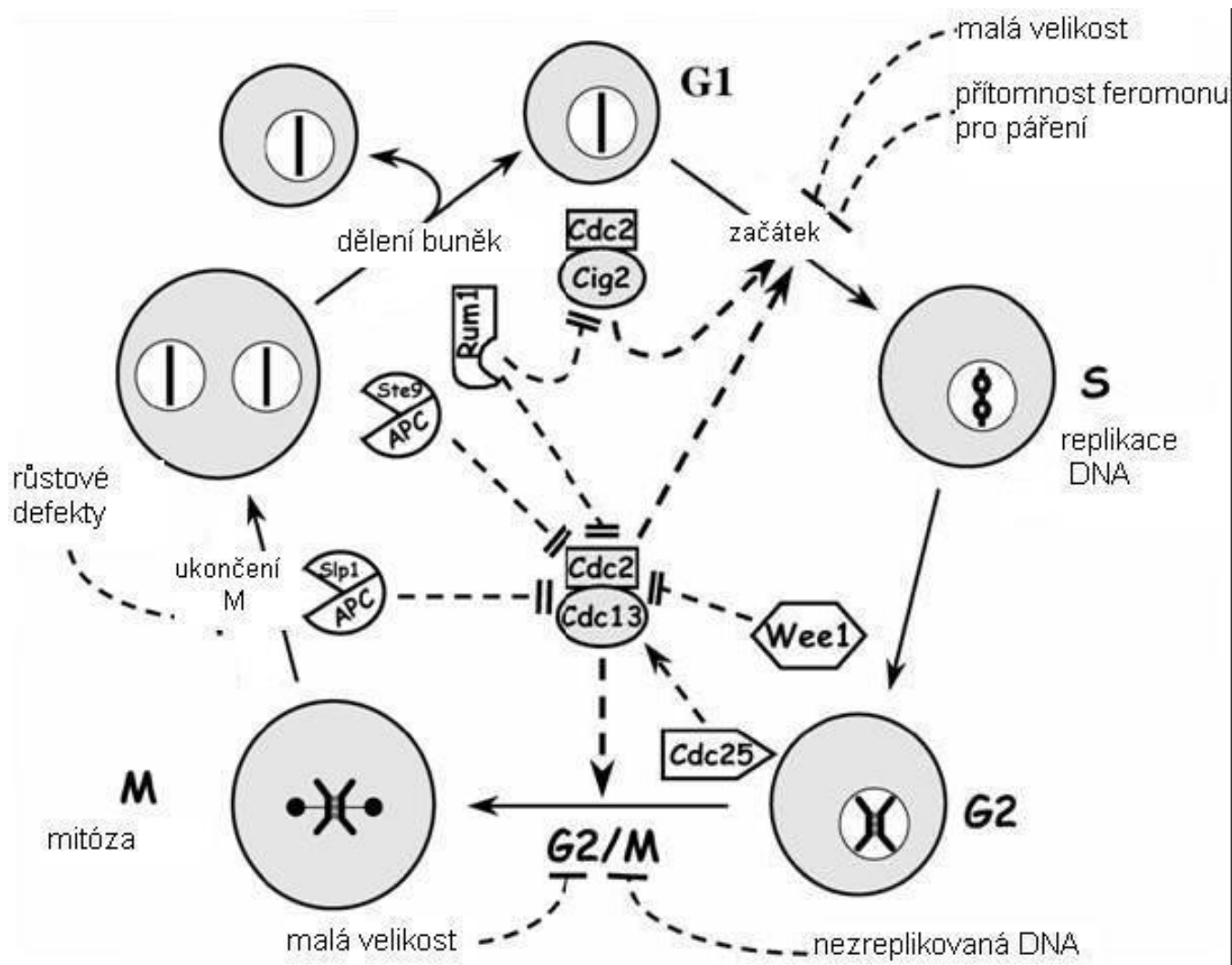
Patogenita

- *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia* a *Trichosporon*
- ale i *Geotrichum*, *Rhodotula*, *Saccharomyces*, *Hansenula anomala*

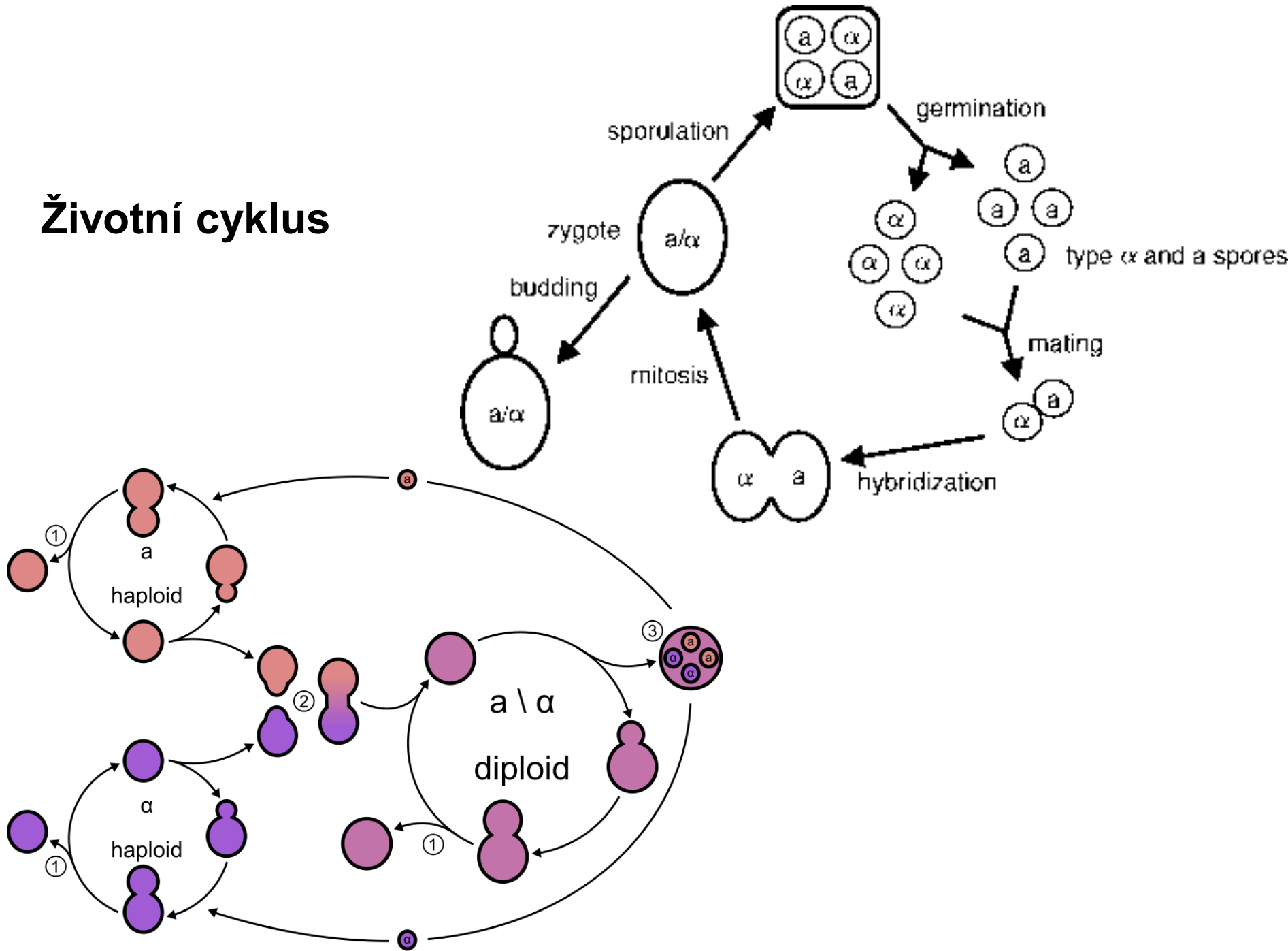
Výroba piva

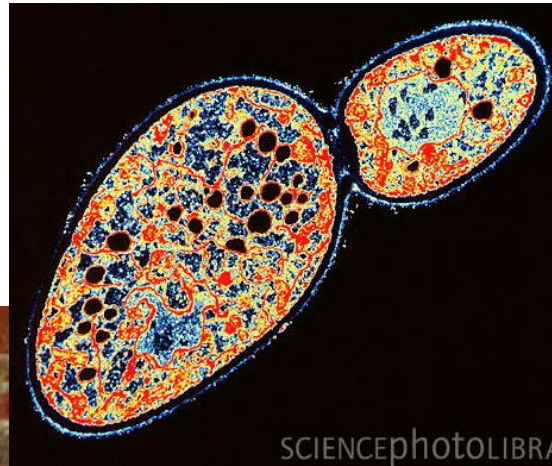
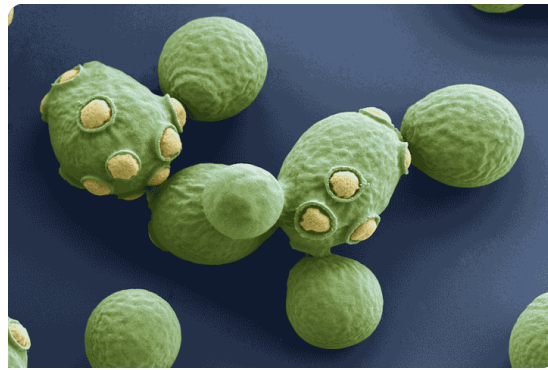


Buněčný cyklus u kvasinek

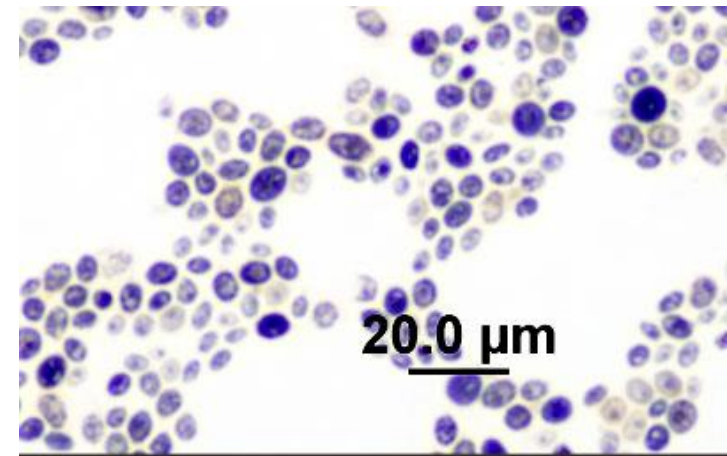
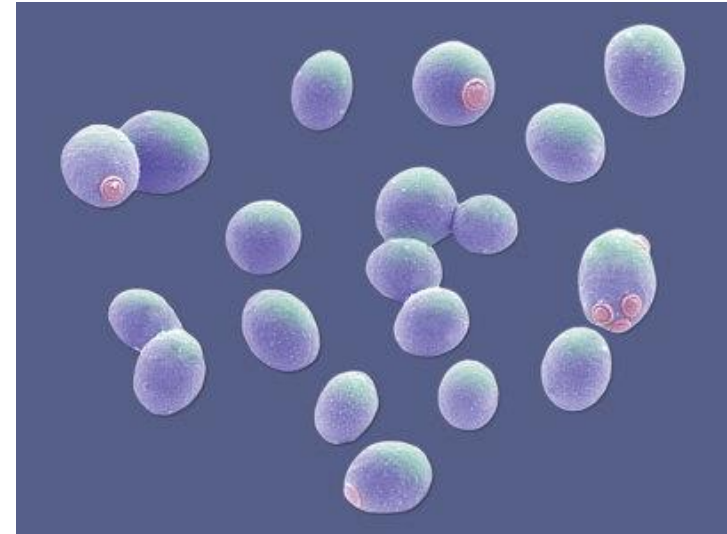


Životní cyklus





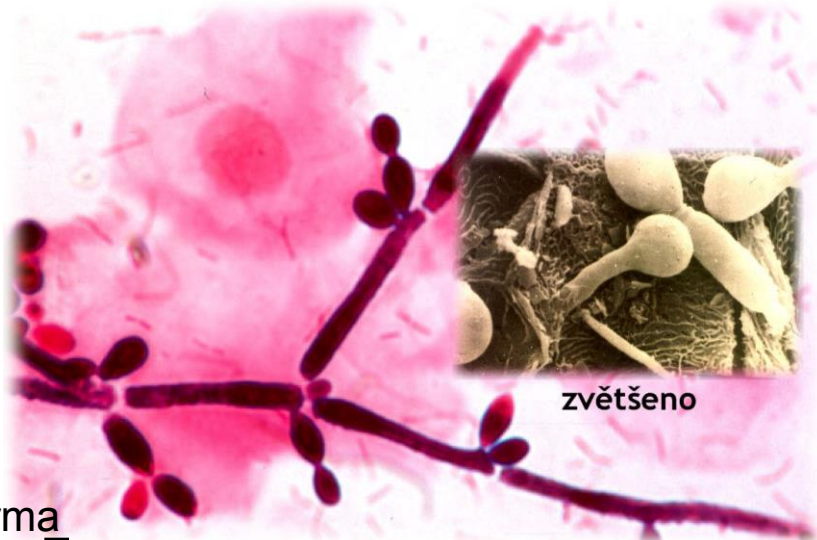
Saccharomyces



Saccharomyces cerevesiae



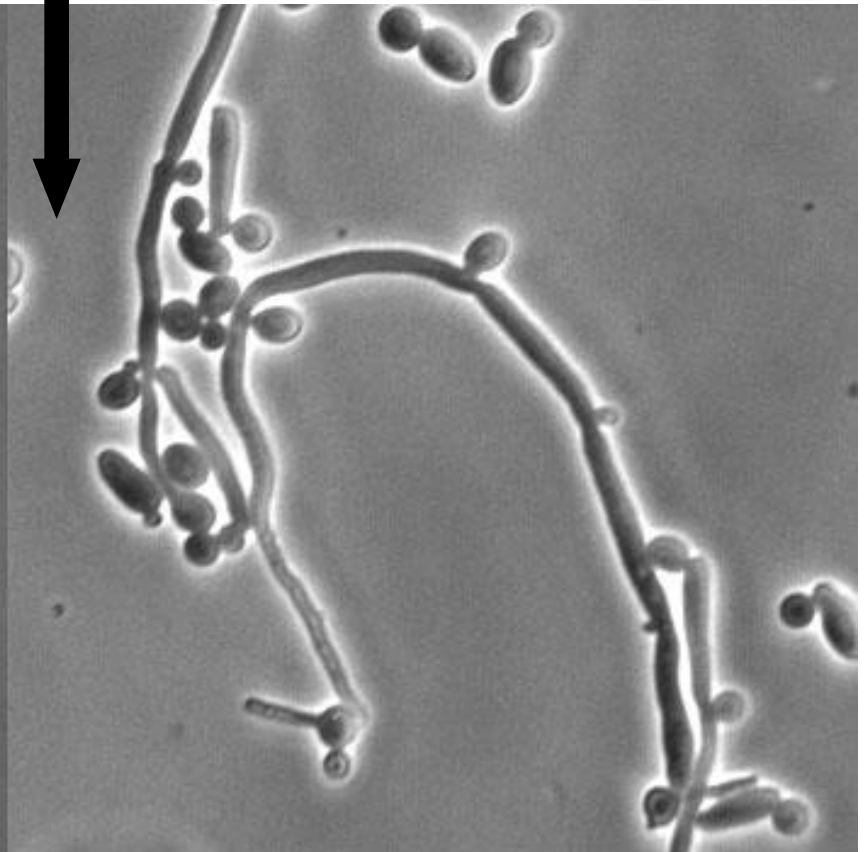
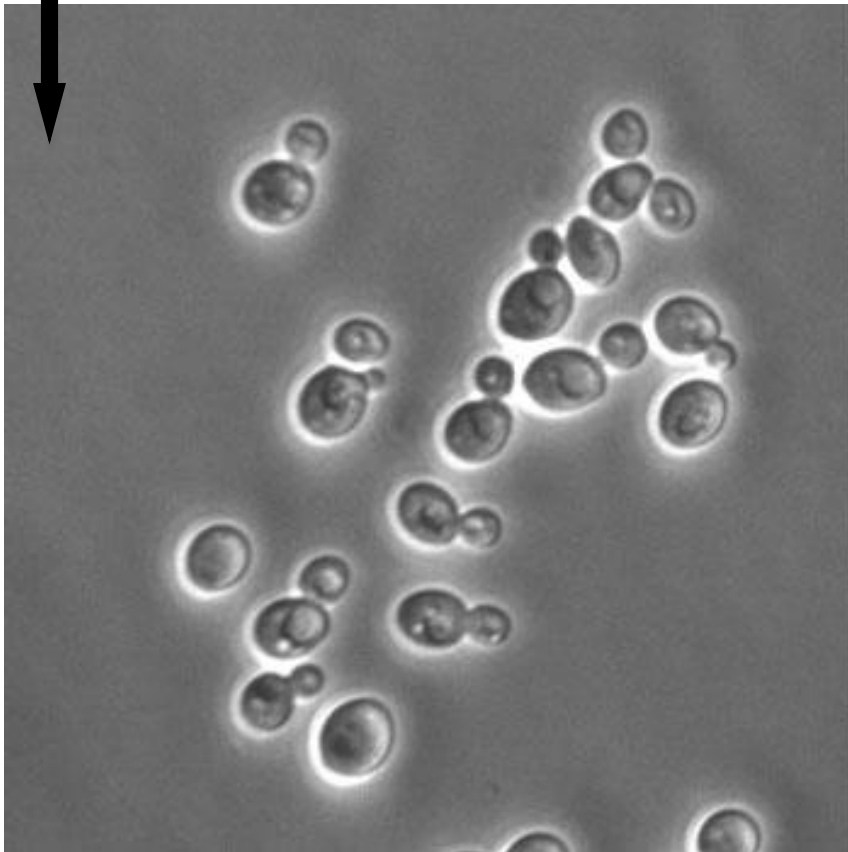
Candida



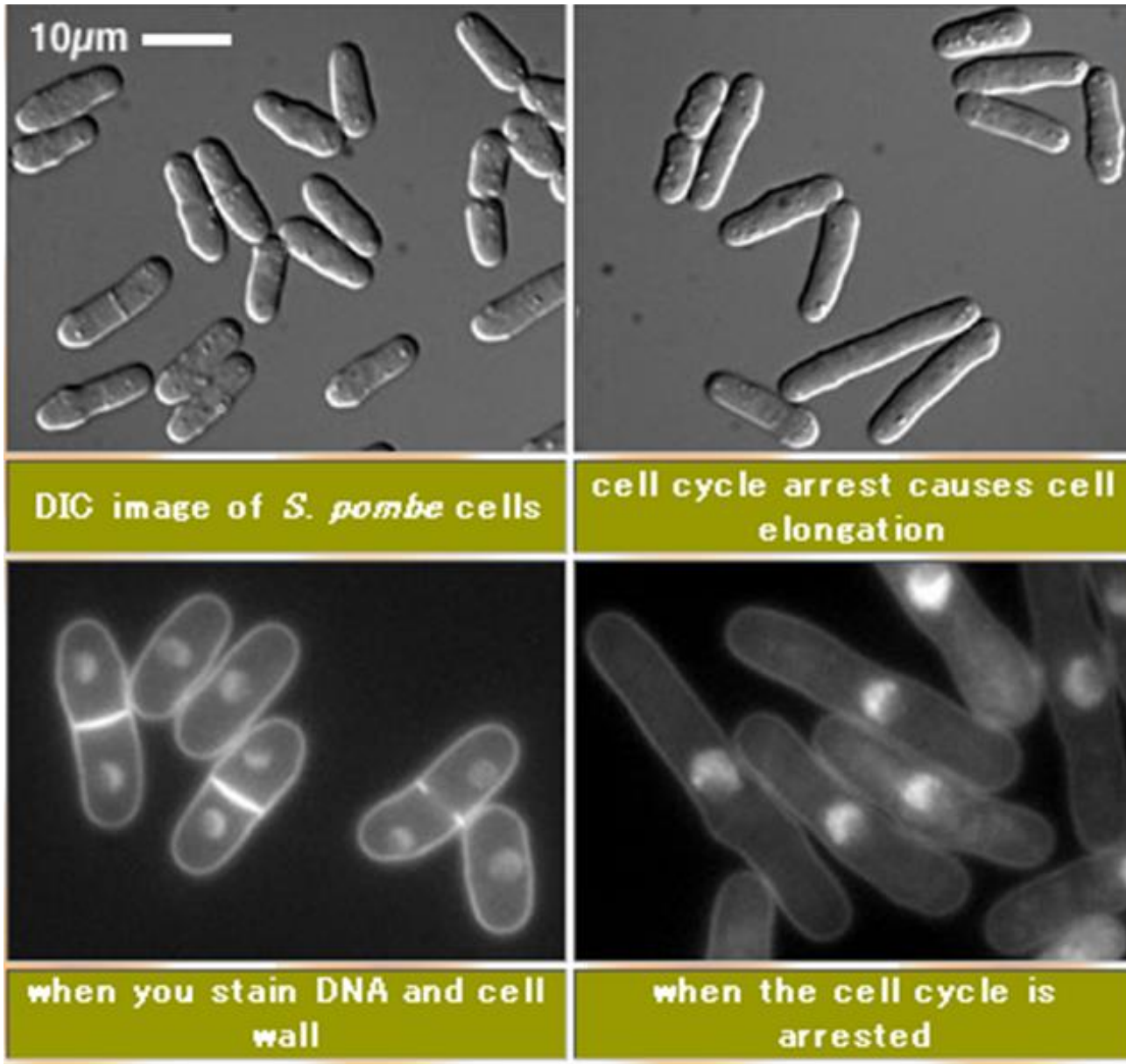
Kvasinkovitá forma – nepatogenní



Tvorba mycelia – patogenní forma



Schizosaccharomyces pombe





Yeast Pee!

The alcohol you like to drink is yeast pee, a waste byproduct produced by yeast through the process of fermentation! The image shows a yeast cell budding off an "offspring," as well as the cells relieving themselves of their waste alcohol.

Postup – práce ve dvojici

- Ze suspenze buněk pipetovat 1 ml do sterilní vody
- Z naředěné suspenze pipetovat 1 ml do každé ze 4 zkumavek
- Vzorky budou zahřívány při 60°C po dobu **0; 7; 14 a 21 min**

- Stanovení počtu mrtvých a živých buněk v Bürkerově komůrce (nanést kapku suspenze do komůrky, přikrýt krycím sklíčkem, k okraji přikápnout methylenovou modř, na opačné straně ji odsát filtračním papírem)

- Po 2 min se buňky usadí, **mrtvé jsou obarveny modře**
- Pozorujeme při zvětšení 400x

- Spočítat mrtvé namodralé a živé nezbarvené buňky min. v 10-ti čtverečkách

- Postup opakovat pro každý čas
- Z hodnot vytvořit tabulku a graf (v MS exel) závislosti přeživších buněk na čase (celkový počet buněk – čas 0 min)

Výpočet:

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

N = celkový počet buněk

