

# 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

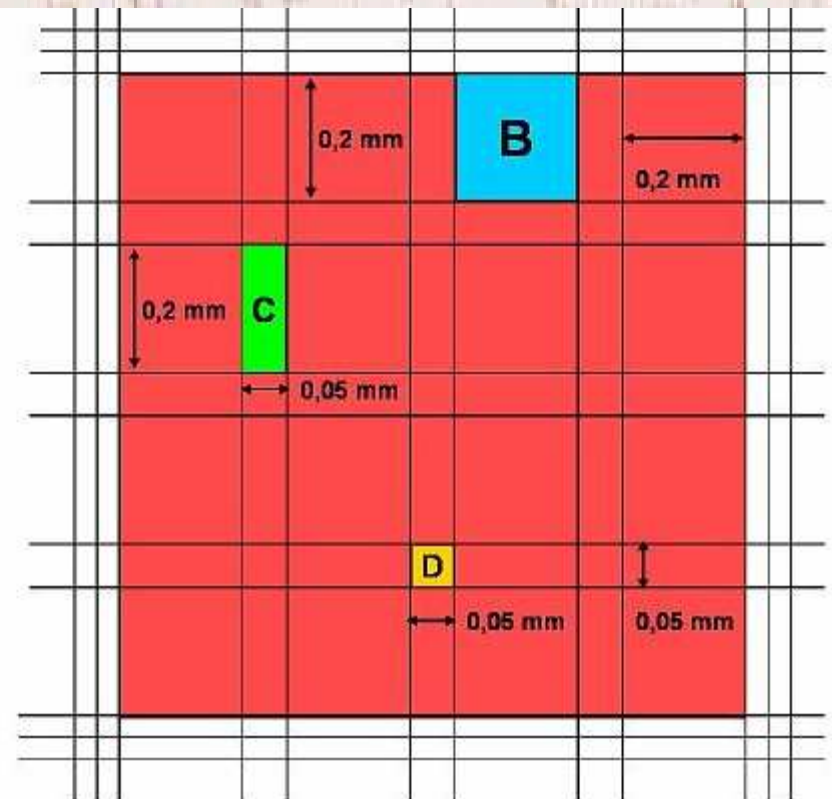
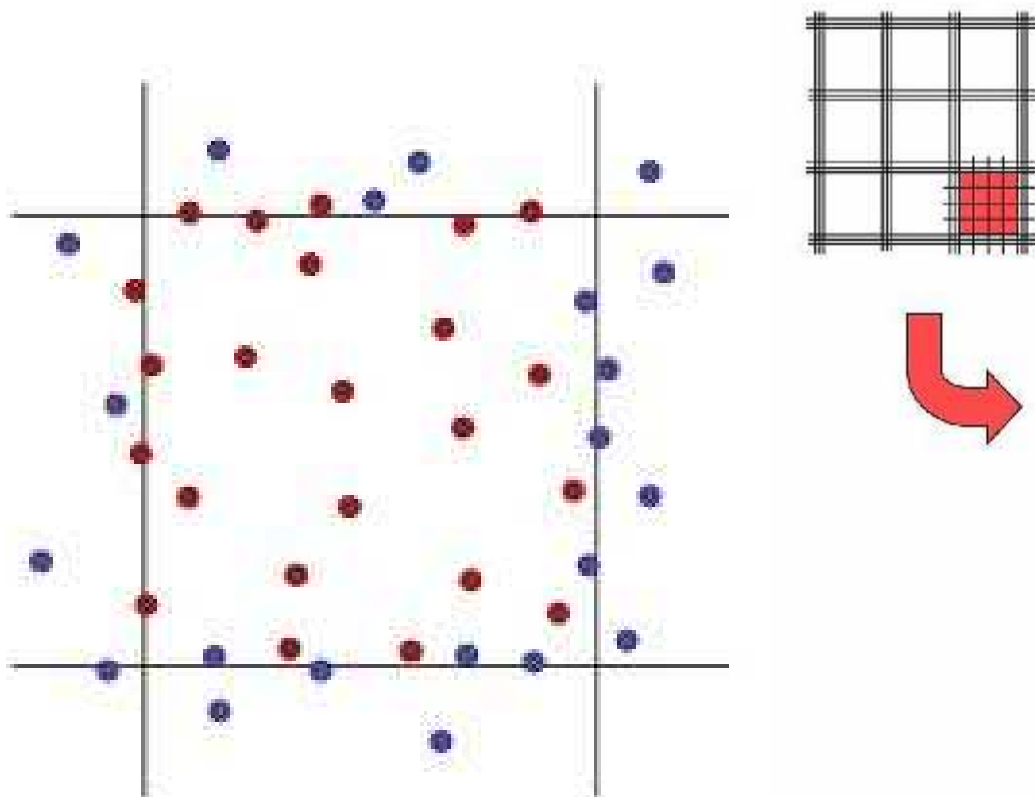
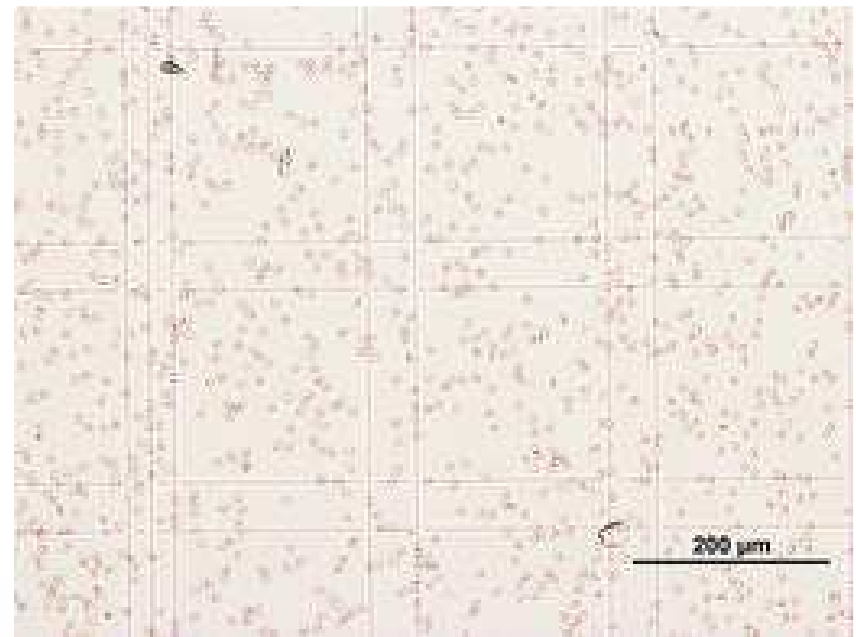
## Přímé stanovení počtu buněk

- 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, plocha čtverečku je  $0,0025 \text{ mm}^2$
- 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)

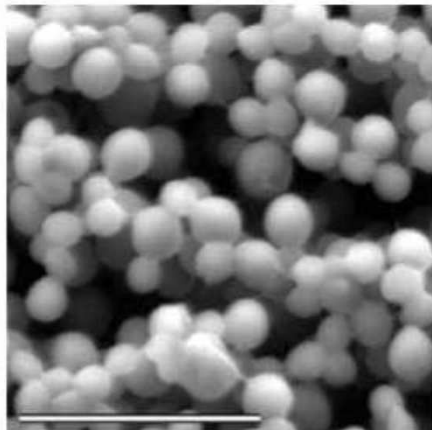
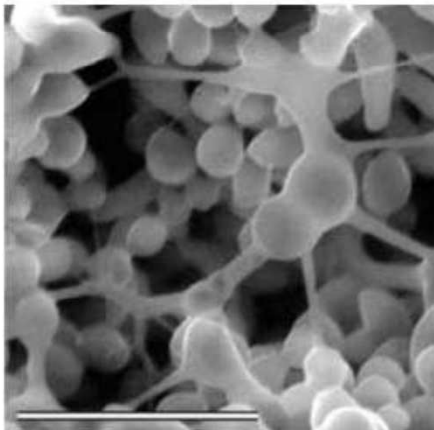
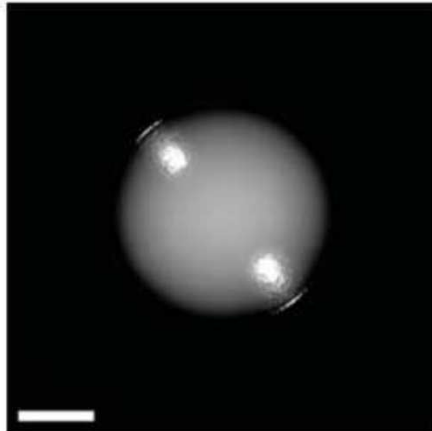
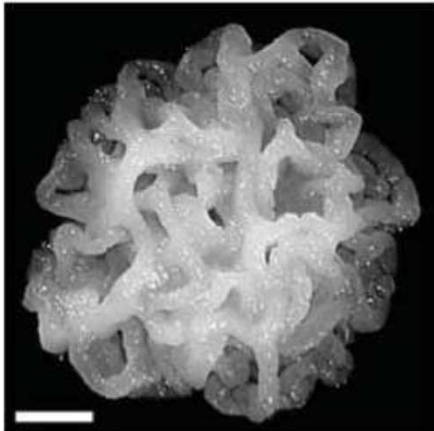
!! Počítat jen 2 strany – levou + horní  
nebo spodní + pravou



# Kvasinky

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

# *Laboratorní x wild type*



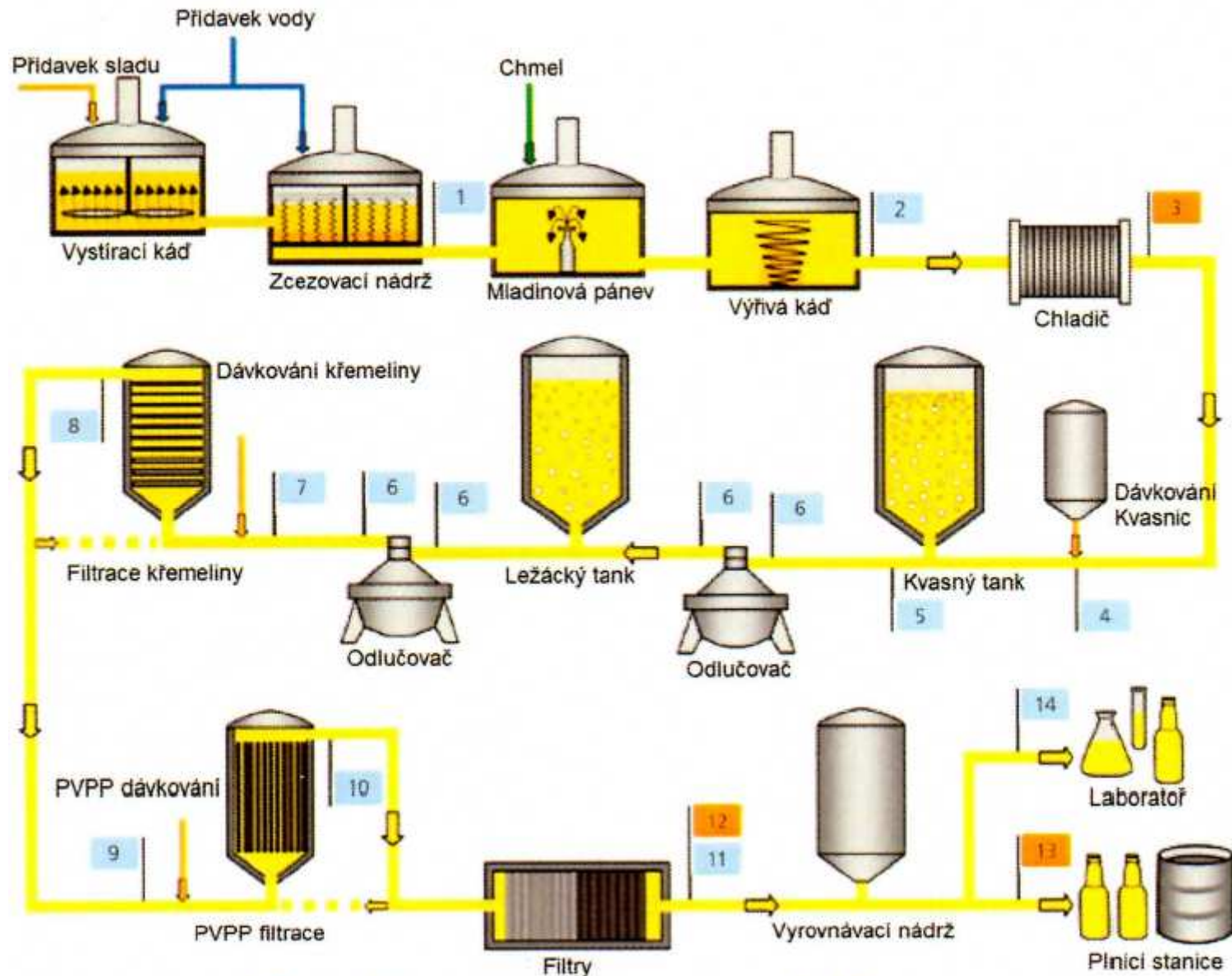
## Využití

- 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

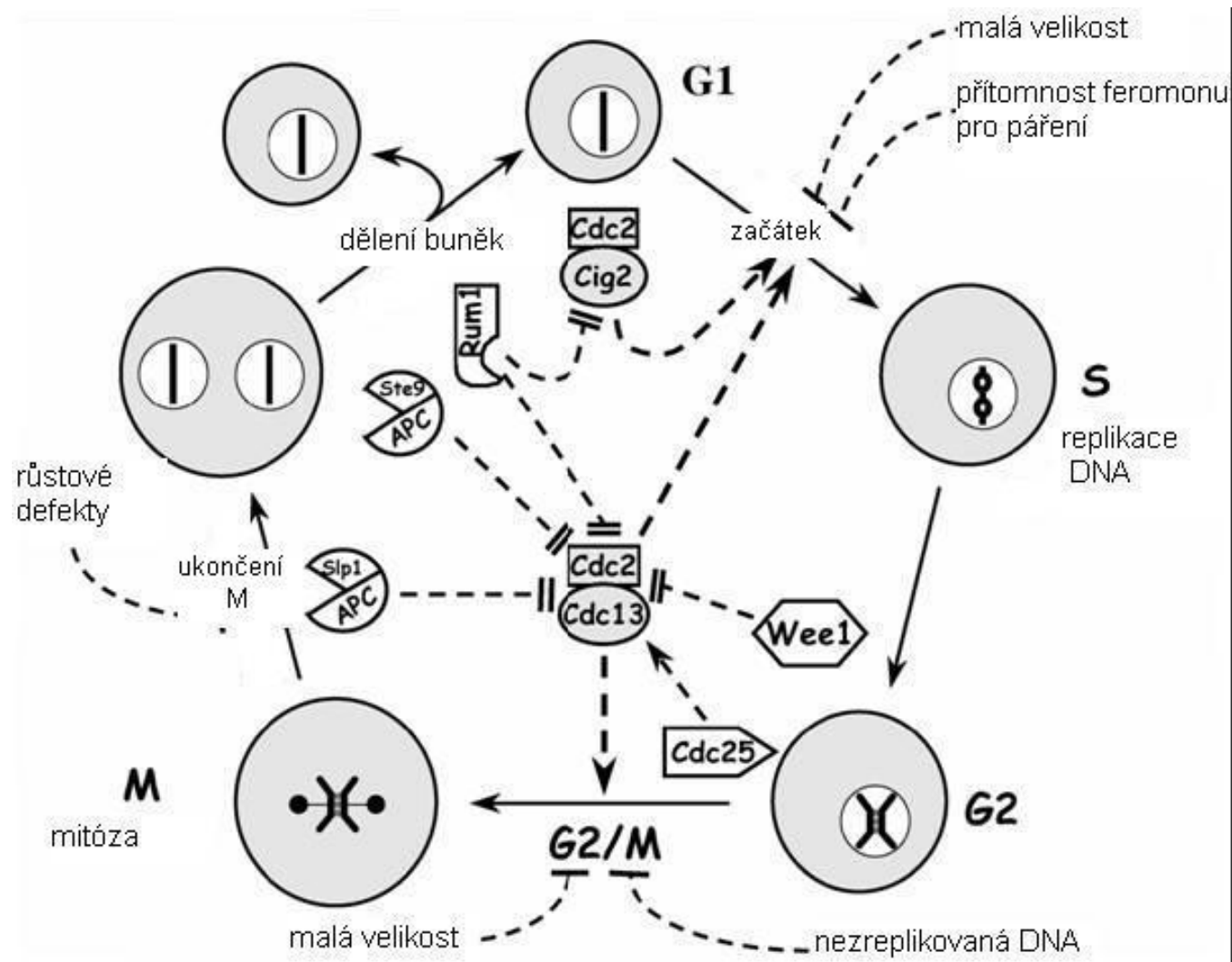
## Patogenita

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

# Výroba piva

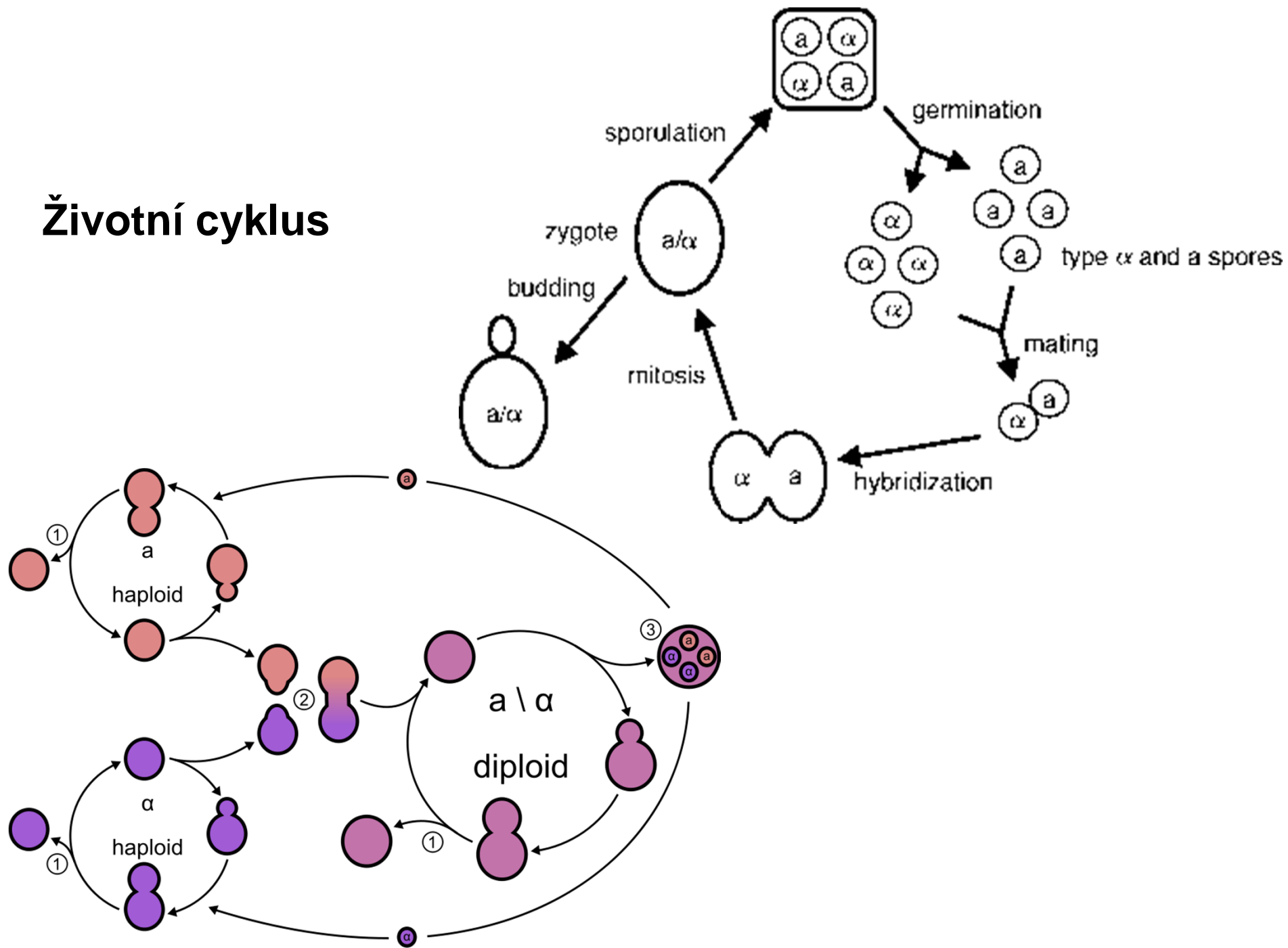


# Buněčný cyklus u kvasinek



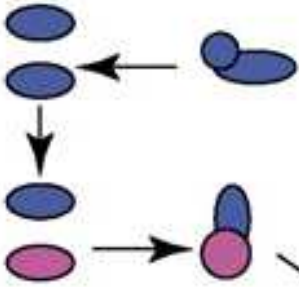


# Životní cyklus

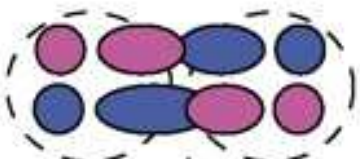


# Životní cyklus *S. cerevisiae*

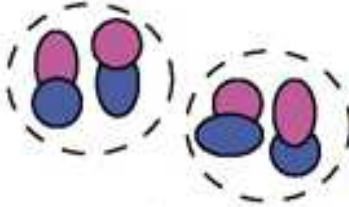
Autodiploidization



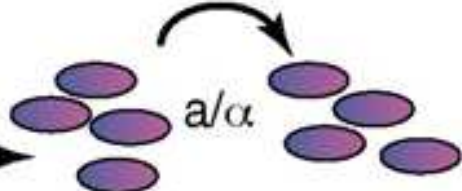
Outcrossing



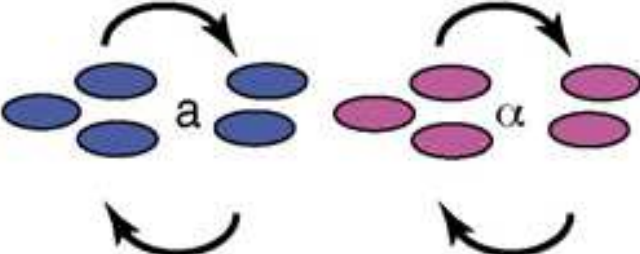
Intratetrad mating



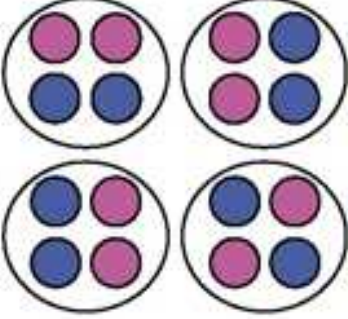
Diplophase



Clonal reproduction



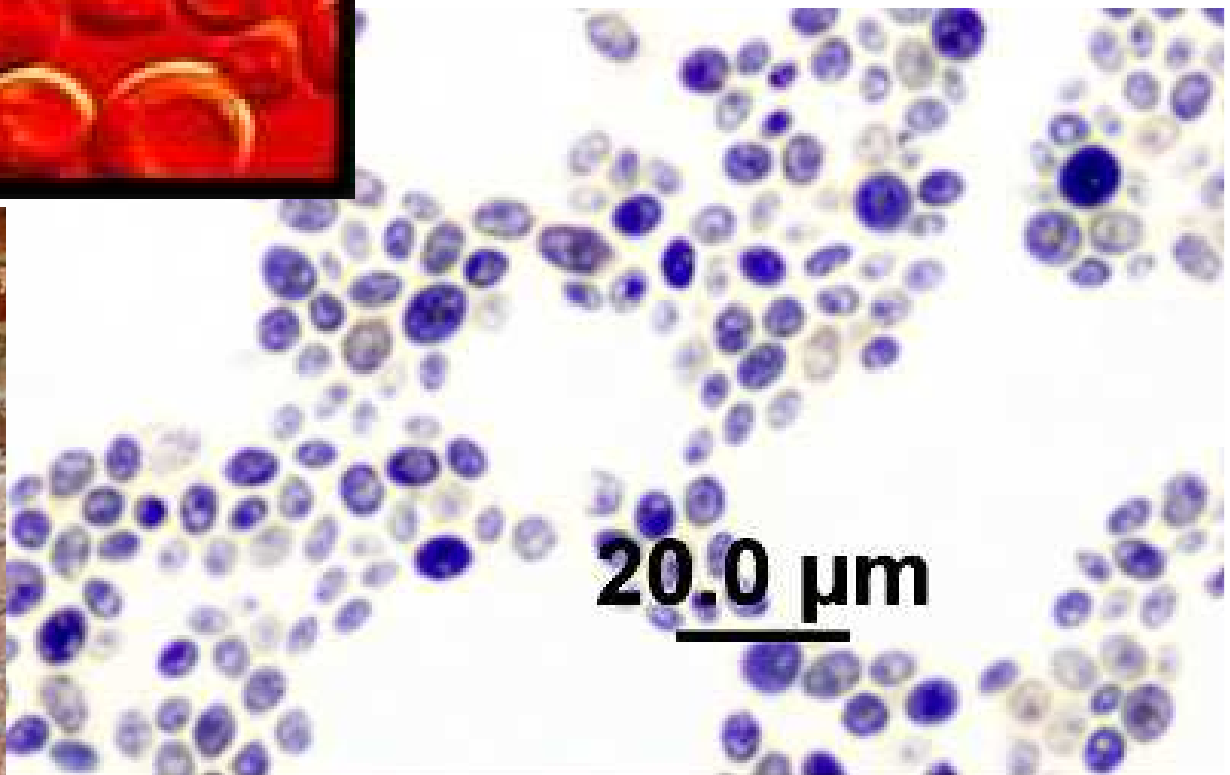
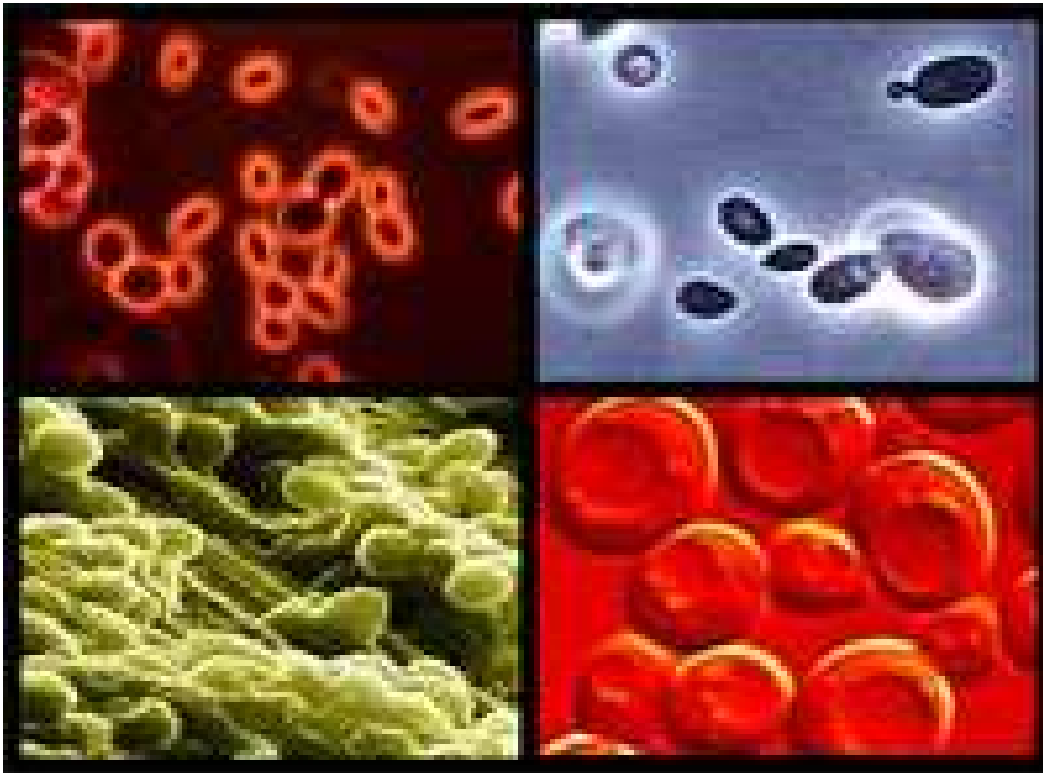
Sporulation



Germination

Germination

*Saccharomyces*

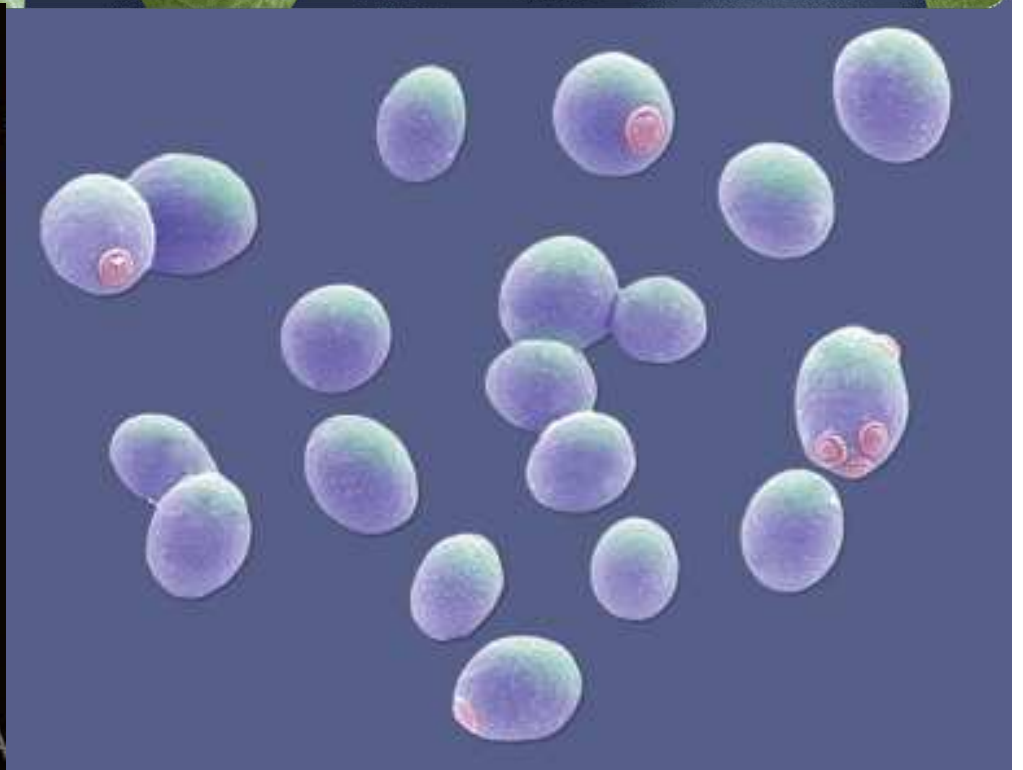
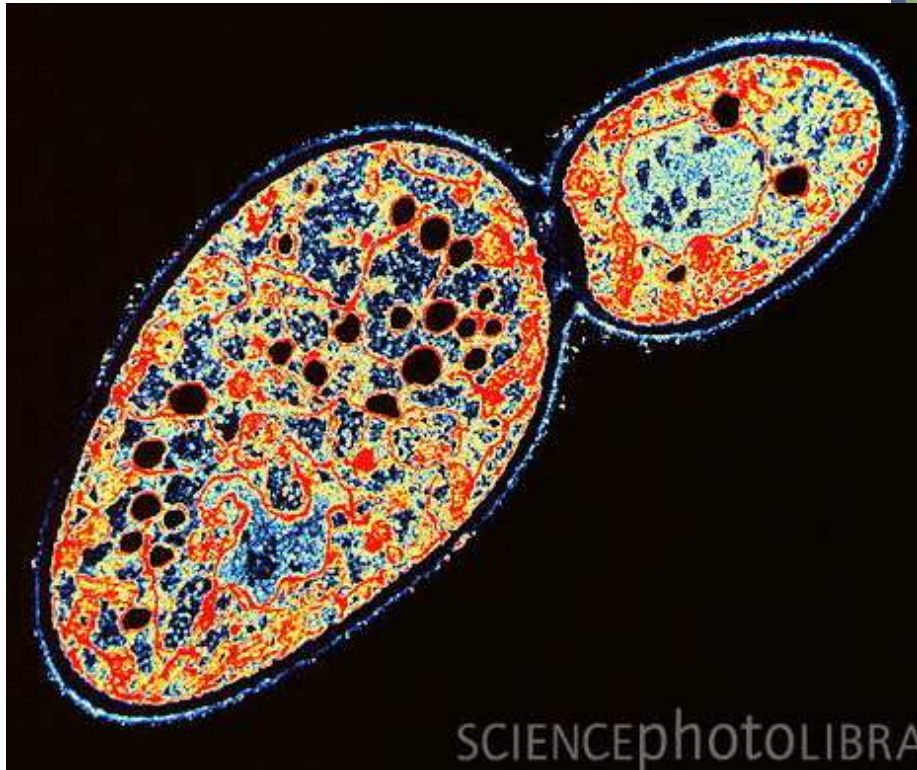
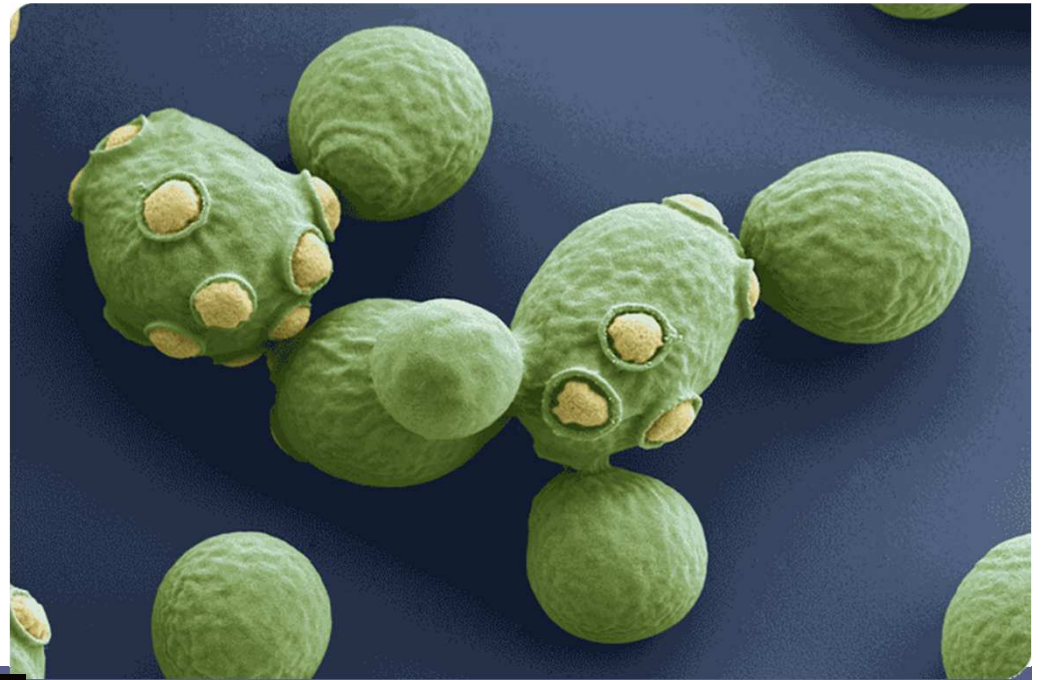


20.0  $\mu\text{m}$

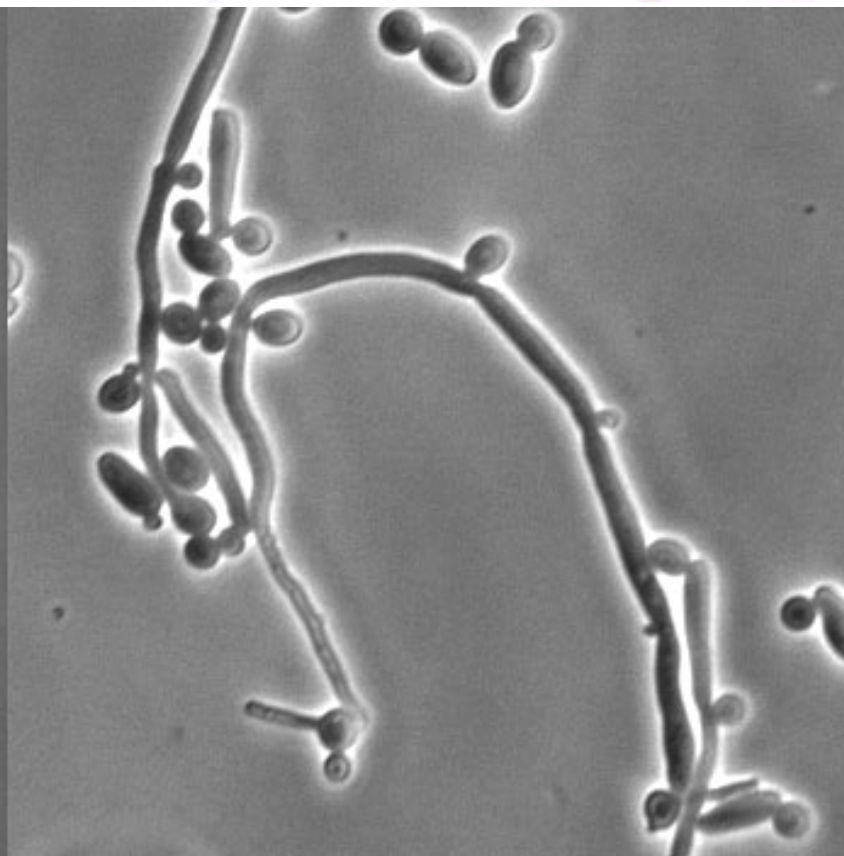
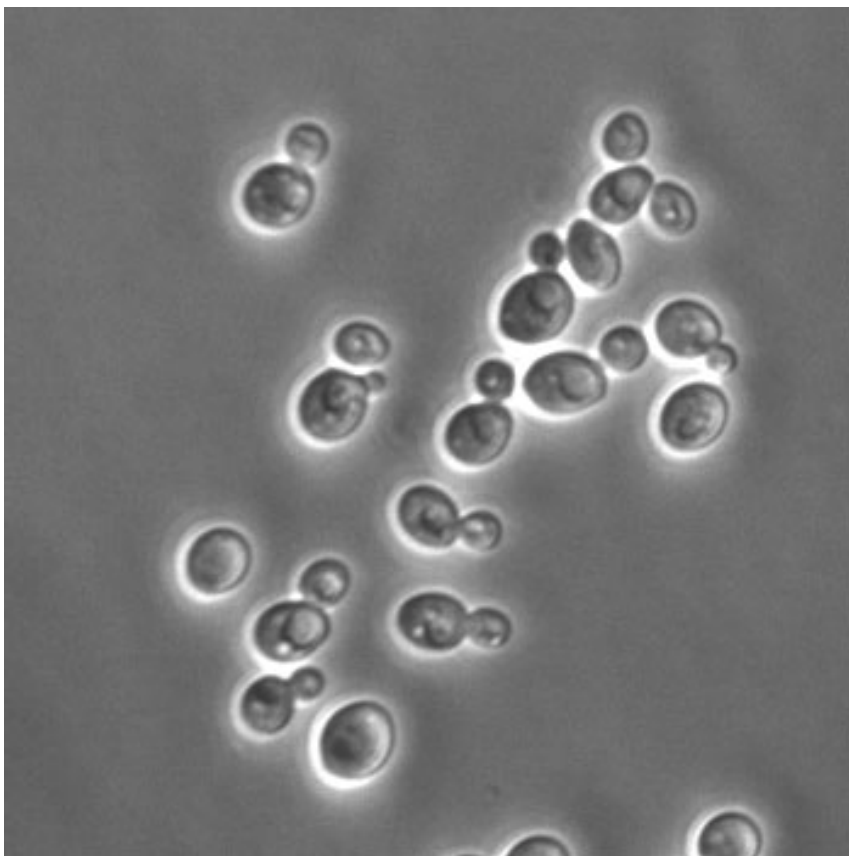
*Saccharomyces cerevesiae*



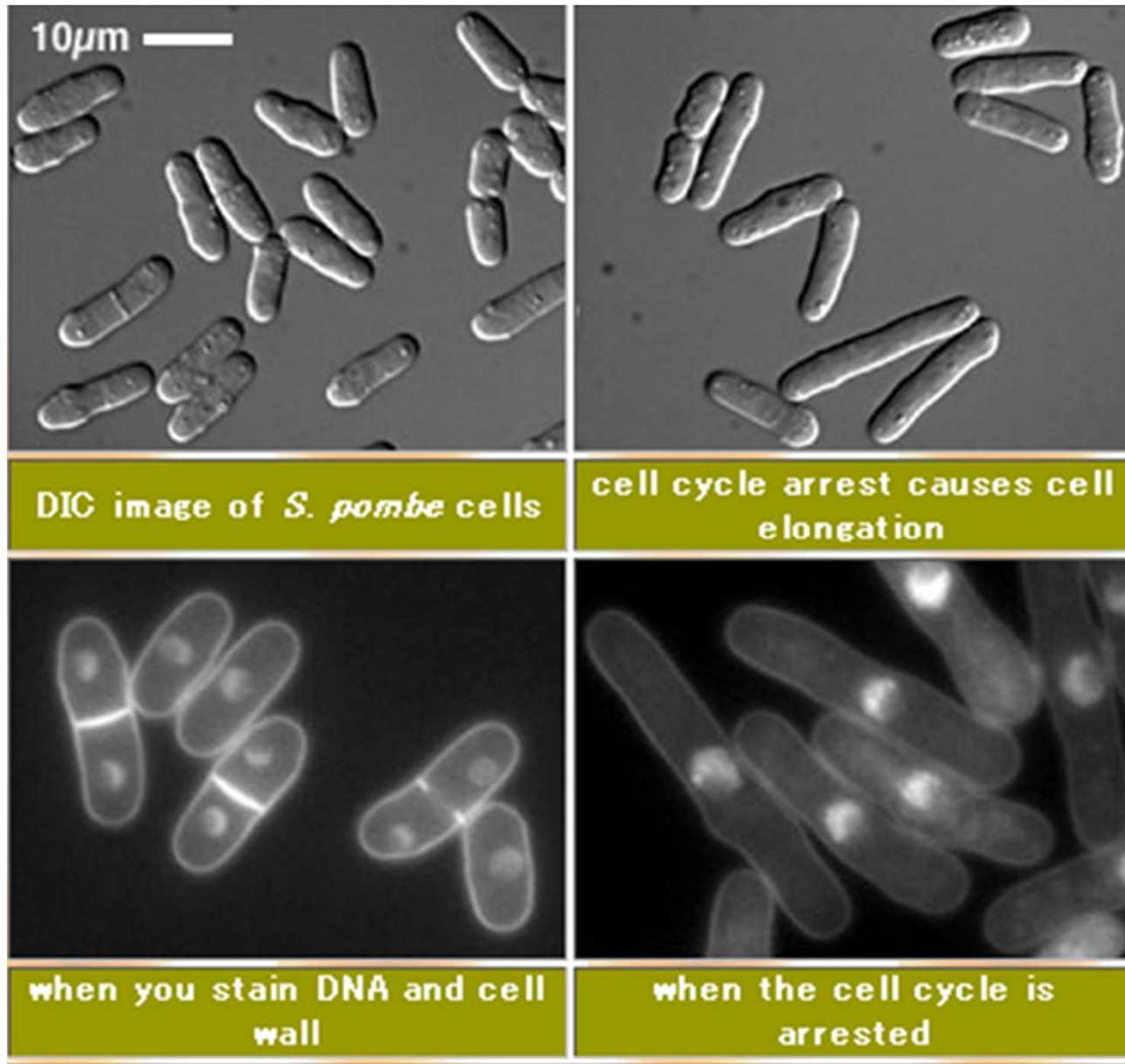
# *Saccharomyces*

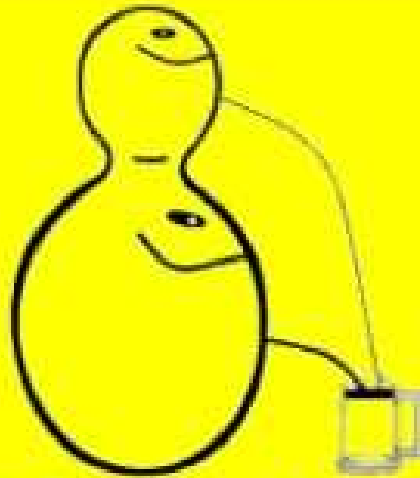


# *Candida*



# *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

- 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; 5; 10 a 15 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 čtverečcích
- Postup opakovat pro každý čas
- Z hodnot vytvořit tabulku a graf závislosti přeživších buněk na čase (celkový počet buněk – čas 0 min)