

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ MIKROSKOPIE A PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE KE
STANOVENÍ MOLEKULÁRNÍCH CHARAKTERISTIK
KAROTENOGENNÍCH KVASINEK

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

HANA VACKOVÁ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ MIKROSKOPIE A PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE KE STANOVENÍ MOLEKULÁRNÍCH CHARAKTERISTIK KAROTENOGENNÍCH KVASINEK

USE OF MICROSCOPY AND FLOW CYTOMETRY TO MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
CAROTENOGENIC YEASTS.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

HANA VACKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0946/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Hana Vacková	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.	

Název bakalářské práce:

Využití mikroskopie a průtokové cytometrie ke stanovení molekulárních charakteristik karotenogenních kvasinek

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše zaměřená na fluorescenční metody využitelné k charakterizaci karotenogenních kvasinek
2. Zavedení a optimalizace potřebných metod - kultivační techniky, průtoková cytometrie, fluorescenční mikroskopie.
3. Experimentální studie - studium vybraných molekulárních charakteristik několika druhů karotenogenních kvasinek.
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Hana Vacková
Student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

Abstrakt

Cílem práce bylo optimalizovat metody pro studium kvasinek s využitím průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie. V teoretické části se pojednává o struktuře buněk kvasinek, o principech a využití průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie. Byla též zpracována rešerše na téma využití mikroskopie a průtokové cytometrie u pigmentovaných mikroorganismů. V experimentální části byla provedena optimalizace metod na kvasinkách *Cystofilobasidium capitatum*, *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces roseus* a *Sporobolomyces shibatanus*. Dále byla měřena růstová křivka a životaschopnost kvasinek při působení teplotního stresu - mražení a teplotního šoku 60 °C. Bylo prokázáno, že *Cystofilobasidium capitatum* je vůči stresu odolnější než *Rhodotorula glutinis*. Dále byla zjištěna možnost použití methylenové modři namísto propidium jodidu k analýze buněk průtokovou cytometrií.

Abstract

The aim of presented bachelor thesis is to optimize the methods for study of yeasts using flow cytometry and fluorescence microscopy. The theoretical part deals with the structure of yeast cells, principles and application of flow cytometry and fluorescent microscopy. Use of microscopy and flow cytometry in study of pigmented microorganisms was reviewed too. In the experimental part methods optimization was performed on yeasts *Cystofilobasidium capitatum*, *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces roseus*, *Sporobolomyces shibatanus*. Further, the growth curve and the viability of yeasts under the influence of stress factors (freezing and the heat shock 60 °C) was measured. *Cystofilobasidium capitatum* has shown to be more resistant to stress than *Rhodotorula glutinis*. It was found that there is the possibility of using methylene blue instead of propidium iodide in yeast cell analysis by flow cytometry.

Klíčová slova

životaschopnost, průtoková cytometrie, *Cystofilobasidium capitatum*, *Sporobolomyces roseus*, *Sporobolomyces shibatanus*, *Rhodotorula glutinis*

Keywords

viability, flow cytometry, *Cystofilobasidium capitatum*, *Sporobolomyces roseus*, *Sporobolomyces shibatanus*, *Rhodotorula glutinis*

VACKOVÁ, H. *Využití mikroskopie a průtokové cytometrie ke stanovení molekulárních charakteristik karotenogenních kvasinek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015.49s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Ivany Márové, CSc. Další informace mi poskytla Ing. Andrea Hároníková, Ph.D. Uvedla jsem všechny literární prameny a publikace, ze kterých jsem čerpala. Bakalářská práce je majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí své bakalářské práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc., za odborné vedení, za ochotu a pomoc. Určitě bych také ráda poděkovala Ing. Andree Hároníkové Ph.D., za ochotu, vstřícný přístup, cenné rady a pomoc v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat všem z laboratoře, se kterými jsem pracovala, a za pomoc při obsluze některých přístrojů. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala své rodině a příteli za podporu.

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Cytologické metody k charakterizaci kvasinek a jejich metabolitů	8
2.1.1	Fluorescenční mikroskopie	8
2.1.2	Průtoková cytometrie	9
2.2	Kvasinky.....	11
2.2.1	Rozmnožování.....	11
2.3	Modelový organismus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
2.3.1	Buňka kvasinky.....	12
2.4	Využití mikroskopie a průtokové cytometrie ke sledování <i>Sacchromyces cerevisiae</i>	15
2.5	Karotenogenní kvasinky	15
2.5.1	Rod <i>Rhodotorula</i>	15
2.5.2	Rod <i>Cystofilobasidium</i>	15
2.5.3	Rod <i>Sporobolomyces</i>	16
2.6	Karotenoidy	16
2.6.1	Vlastnosti	16
2.6.2	Struktura	16
2.6.3	Použití	17
2.6.4	Buněčná stěna karotenogenních kvasinek.....	17
2.7	Využití mikroskopie a průtokové cytometrie u pigmentovaných mikroorganismů	18
3	CÍL PRÁCE	19
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
4.1	Použité chemikálie	19
4.1.1	Chemikálie použité pro kultivaci kvasinek	19
4.1.2	Chemikálie použité pro průtokovou cytometrii a fluorescenční mikroskopii	19
4.2	Přístroje a pomůcky	19
4.3	Použité kvasinkové kmeny	19
4.4	Kultivace mikroorganismů	20
4.4.1	Kultivace kmenů karotenoidů	20

4.4.2	Volba inokula	20
4.5	Použití průtokové cytometrie.....	20
4.6	Fluorescenční mikroskopie.....	21
4.7	Růstová křivka	21
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	23
5.1	Průtoková cytometrie	23
5.1.1	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	23
5.1.2	<i>Rhodotorula glutinis</i>	25
5.1.3	<i>Sporobolomyces roseus</i>	26
5.1.4	<i>Sporobolomyces shibatanus</i>	26
5.2	Mikroskopické pozorování.....	27
5.2.1	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	27
5.2.2	<i>Rhodotorula glutinis</i>	28
5.2.3	<i>Sporobolomyces shibatanus</i>	29
5.2.4	<i>Sporobolomyces roseus</i>	29
5.3	Sledování růstové křivky pomocí fluorescenčních technik.....	30
5.3.1	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	30
5.3.2	<i>Rhodotorula glutinis</i>	36
6	ZÁVĚR.....	45
7	LITERATURA.....	46
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	49

1 Úvod

Kvasinky patří mezi houby *Fungi*. Karotenogenní kvasinky patří mezi *Basidiomycety*. Jejich metabolismus je přísně aerobním metabolismem. Karotenoidy se řadí do pigmentů žluté až červené barvy. Obsahují je živočišné i rostlinné buňky. Kvasinky mají buněčnou stěnu tvořenou dvěma vrstvami, proto je potřeba pro její rozrušení použít mechanické či nemechanické metody. Karotenoidy se využívají jako antioxidanty, vyskytují se v ovoci a zelenině. Mezi karotenogenní kvasinky, které jsou schopny produkovat karotenoidy, patří rody *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cystofilobasidium*.

Předložená práce je zaměřena na možnosti aplikace fluorescenčních technik při studiu karotenogenních kvasinek s potenciálním využitím autofluorescence karotenoidů. Byla provedena optimalizace metod stanovení životaschopnosti buněk pomocí fluorescenčních sond, průtokového cytometru a fluorescenčního mikroskopu. Pomocí fluorescenčních technik byla dále studována růstová křivka karotenogenních kvasinek. Růstová křivka má 4 fáze. První je lag fáze, v které dochází k adaptaci na prostředí, poté nastupuje exponenciální fáze, což je fáze zrychleného růstu. Předposlední fází je stacionární fáze a poté fáze odumírání buněk. Fluorescenční analýza může být užitečná k citlivému sledování změn růstové a metabolické aktivity pigmentových kvasinek v různých fázích růstu. Též může být využita ke sledování změn kvasinkových kultur vystavených vnějšímu stresu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Cytologické metody k charakterizaci kvasinek a jejich metabolitů

Kvasinková cytologie nám dává informace o morfologii buněk. Cytologické metody zahrnují vizualizaci buněk a izolaci buněčných organel. Některé kvasinkové organely a makromolekulární struktury mají hlavní roli v kvasinkové biotechnologii. V laboratořích se používá více typů mikroskopů. Mikroskopy mají různé modifikace. Pomocí světelného mikroskopu lze získat informace o struktuře na neobarvených kvasinkových buňkách. Pokud bude použito zvětšení 1000 lze pozorovat vakuoly. Při použití barvení lze pozorovat i buněčné struktury [1,2].

Tabulka 1: Používané fluorescenční sondy v průtokové cytometrii [3]

Předmět barvení	Fluorescenční sonda
DNA,RNA	Ethidium bromid
	Propidium jodid
DNA	DAPI
Lipidy	Nilská červen
Životaschopnost	Methylenová modř
Mitochondrie	Rhodamin, DAPI

2.1.1 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je neinvazivní metoda, patří mezi zobrazovací techniky a může být použita pro studium buněčných procesů in vivo. Detekce fluorescence může být endogenní (autofluorescence buněčných složek) nebo exogenní (s využitím fluorescenčních barviv). Endogenní fluorofor je například chlorofyl, který je známý díky své autofluorescenci. Fluorescence karotenoidů v roztoku byla zjištěna v předchozích letech [4]. Při pozorování lze použít i fluorescenční barviva, která se používají ke zvýraznění některých prvků. Například methylenová modř se používá k pozorování vitality buněk a váže se na proteiny, ethidium bromid se váže na DNA atd [4].

Fluorescenční mikroskop má čtyři hlavní části:

- **Excitační filtry:**
Filtr propustí pouze takové světlo, které potřebujeme k fluorescenci vzorku. Ostatní světlo je pohlceno.
- **Fluorescenční preparát:**
Naše vzorky by měly reagovat fluorescencí. Samotný vzorek může být fluoroforem nebo mohou poskytovat fluorescenci po přidání sondy.
- **Bariérový filtr:**
Takovýto filtr pohlcuje všechno excitační světlo, které nebylo využito při excitaci. Propouští pouze fluorescenční světlo. Lze nechat projít pouze část fluorescenčního spektra.

- **Zdroj světla:**

Ze zdroje vychází světlo o různých vlnových délkách (ultrafialové až infračervené) [5].

2.1.1.1 Fluorochromy a světlo

Fluorochromy jsou v podstatě barviva, která přijímají světelnou energii (například z laseru) při dané vlnové délce a opět vyzařují na delší vlnové délce. Tyto procesy se nazývají excitace a emise. Proces emise je velmi rychlý v řádech nanosekund a je známý jako fluorescence. Když je světlo absorbováno elektrony, přechází do klidového stavu [6].

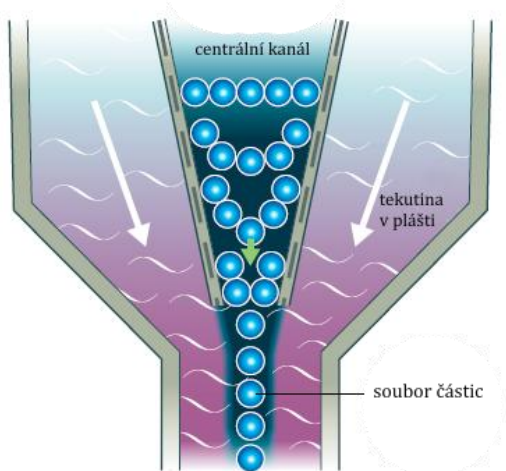
2.1.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je rychlá metoda pro kvantifikaci vlastností buněk. Nicméně většina průtokových cytometrů nemůže přímo poskytnout informaci o koncentraci buněk nebo o jejich absolutním počtu ve vzorku [7].

Je to fluorescenční optická metoda, kde je vzorek unášen proudem nosné kapaliny. Průtokový cytometr má několik částí: excitační zdroj, měřicí optické cely, detektor, systém zrcadel, optické filtry a několik fluorescenčních detektorů. Excitačním zdrojem bývá buď laser, nebo rtuťová výbojka. Touto metodou lze získat informace o rozložení velikosti, granularity buněk v populaci, lze sledovat změnu rychlosti růstu, určit počet mrtvých buněk, sledovat buněčný cyklus, měřit velikost a počet buněk. Výhodou je, že můžeme získat informace o velkém souboru buněk v relativně krátkém čase. Výsledky jsou zobrazovány ve formě histogramů. Můžeme třídit buňky na principu fyzikální separace [8].

2.1.2.1 Fluidní systém

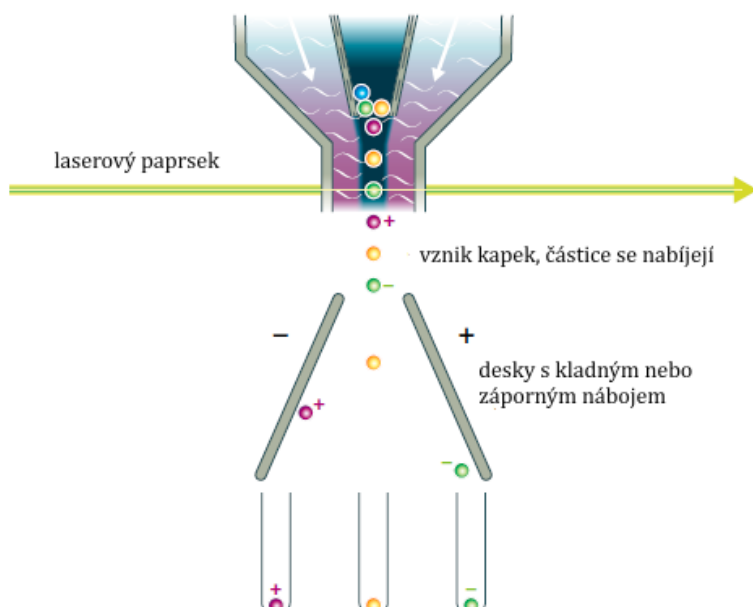
Jedním ze základních prvků průtokové cytometrie je možnost měřit vlastnosti jednotlivých částic. Fluidní systém se skládá z centrálního kanálu, kam je vstřikován vzorek. Kanál je obklopen vnějším pláštěm, který obsahuje rychle proudící kapalinu. Při pohybu kapaliny se utvoří masivní táhnoucí účinek zúženou komorou, vytvoří se jediný soubor částic, který je označován jako tzv. hydrodynamické zaostřování. Za optimálních podmínek nebude vzorek v komoře smíchán s kapalinou v plášti [6].



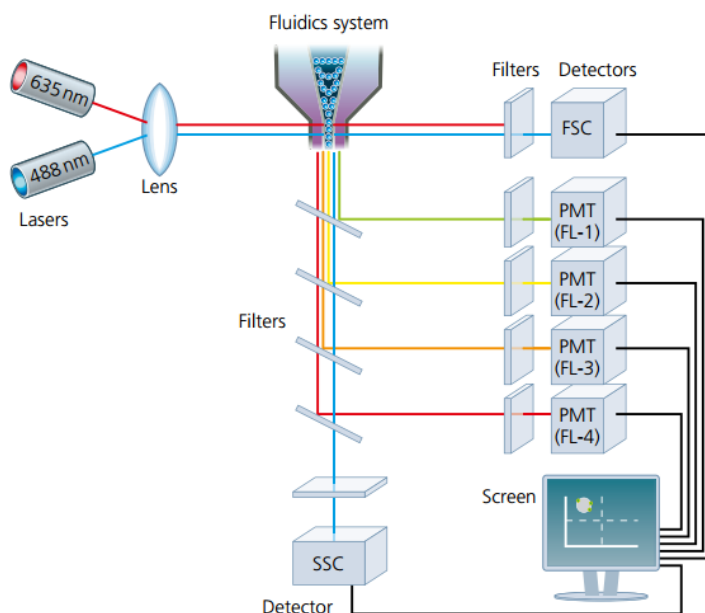
Obrázek 1: Fluidní systém [6]

2.1.2.2 Elektrostatické třídění buněk

Průtoková cytometrie je používána k třídění buněk podle typu nebo antigenních determinantů. Každá částice je zkoumána paprskem světla, který je dále porovnán se zadanými kritérii pro třídění. Pokud částice odpovídá určitým kritériím, je proud tekutiny nabit na výstupu z trysky. Elektrostatický náboj získá částice v určitém okamžiku, kdy se kapička, která obsahuje částice, které požadujeme, oddělí od proudu. V tuto chvíli vznikne aerosol. Rychlost průtoku je závislá na určitých vlastnostech, jako je např. velikost částic a rychlost tvorby kapky. Typická tryska má rozmezí 50–70 μm a rychlost kapání je 30 000–100 000 kapiček za sekundu, toto je ideální pro přesné třídění. Podle rychlosti se částice separují s čistotou 90–99% (Obr. 2) [9].



Obrázek 2: Elektrostatické třídění buněk [6]



Obrázek 3: Schéma průtokového cytometru [6]

2.2 Kvasinky

Kvasinky patří mezi houby (*Fungi*). Dále lze kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy dělit do čtyř skupin:

- 1) kvasinky, které patří mezi askomycety, tvoří askospory
- 2) kvasinky, které patří mezi bazidiomycety
- 3) kvasinky, které jsou řazené do čeledi *Sporobolomycetaceae*
- 4) sporogenní kvasinky, netvoří askospory, spory

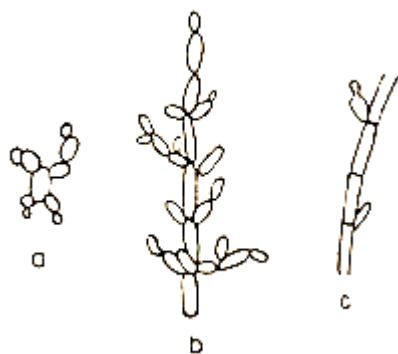
Jsou to heterotrofní, eukaryotní, jednobuněčné organizmy. Umí zkvašovat sacharidy na ethanol a oxid uhličitý. Kvasinky mají tvar odvozený od elipsoidu (citronový, lahvovitý, trojúhelníkovitý, válcovitý). Rozmnožují se pučením nebo dělením [10,11].

2.2.1 Rozmnožování

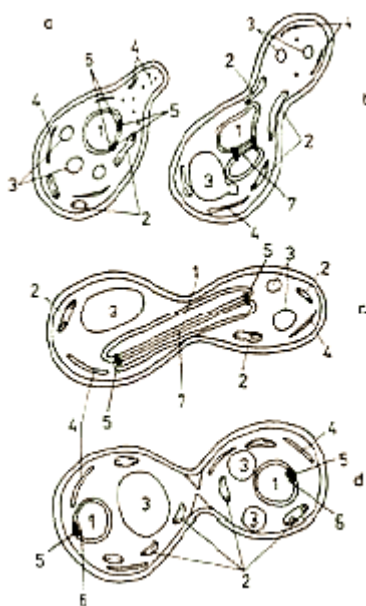
Kvasinkové mikroorganismy se mohou rozmnožovat dvěma způsoby – vegetativně, nebo pohlavně.

2.2.1.1 Vegetativní rozmnožování

Vegetativní rozmnožování u kvasinek je pučení. Nejprve dochází ke splývání membrán endoplazmatického retikula a poté k opakovanému dělení vakuol. Mitochondrie mění svůj tvar na protáhlý. Po vytvoření pupenu do něj vstupují mitochondrie a drobné vakuoly. Nastává mitotické dělení jádra. Po mitóze jádro putuje do pupenu spolu s dalšími složkami cytoplazmy. Poté dochází k uzavření kanálku mezi dceřinou a mateřskou buňkou. Po vytvoření buněčné stěny mezi mateřskou a dceřinou buňkou a spojení všech malých vakuol v jednu je dělení u konce. Dceřiná buňka se od mateřské ihned oddělí. Pokud k dělení nedojde, vytvoří se tzv. buněčné svazky [10].



Obrázek 4: Buněčné svazky [10]



Obrázek 5: Vegetativní rozmnožování [10]

2.3 Modelový organizmus *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae je nejlépe geneticky zmapovaná kvasinka. Patří mezi rod *Saccharomyces*, má schopnost kvasit cukry. Používá se k pochopení funkce buněk. Tato kvasinka je hojně využívána v potravinářském průmyslu (výroba vína, piva, droždí). Má výborné fermentační schopnosti a na manipulaci v laboratoři je nenáročná [12].

2.3.1 Buňka kvasinky

Buňka kvasinky je tvořena buněčnou stěnou, cytoplazmatickou membránou a cytoplazmou, která obsahuje další buněčné struktury.

Buněčná stěna je silná, ale zároveň elastická. Dodává buňce tvar a chrání ji před vnějšími vlivy a osmotickým tlakem. Je tvořena polysacharidy (80-90% stěny), které tvoří hustou pevnou síť především z glukánů. U kvasinek může být ve stěně přítomno malé množství lipidů a fosfolipidů [10,13].

2.3.1.1 Cytoplazmatická membrána

Je tenká, tvoří ji lipidy a proteiny. V cytoplazmatické membráně je sídlo transportních mechanismů a také tvoří osmotické rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím [10]. Představuje překážku pro průchod hydrofilních molekul; zabráňuje míchání s vnějším prostředím. Plazmatická membrána *Saccharomyces cerevisiae* je silná 7,5 nm. Lze ji popsat jako fosfolipidovou dvojvrstvu proloženou globulárními proteiny, které tvoří mozaiku tekutin. Lipidová složka obsahuje hlavně fosfolipidy a steroly. Fosfolipidy způsobují tekutost membrány a steroly tuhost. Druhy kvasinek se liší ve struktuře membrány, například pivovarská kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* má 10x vyšší obsah fosfatidylcholinu oproti jiným kmenům [13].

2.3.1.2 Periplazmatická membrána

Je to tenká buněčná stěna spojená s plazmatickou membránou. Periplazma je převážně tvořena proteiny, které zahrnují glykoprotein. Biologický význam periplazmatu je získání enzymu invertázy, který katalyzuje hydrolýzu. Tento enzym má využití v cukrářském průmyslu [13].

2.3.1.3 Cytoplazma

Cytoplazma u mladých buněk kvasinek je průhledná, u starších buněk se objevují zrníčka a vakuolizace. Je zde endoplazmatické retikulum a mitochondrie [10]. Cytoplazma kvasinek je vodná, kyselá a koloidní tekutina, která obsahuje další sloučeniny. Cytoskelet je síť, která poskytuje strukturální uspořádání, obsahuje mikrotubuly a mikrovlákná. Lipidové částice mají funkci skladu, obsahují především estery sterolů, ale ne triglyceridy, a malé množství fosfolipidů, bílkoviny, nenasycené mastné kyseliny [13,10].

2.3.1.4 Endoplazmatické retikulum

Má podobné složení v buňkách rostlin a živočichů. Skládá se ze dvou membrán. Nachází se většinou těsně pod plazmatickou membránou. Povrch membrány ER je na vnitřní straně hladký, vnější strana je zrnitá. V ER probíhá syntéza peptidů a bílkovin [14].

2.3.1.5 Ribozomy

Jsou globulární organely, v průměru mají 20 až 30 nm [14].

2.3.1.6 Golgiho aparát

Organela, která se nachází jen v eukaryotních buňkách. U kvasinek byl Golgiho aparát dokázán pouze u *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe*. U normálně rostoucích kvasinek se tato organela vyskytuje jen ve formě diktyozomu, to znamená ve formě cisteren. Je zřejmé, že tyto organely mají přímý vztah k syntéze buněčné stěny, po dokončení regenerace buněčné stěny počet diktyozomů rychle klesá. Zdá se, že u kvasinek funkci Golgiho aparátu přebírá ER [14].

2.3.1.7 Vakuola

Vakuoly jsou důležité organely v buňkách kvasinek. Obvykle bývá přítomna jedna velká vakuola, nebo několik malých vakuol, které se nakonec spojí v jednu velkou. V průběhu růstové fáze se zde nepozorují žádné strukturní prvky. Bylo zjištěno, že po přidání anorganického fosfátu se ve vakuole začnou tvořit globule, které obsahují polymetafosfát, který tvoří až 37 % obsahu fosforu v buňce. Vakuoly tvoří centrální prostor na ukládání intermediátorů jako rezervy [14].

2.3.1.8 Jádru

Organela nacházející se ve středu buňky nebo excentricky. U kvasinek je jádro poměrně malé. Je ohraničeno jadernou membránou, která je tvořena dvěma membránami. Jaderná membrána má póry, které vyčnívají jako prstence. Základní hmotou jádra je chromatin. V jádře se nachází tzv. polární tělísko, ze kterého vycházejí mikrotubuly, které hrají důležitou roli při rozmnožování buněk.

Jádru obsahuje jadérko. V jadérku je přítomna přibližně jedna pětina RNA celého jádra. Jadérko nemá na povrchu membránu [14].

2.3.1.9 Protoplasty

Protoplast je buňka bez buněčné stěny, v kapalném prostředí má kulový tvar. Buňka je ohraničena pouze membránou [14].

2.3.1.10 Mitochondrie

Nacházejí se v cytoplazmě, počet a tvar mitochondrií závisí na druhu buňky. Nachází se ve všech eukaryotických buňkách. Je tvořena vnitřní a vnější membránou. Vnitřní membrána tvoří do vnitřku mitochondrie záhyby (kristy). Mitochondrie kvasinek obsahují bílkoviny, lipidy a např. RNA a DNA. V mitochondriích probíhá i syntéza bílkovin. Proto vznikl názor, že mitochondrie jsou vlastně bakterie, které se dostaly do buňky jednoduchých eukaryot. Mitochondrie jsou velmi důležité energetické generátory buněk [14].

2.3.1.11 Fimbrie

Fimbrie jsou tenké, dlouhé proteinové výstupky vycházející z povrchu několika druhů kvasinek. Fimbriální protein je přítomen v průběhu vegetativního růstu některých kvasinek [13].

2.3.1.12 Kapsule

Tato slizká vrstva je považována za organelu kvasinek. Kapsule jsou přítomny převážně u basidiomycet jako například *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*. Kapsule slouží k ochraně buňky před fyzikálními a biologickými jevy. Kvasinky tvoří kapsule ve stanovištích, která jsou chudá na živiny [13].

2.4 Využití mikroskopie a průtokové cytometrie ke sledování *Saccharomyces cerevisiae*

Průtoková cytometrie byla využita ke studiu buněčného cyklu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Byly sledovány populace, které rostly různě rychle. Výzkum poukazuje na ukázkou rozdílů rychlosti růstu; rychlost růstu závisí na G1 fázi buněčného cyklu. Se zahájením pučení bylo pozorováno zahájení syntézy DNA u všech testovaných populací. Průtoková cytometrie by měla být použita ke sledování změn obsahu bílkovin u pučících kvasinek. Byla zjištěna dobrá korelace mezi obsahem bílkovin a rychlostí růstu [21].

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* mají omezenou replikační životnost, každá buňka má omezený počet dělení před buněčnou smrtí. Tento fakt přispívá k heterogenitě kultur. Pivovarský průmysl využívá část odebraných buněk z každého cyklu a využívá je jako inokulum pro další směs.

Cytometrie byla také využita k detekci klonované β -galaktosidázy u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Gen, který kóduje β -galaktosidázu, je často využíván ke studiu úrovně exprese. Byly použity analogy substrátu a díky tomu lze sledovat jejich aktivitu spektrofotometricky. Použití průtokové cytometrie umožnilo detekovat jednotlivé buňky s vysokou hladinou exprese v důsledku amplifikace genu nebo vyššího počtu plazmidu [21].

2.5 Karotenogenní kvasinky

Karotenogenní kvasinky rodů *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* či *Cystofilobasidium* jsou kvasinky akumulující ve svých buněčných strukturách lipofilní pigmenty zahrnující beta-karoten, torulen, torularhodin a jiné. Astaxantin je převážně tvořený kvasinkou *Phaffia rhodozyma* z rodu *Xanthophyllomonas*. Červené kvasinky patří mezi *Basidiomycety* s přísně aerobním metabolismem. K syntéze karotenoidů potřebují přístup světla a kyslíku, pigmenty jsou u kvasinek obranné metabolity proti záření a oxidačnímu stresu.

2.5.1 Rod *Rhodotorula*

Nejběžnější druhy jsou: *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* a *Rhodotorula minuta*. *Rhodotorula glutinis* se nachází běžně v přírodě. Dokáže nahromadit velké množství lipidů. Buňky mají tvar kulovitý, oválný. Netvoří pseudomycelium, nekvasí. Jejich kolonie jsou růžové až oranžové. V kapalinách tvoří usazeninu. Tento rod je velmi rozšířený v půdě, vodě, vzduchu, potravinách. Nejrozšířenější druh rodu *Rhodotorula* je *Rhodotorula glutinis*. Všechny druhy jsou lipidotvorné [15].

2.5.2 Rod *Cystofilobasidium*

Od rodu *Rhodotorula* se liší v typu basidia. Má jednobuňkový charakter, tzv. holobasidium. Tvar buněk je kulatý a protáhlý. Kolonie mají hladký a lesklý povrch. Někteří zástupci z rodu: *Cystofilobasidium bisporidii*, *Cystofilobasidium capitatum*. Druh *Cystofilobasidium capitatum* vytváří jedno jádrová mycelia. Sporidie jsou buď v párech, nebo jednotlivě. Generace jsou brány jako diploidní [16,14].

2.5.3 Rod *Sporobolomyces*

Rod *Sporobolomyces* nemá kvasné schopnosti, tvoří kolonie žluté až růžové barvy. Tvoří mycelium [15]. Nejběžnější druhy: *Sporobolomyces roseus* a *Sporobolomyces salmonicolor*. Patří do čeledi Basidiomycetes. Častým zdrojem výživy je pro ně dusík, vyskytují se v atmosféře a fylosféře. Buňky jsou kulovité, elipsoidní [14].

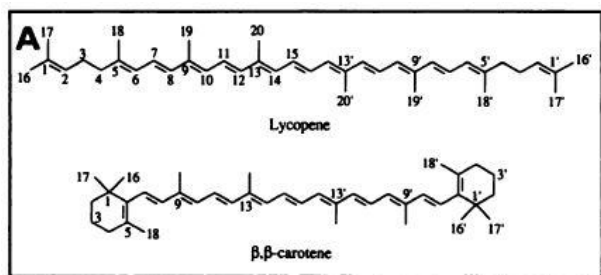
2.6 Karotenoidy

2.6.1 Vlastnosti

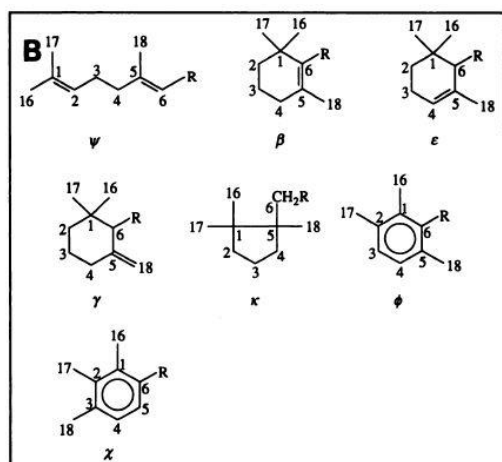
Karotenoidy patří do skupiny pigmentů žluté až červené barvy. Vyskytují se jak v rostlinné, tak v živočišné i mikrobiologické buňce. Existuje více jak 700 přírodních karotenoidů. Jsou nerozpustné ve vodě, ale jsou rozpustné v tucích. Hydrofobicita karotenoidů vede k jejich přesunu z buněk a hromadění v cytoplazmatické membráně, často se váží na lipidy. Karotenoidy jsou vysoce foto- a termolabilní, rozkládají se za působení kyslíku. Slouží jako antioxidanty, chrání buňku před UV zářením a pomáhají k přenosu energie při fotosyntéze [17].

2.6.2 Struktura

Vlastnosti jsou definovány molekulovou i geometrickou strukturou (tvar, velikost, přítomnost funkčních skupin). Základní struktura karotenoidů je vyobrazena na obr. 6. Tento základní skelet může být upraven třemi způsoby. Za prvé cyklizací na jednom konci, nebo na obou koncích molekuly viz obr. 7, za druhé změnami na úrovni hydrogenace a za třetí přidávkem funkčních skupin obsahujících kyslík. Barevnost je způsobena přítomností konjugovaných dvojných vazeb, nejčastěji v konfiguraci trans. Karotenoidy lze dělit do třech skupin podle cyklické nebo acyklické devítičlenné jednotky na acyklické (lykopen, fytoen, fytofluen), monocyklické (γ -karoten, torulen, torularodin), dicyklické (β -karoten, α -karoten) [17].



Obrázek 6: Základní struktura karotenoidů [17]



Obrázek 7: Cyklizace [17]

2.6.3 Použití

Některé pigmenty karotenoidů se používají k barvení potravin v množství $1\text{--}10\text{ mg kg}^{-1}$ (mrkev, slupky pomerančů, paprika, margarín, zmrzlina, jogurt, ovocné džusy apod.). Degradační produkty karotenoidů jsou zodpovědné za chuť a vůni potravin. Syntetické karotenoidy lze využít jako potravinářská barviva, ale i jako antioxidanty. Nejznámějším a nejdůležitějším je β -karoten. Karotenoidy jako přírodní oxidanty pomáhají člověku při některých onemocněních, jako jsou různé typy kardiovaskulárních chorob, nebo chrání před degenerativními účinky volných radikálů způsobující tumory. Reagují s reaktivními formami kyslíku, a proto fungují jako antioxidanty. Ve farmaceutickém průmyslu se využívají karotenoidy i jako prekursory provitaminu A [18].

2.6.4 Buněčná stěna karotenogenních kvasinek

Jedním z hlavních kroků u biotechnologického využití karotenoidů jakožto intracelulárních metabolitů je narušení buněčné stěny. Po narušení buněčné stěny lze získat požadované intracelulární produkty. Buněčná stěna kvasinek je tvořena dvěma vrstvami. Vrchní vrstva je tvořena manany a proteiny, pod ní je vrstva tvořena glukany. Pod buněčnou stěnou se nachází cytoplazmatická membrána, kterou tvoří dvojité vrstvy fosfolipidů. K narušení stěn kvasinek lze využít mechanické i nemechanické metody. Základním pravidlem při dezintegraci je, že intracelulární produkt nesmí být denaturován při dezintegraci buněčné stěny [19].

U karotenoidních kvasinek je obecně známo, že mají pevnou rigidní buněčnou stěnu. Získávání buněčných struktur či metabolitů je proto velmi obtížné. K dezintegraci se používá množství metod – fyzikální, chemické či enzymové. Každá metoda má svá pro i proti, neexistuje žádná univerzální metoda pro dokonalou dezintegraci buněk. Dezintegrační proces je závislý na mnoha faktorech, např. pH, podmínkách kultivace, fázi růstu, teplotě [20]. K dezintegraci karotenogenních kvasinek se obvykle používá mechanické rozetření v třecí misce například s křemenným pískem nebo oxidem hlinitým apod. Následně jsou metabolity extrahovány, v případě lipofilních karotenoidů organickými rozpouštědly po zmýdelnění a odpaření do sucha [20].

Použitím roztoku zásad nebo kyselin o různé koncentraci lze extrahovat bílkoviny z nativních buněk mikroorganismů. Lze využít k extrakci i barviv a dusíkatých látek. Avšak toto prostředí často denaturuje i buněčné struktury či karotenoidy [20].

K šetrnému odstranění buněčných obalů se často používají i lytické enzymy. Při správné kombinaci enzymů, fyzikálních i chemických postupů můžeme dosáhnout efektivní izolace sledovaných metabolitů či struktur. Izolace buněčných komponent u karotenoidních kvasinek je obecně problematictější v čase pozdějších růstových fází, kde je buněčná stěna už mnohem složitější a široce zainteresovaná do různých buněčných procesů. Taký se hodně podílí na reakci s vnějším prostředím, kde jako bariéra chrání buňku proti různým nepříznivým vlivům. Změny podmínek vnějšího prostředí mohou porušit samotnou funkci buněčné stěny v rámci odpovědi na použitý stres (vysoká teplota, mražení), který může být využitý jako efektivní nástroj na usnadnění samotné šetrné dezintegrace a izolace sledovaných komponent [20].

2.7 Využití mikroskopie a průtokové cytometrie u pigmentovaných mikroorganismů

Analýza heterogenity buněčných populací bývá použita u aplikovaných oborů, kde se předpokládá speciální využití, zejména pokud jde o izolaci kmenů s vysokým výnosem pro biotechnologické aplikace.

Byla sledována produkce lipázy pomocí *Rhizopusar rhizus*. Pomocí rozptylu světla (excitace při 633 nm) bylo zjištěno, že spory byly heterogenní. Produkce lipázy byla testována po vyklíčení a růstu, nejaktivnější spory byly znovu izolovány a dále testovány. U některých spor bylo pozorováno i šestinásobné zvýšení produkce [21].

Dunaliella salina je zelená řasa, která se vyznačuje produkcí látek, které mohou být ekonomicky využity. Mezi tyto látky patří například β -karoten. Průtoková cytometrie ukázala použití k obohacení kmenů, které jsou následně schopny produkovat více než dvojnásobné množství β -karotenu než u standardního typu [21].

Astaxantin je důležitou součástí krmiv pro pěstování akvarijských lososovitých druhů. Tento pigment je sekundárním produktem u kvasinek *Phaffia rhodozyma*. Pomocí průtokové cytometrie a třídění buněk byla cytometrie použita k izolaci mutantů kvasinek, které vykazují nadprodukcí astaxantinu [21].

Byly stanoveny podmínky, podle kterých se obsah karotenoidu kvantitativně zvýšil v souvislosti s autofluorescencí u zmutované populace. Rozdíl fluorescencí u divokého a mutantního typu byl potvrzen pomocí fluorescenčního konfokálního mikroskopu. Nejlepší kmeny vyráběly až o 15 % více karotenoidů než rodičovské kmeny [21].

Analýza životaschopnosti buněk je užitečným nástrojem při různých experimentálních postupech. Bylo zjištěno, že základním kritériem pro odlišení živých a mrtvých buněk je celistvost membrány. Běžně používaným barvivem je trypanová modř (TB, TrypaneBlue). Mrtvé buňky absorbují TB do cytoplazmy, zatímco živé buňky zůstávají neobarvené [22].

Některé studie byly provedeny s cílem zlepšit TB pro využití v průtokové cytometrii. V dnešní době se nejvíce používá k zjištění životaschopnosti buněk PI (propidium jodid). PI má podobné schopnosti jako TB: proniknout do mrtvé buňky a do DNA. Bylo navrhováno využití TB jako levnější alternativy PI [22].

TB byla používána pro barvení pro přípravu tkáňových řezů pro fluorescenční mikroskopii. Omezením u této metody je překryv emisního spektra protilátek a sond s přirozenou fluorescencí trypanové modři. Projevují se i zhasací schopnosti při vyšší koncentraci TB. Pro průtokovou cytometrii byla nalezena i další barviva, například methylenová modř používaná k redukci fluorescenčního pozadí v buňkách [23].

3 CÍL PRÁCE

Optimalizace potřebných metod jako jsou kultivační techniky, fluorescenční mikroskopie a průtoková cytometrie. Studium několika druhů karotenogenních kvasinek a jejich molekulárních charakteristik.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité pro kultivaci kvasinek

Kvasničný extrakt Himedia RM 194-500g

Síran amonný Lachner, ČR

Dihydrogenfosforečnan draselný Lachner, ČR

Síran hořečnatý Lachner, ČR

Glukóza Vitrum VWR

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a.

4.1.2 Chemikálie použité pro průtokovou cytometrii a fluorescenční mikroskopii

Propidium jodid, Sigma Aldrich SRN

Methylenová modř, Sigma Aldrich SRN

Nilská červeň, Sigma Aldrich SRN

4.2 Přístroje a pomůcky

Fluorescenční mikroskop Labomed model T121100

Průtokový cytometr Apogee A50, Apogee Flow Systems (USA)

Analytické váhy Boeco (SRN)

Třepačka Labicom, RS10 Yellow Line Basic

Centrifuga Sartorius AG(SRN)

Vodní lázeň Julabo TW2

Flow box Aura mini, Bio Air Instruments(USA)

4.3 Použité kvasinkové kmeny

Pro kultivaci byly použity kmeny kvasinek:

Rhodotorula glutinis CCY 20-2-33

Cystofilobasidium capitatum CCY 10-1-2

Sporobolomyces shibatanus CCY 19-20-3

Sporobolomyces roseus CCY 19-6-4

4.4 Kultivace mikroorganismů

4.4.1 Kultivace kmenů karotenoidů

Kvasinky byly kultivované v tekutém mediu při 28°C za neustálého třepání a osvětlení pro produkci karotenoidů. Byly využity dva typy kultivačních medií, a to optimální kontrolní glukózové médium a médium s vysokým poměrem C/N pro převážnou produkci lipidů. Média byla sterilována v tlakovém hrnci po dobu 30min.

Kultivace probíhala přes dvoustupňovou inokulaci. První inokulum bylo zaočkováno třemi velkými kličkami ze zásobní kultury na Petriho misce. Další přeočkování probíhalo po 24 hod vždy v poměru 1 : 5. Kultivace v produkčním mediu probíhala po dobu 80 hodin.

4.4.2 Volba inokula

Bylo použito inokulační medium o složení uvedeném v Tab.2. Složení produkčního média je uvedeno v Tab.3.

Tabulka 2: Složení inokula

Složka	Množství [g]
Glukosa	40
Síran amonný	5
Síran hořečnatý	0,696
Dihydrogenfosforečnan amonný	5
Kvasničný extrakt	7
Voda	1000

Tabulka 3: Složení produkčního média

	Kontrolní médium	Médium pro syntézu lipidů
Složka	Množství [g]	Množství [g]
Glukosa	30	56
Síran amonný	4	1
Síran hořečnatý heptahydrát	0,696	0,4
Dihydrogenfosforečnan amonný	4	4
Kvasničný extrakt	-	1
Voda	1000	1000

4.5 Použití průtokové cytometrie

Jako fluorescenční sondy byla použita fluorescenční barviva: propidium jodid, methylenová modř. K optimalizaci metod byly použity kvasinky kultivované 90hodin. Pro měření byly

použity 2ml 50x zředěných buněk. Směs buněk byla doplněna vodou do 1ml. K takto připravenému vzorku byly přidány fluorescenční sondy. Propidium jodidu o koncentraci 1 mg/ml bylo přidáno 5 μ l, mikrozkuhavka byla ponechána 5min v ledničce. Poté byl takto připravený vzorek podroben měření. K roztoku bylo přidáno 2 μ l MB o koncentraci 1mg/ml, miktozkumavka byla ponechána 5min při 30°C. Poté bylo provedeno měření.

Tabulka 4: Nastavení cytometru záložka PMT

PMT			
		Voltage	Noise
	SALS	250	0,02
		350	0,04
	FL1	500	
	FL2	500	
	FL3	500	
	FL4	500	

FL1-FL4 je označení detektorů průtokového cytometru.

Tabulka 5: Nastavení cytometru záložka Control

Control	Flush cycles	2
	Sheat	150 mbar
	Sample	2,78 μ l/min

4.6 Fluorescenční mikroskopie

Pro sledování kmenů kvasinek pomocí fluorescenční mikroskopie byly použity fluorescenční sondy methylenová modř a propidium jodid. Byly použity buňky usmrčené varem po dobu 10min a buňky nepovažené. Kvasinky byly použity po 90hod kultivace. Ke sledování bylo použito 0,1ml živých buněk společně s 0,1ml považených buněk, vzorek byl doplněn destilovanou vodou do 1ml. K takto připravenému vzorku byly přidány fluorescenční sondy. Bylo přidáno 0,2 μ l methylenové modři, mikrozkuhavka byla ponechána inkubovat 5min při 30°C. Propidium jodidu bylo přidáno 5 μ l, mikrozkuhavka byla ponechána 5min v ledničce.

4.7 Růstová křivka

Po dokončení optimalizace metody byla měřena růstová křivka dvou vybraných kmenů kvasinek. Kvasinky byly kultivovány ve dvou různých kultivačních médiích: kontrolní glukózové médium a médium s poměrem C/N = 70 k podpoře syntézy lipidů. V průběhu růstové křivky byly provedeny odběry v časech 0; 0,5; 1; 1,5; 6; 9; 24; 32; 48; 56; 72 a 80 hodin kultivace. Buňky byly zředěny 50x. Ke stanovení životaschopnosti buněk byla použita fluorescenční sonda MB. Na buňky bylo působeno dvěma stresovými faktory, mražením a teplotním šokem po dobu 10, 20 a 30min při 60°C. Pomocí průtokové cytometrie

se sledovala propustnost rigidní buněčné stěny karotenogenní kvasinky v různých fázích růstové křivky ve dvou použitých kultivačních médiích.

Mikroskopickému pozorování pomocí fluorescenčního mikroskopu byly podrobeny buňky, na které se nepůsobilo stresovými faktory. Jako fluorescenční sonda byla použita nilská červeň o koncentraci 1mg/ml. K 1ml buněk byly přidány 2 μ l NČ. Sledoval se přírůstek lipidických granulí v buňkách, které po obarvení sondou fluoreskují červeně.

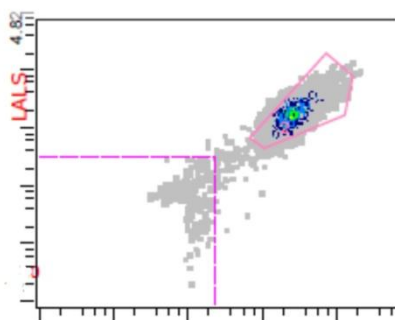
5 VÝSLEDKY A DISKUSE

V první části práce byla provedena optimalizace využívání barvení buněk karotenogenních kvasinek. Je známo, že červené kvasinky jsou díky obsaženým pigmentům schopné autofluorescence. Ta byla pozorována pod fluorescenčním mikroskopem bez přidání fluorescenční sondy. Dále pak byly využité sondy PI a MB k odlišení živých buněk od mrtvých. K vhodně naředěné suspenzi buněk byla přidána vybraná fluorescenční sonda. Metoda byla optimalizována na použití vhodné koncentrace sondy – 1mg/ml a na dobu inkubace.

5.1 Průtoková cytometrie

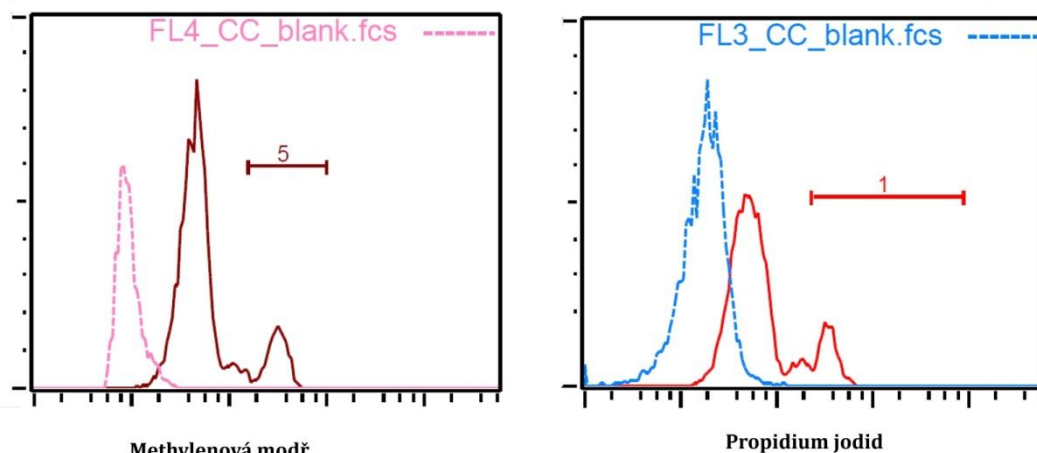
5.1.1 *Cystofilobasidium capitatum*

Byla použita kultura kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* po 90hodinách kultivace. Nastavení podmínek měření průtokového cytometru bylo optimalizováno na hodnoty uvedené v tabulce 4 a 5.



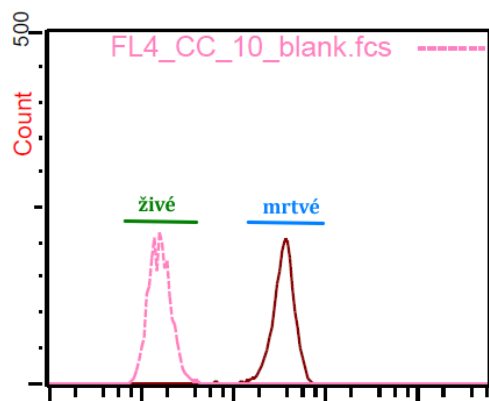
Obrázek 8: Označená populace na kanálech SALS, LALS

Na obr.9 je vyobrazena měřená populace kvasinek. Populace je ohraničena růžovým šestiúhelníkem, kterým lze pohybovat a měnit si měřené území. V šestiúhelníku je obsažena vždy oblast, kterou chceme měřit. Populace je označena na kanálech SALS (Small Angle Light Scattering), LALS (Large Angle Light Scattering).



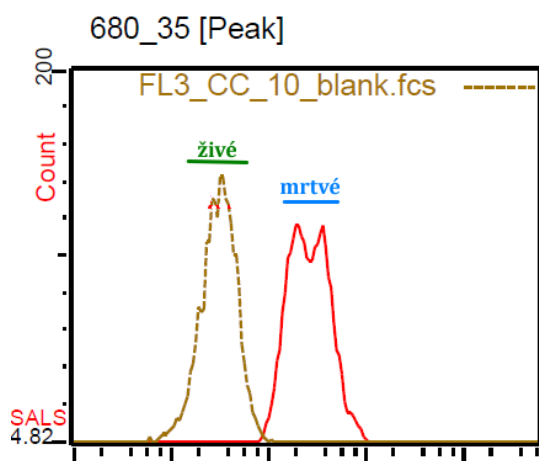
Obrázek 9: Porovnání blanku s MB a PI po 90hod kultivace

Porovnáním blanku s buňkami obarvenými MB a PI je viditelná změna (Obr.10). Objevily se zde tři píky. První pík představuje živé buňky, u MB je procentuálně vyjádřena na 80,1 % u PI na 81,6 %. Prostřední, nejmenší pík poukazuje na buňky, které ještě nejsou mrtvé, ale pouze přežívají. Poslední pík vyobrazuje mrtvé buňky; u MB představuje 14,4 %, u PI 14,2 % mrtvých buněk. Jak je vidět, hodnoty životaschopnosti se v porovnání PI a MB liší minimálně.



Obrázek 10: Porovnání blanku s 10min.povařenou kulturou s MB

Histogram, na kterém je vyobrazeno měření životaschopnosti buněk pomocí MB při PMT 500 je uveden na Obr.11. Osa x znázorňuje intenzitu signálu, osa y množství signálu. Čárkovaně, růžově je vyznačena reference z měření blanku. Hnědě je vyznačeno měření buněk po 10minutách při varu. Můžeme zde pozorovat posun píku více vpravo, což znamená, že po 10minutách varu byla většina buněk mrtvých. Na průtokovém cytometru pod grafem lze vyčíst hodnoty životaschopnosti i počtu buněk. U tohoto měření bylo zaznamenáno 97,5% mrtvých buněk.



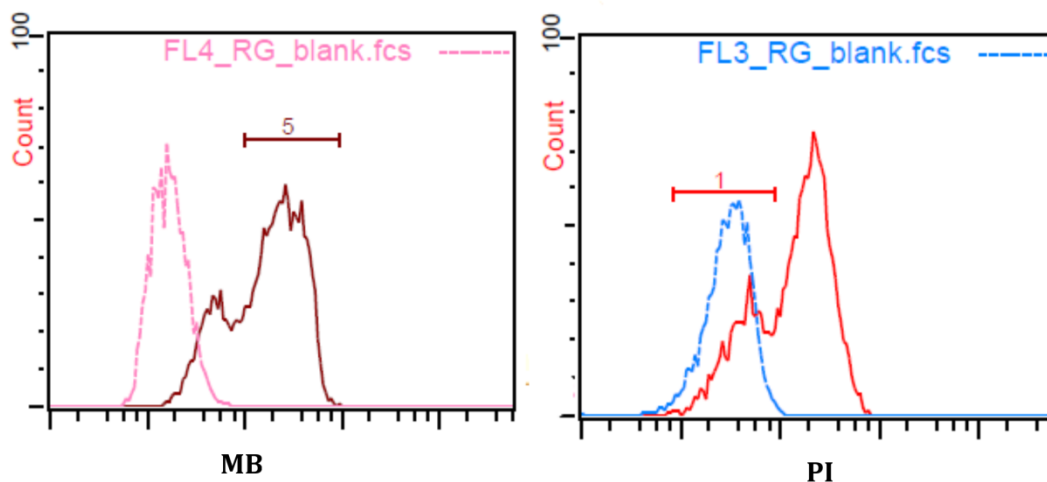
Obrázek 11: Porovnání blanku s 10min. povařenou kulturou s PI

Histogram uvedený na obr.12 znázorňuje kvasinky (považené 10min) obarvené PI. Zde bylo zaznamenáno 97% mrtvých buněk. Při porovnání s procentuálním hodnocením životaschopnosti u měření s MB se tyto hodnoty nijak zvlášť neliší. Tyto výsledky by potvrzovaly teorii o možnosti náhrady PI za TB [22]. Dalo by se tedy tvrdit, že při takovémto nastavení cytometru lze používat MB místo PI k určení životaschopnosti buněk. Náhrada methylenové modři za propidium jodid by mohla mít podobný účinek, který je uveden

v článku [22], kde se pojednává o náhradě PI za TB. MB je oproti PI levnější a hlavně není mutagenní, jako je PI.

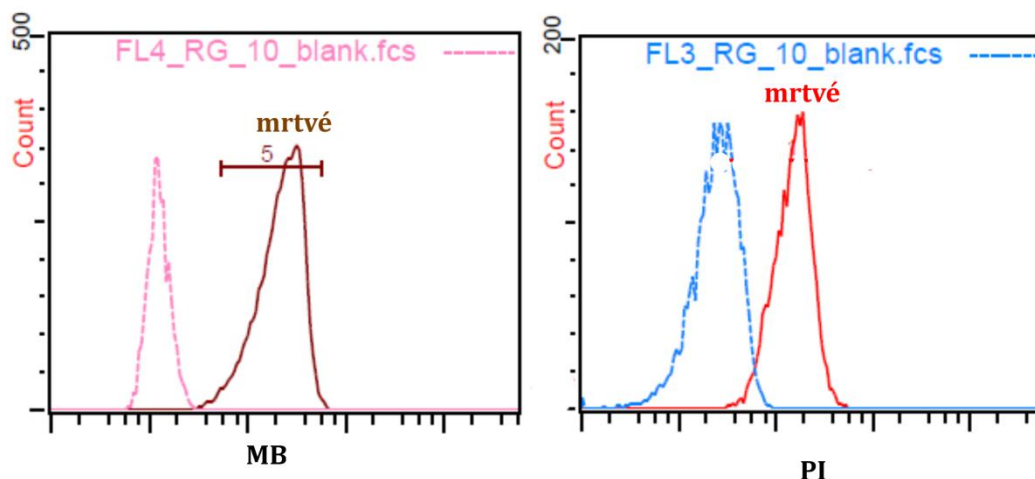
5.1.2 *Rhodotorula glutinis*

Rhodotorula glutinis byla použita po 90 hodinách kultivace.



Obrázek 12: Porovnání výsledků za použití MB a PI po 90hod kultivace

Při porovnání výsledků buněk kultivovaných 90hod za použití MB a PI je vidět stejné rozdělení na dvojitý pík (obr.13). První pík značí živé buňky a druhý, větší pík označuje mrtvé buňky. Porovnáním procentuálních výsledků životaschopnosti u MB byl výsledek 70,7% mrtvých buněk a u PI 70,2% mrtvých buněk. Opět se tyto výsledky od sebe nijak razantně neliší, a proto se nám opět potvrdila možnost použití MB místo PI.

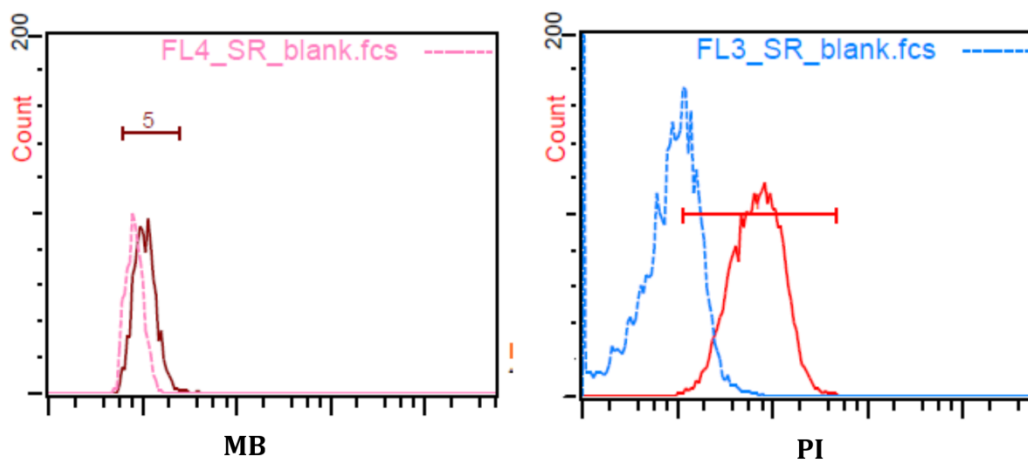


Obrázek 13: Po 10min poškození s MB a PI

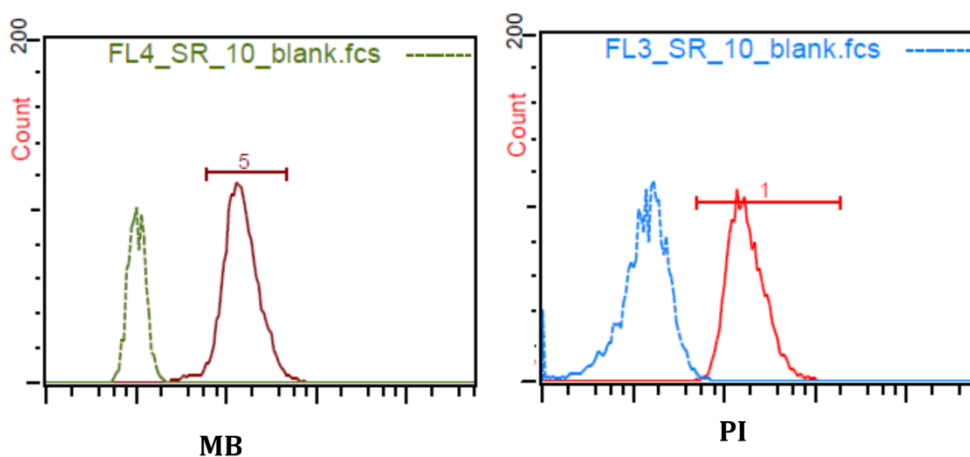
Buňky byly poškozeny 10 minut. Opět lze pozorovat posunutí píku oproti blanku jak u MB, tak i u PI. Procentuální zastoupení buněk u MB 98,5 % mrtvých buněk a u PI 99 % mrtvých buněk.

5.1.3 *Sporobolomyces roseus*

Sporobolomyces roseus byl kultivován 90 hodin. Na obr.15 a 16 jsou uvedeny příslušné histogramy.



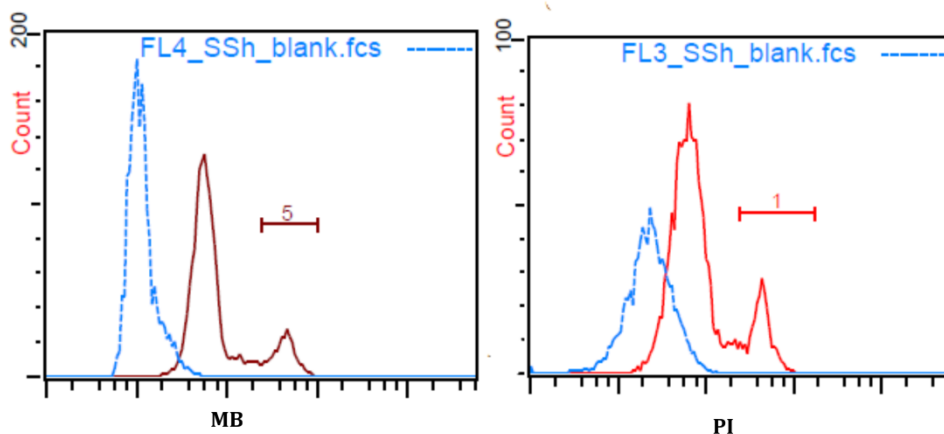
Obrázek 14: Porovnání buněk po 90 hod kultivace s MB a PI



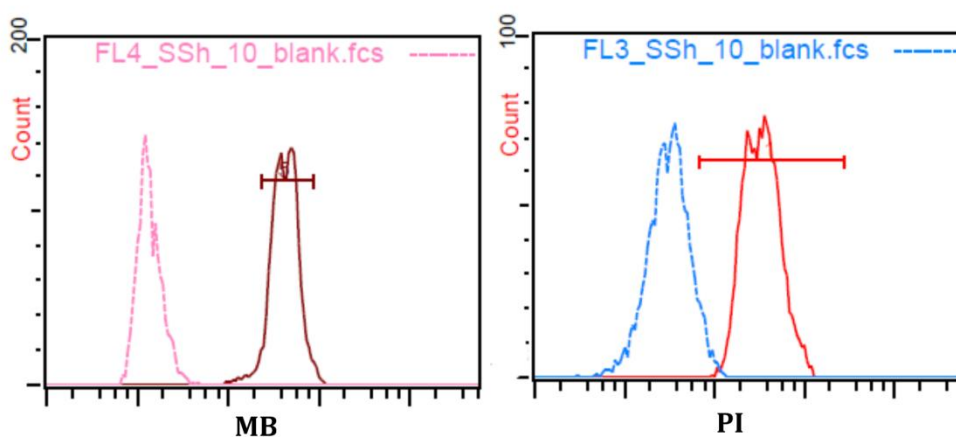
Obrázek 15: Porovnání po 10 min poškození

5.1.4 *Sporobolomyces shibatanus*

Kvasinka *Sporobolomyces shibatanus* byla kultivována 90 hodin.



Obrázek 16: Porovnání po 90hod kultivace



Obrázek 17: Porovnání po 10min povaření

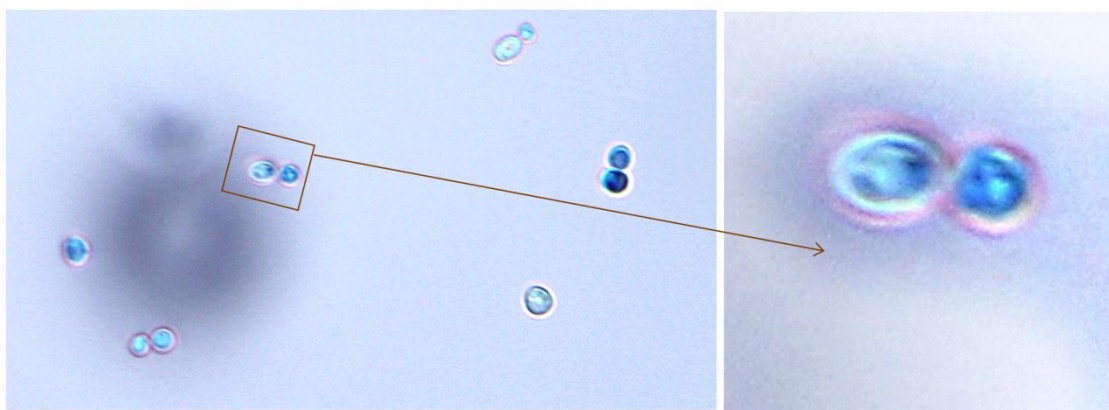
Stejné výsledky jako u předchozích kvasinek můžeme pozorovat i u kvasinek z rodu *Sporobolomyces*. Buňky obarvené MB či PI vykazovaly téměř totožné hodnoty. Píky pro živé a mrtvé buňky byly od sebe dostatečně oddělené (obr. 18).

5.2 Mikroskopické pozorování

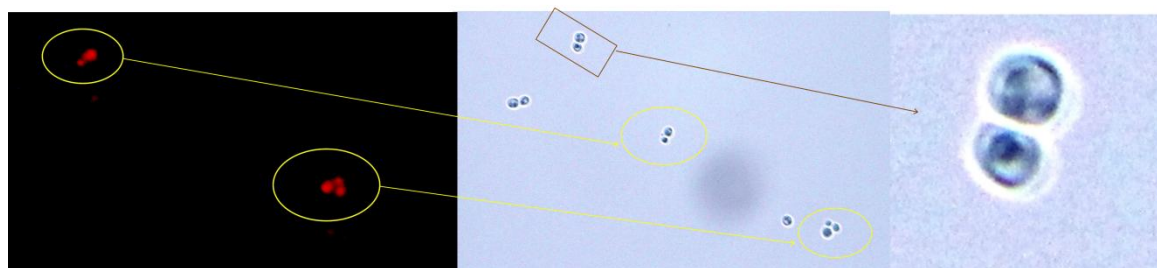
U mikroskopického pozorování kvasinek pomocí fluorescenčního mikroskopu byla optimalizována koncentrace a doba inkubace použité barvicí sondy. Z uvedených výsledků vidíme kvasinky z optického i fluorescenčního mikroskopu.

5.2.1 *Cystofilobasidium capitatum*

Na obr.19 a 20 jsou uvedeny mikroskopické snímky kvasinky *C.capitatum* z fluorescenčního a optického mikroskopu za použití dvou typů fluorescenčních sond.



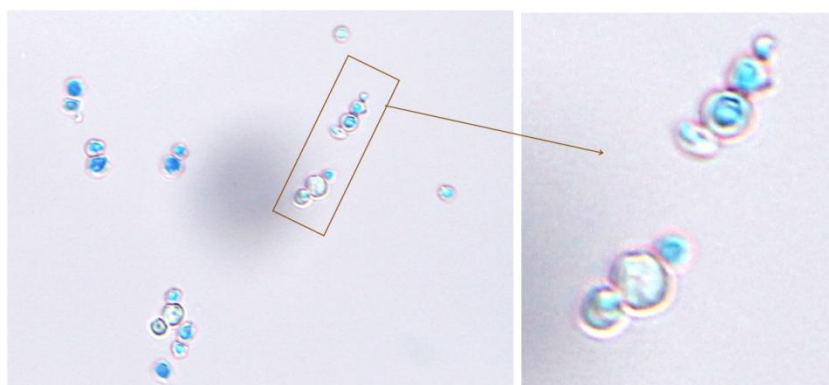
Obrázek 18: Záznam kvasinek *C.capitatum* obarvených methylenovou modří z optického mikroskopu



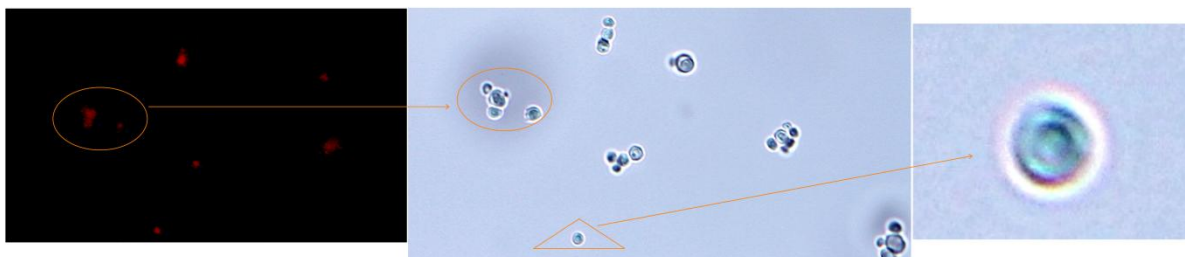
Obrázek 19: Záznam kvasinek *C.capitatum* obarvených propidium jodidem z fluorescenčního a optického mikroskopu

5.2.2 *Rhodotorula glutinis*

Na obr.21 a 22 jsou uvedeny mikroskopické snímky kvasinky *R.glutinis* z fluorescenčního a optického mikroskopu za použití dvou typů fluorescenčních sond.



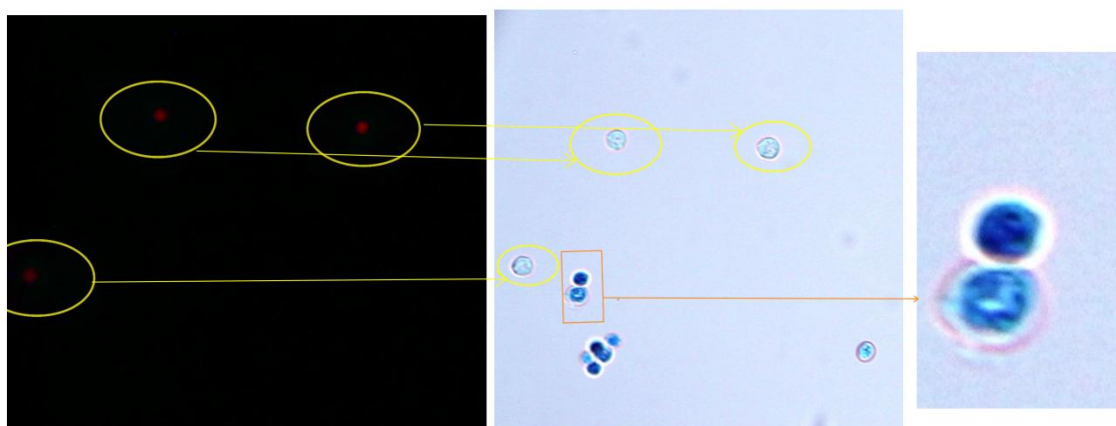
Obrázek 20: Záznam kvasinek *R.glutinis* obarvených pomocí methylenové modři z optického mikroskopu



Obrázek 21: Záznam kvasinek *R.glutinis* obarvených methylenovou modří z optického a fluorescenčního mikroskopu

5.2.3 *Sporobolomyces shibatanus*

Na obr.23 jsou uvedeny mikroskopické snímky kvasinky *S. shibatanus* z fluorescenčního a optického mikroskopu.

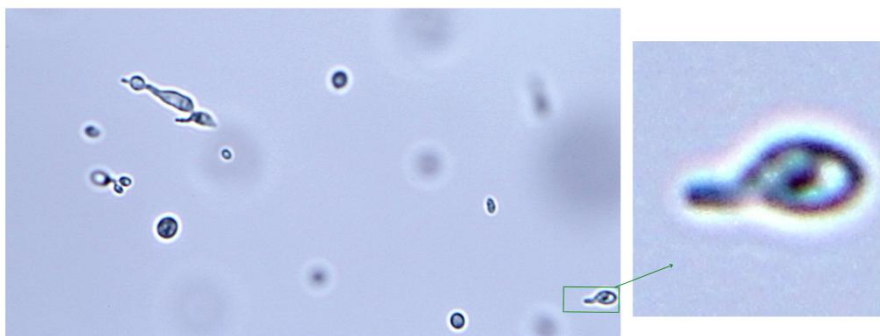


Obrázek 22: Mikroskopické pozorování SSh

Při mikroskopickém pozorování s PI nebyla pozorována fluorescence. Za použití MB byla viditelná autofluorescence buněk. Buňky, které jsou v optickém mikroskopu tmavě modré, jsou mrtvé. Živé buňky pulzují a barvivo vypuzují ven, zatímco mrtvé buňky nepulzují, a proto v nich barvivo zůstává. Jak je vidět z obr.23, fluoreskovaly pouze neobarvené buňky, tj. živé buňky, lze tedy usoudit, že se jedná o autofluorescenci.

5.2.4 *Sporobolomyces roseus*

Na obr.24 jsou uvedeny mikroskopické snímky kvasinky *S.roseus* z optického mikroskopu za použití methylenové modři.



Obrázek 23: Mikroskopické pozorování *S. roseus*

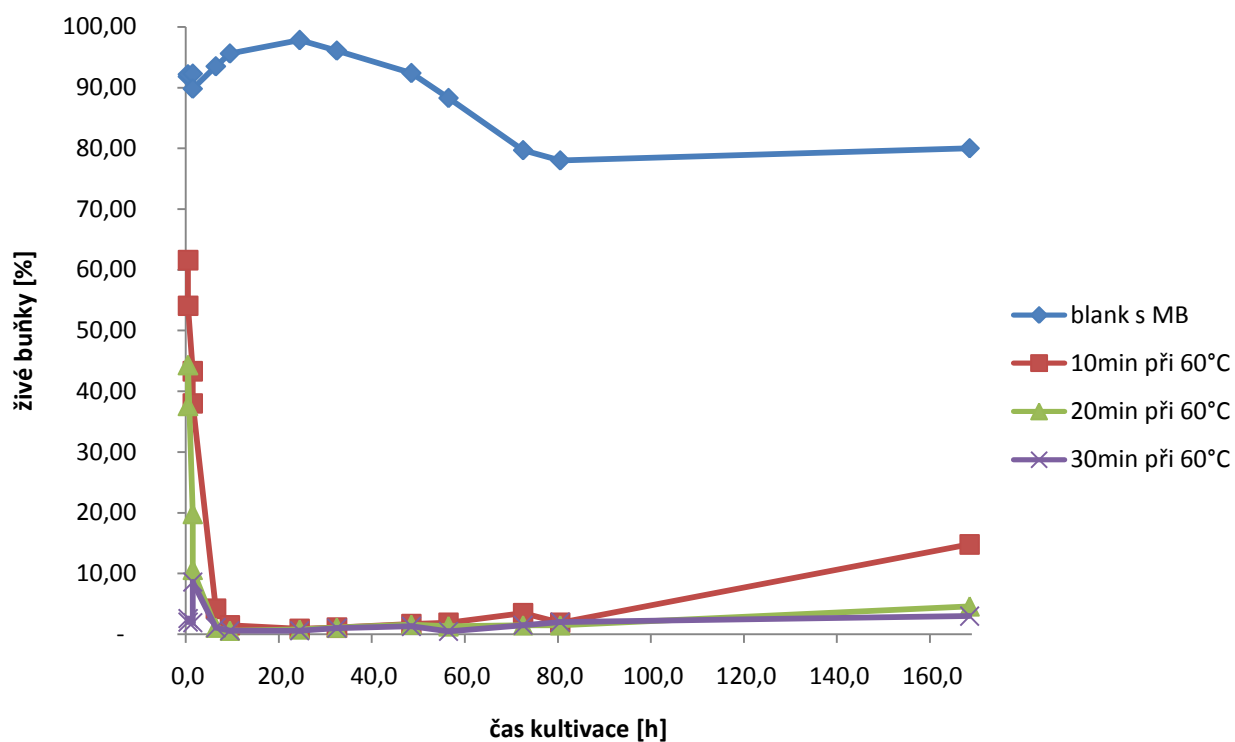
U *Sporobolomyces roseus* nebyla pozorována fluorescence pomocí fluorescenční sondy PI.

5.3 Sledování růstové křivky pomocí fluorescenčních technik

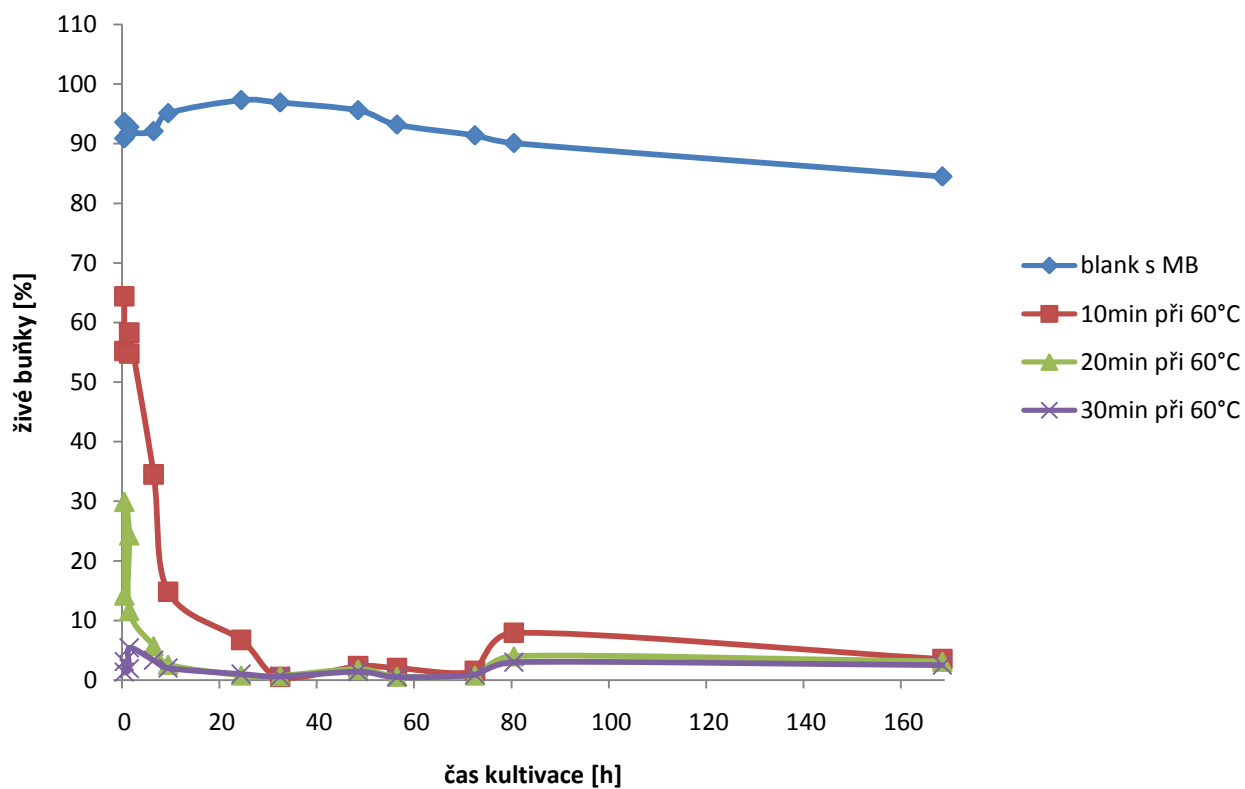
K měření růstové křivky byly vybrány dva kmeny *Cystofilobasidium capitatum* a *Rhodotorula glutinis*, a to na základě předchozí optimalizace metody stanovení životaschopnosti při poškození 10minut. K měření růstové křivky a určení životaschopnosti v různých fázích byla použita MB o koncentraci 1mg/ml. Pro vizualizaci na fluorescenčním mikroskopu byla využita fluorescenční sonda NČ o koncentraci 1mg/ml. Nílská červeň je fluorescenční sonda, která se váže na lipidové granule. Byla sledována propustnost membrány v určitých fázích růstové křivky v závislosti na teplotním šoku 60°C, šoku mražením a životaschopnost buněk.

5.3.1 *Cystofilobasidium capitatum*

Naměřené hodnoty životaschopnosti a počtu buněk z průtokového cytometru byly zpracovány do grafů. Jako fluorescenční sonda byla použita MB.

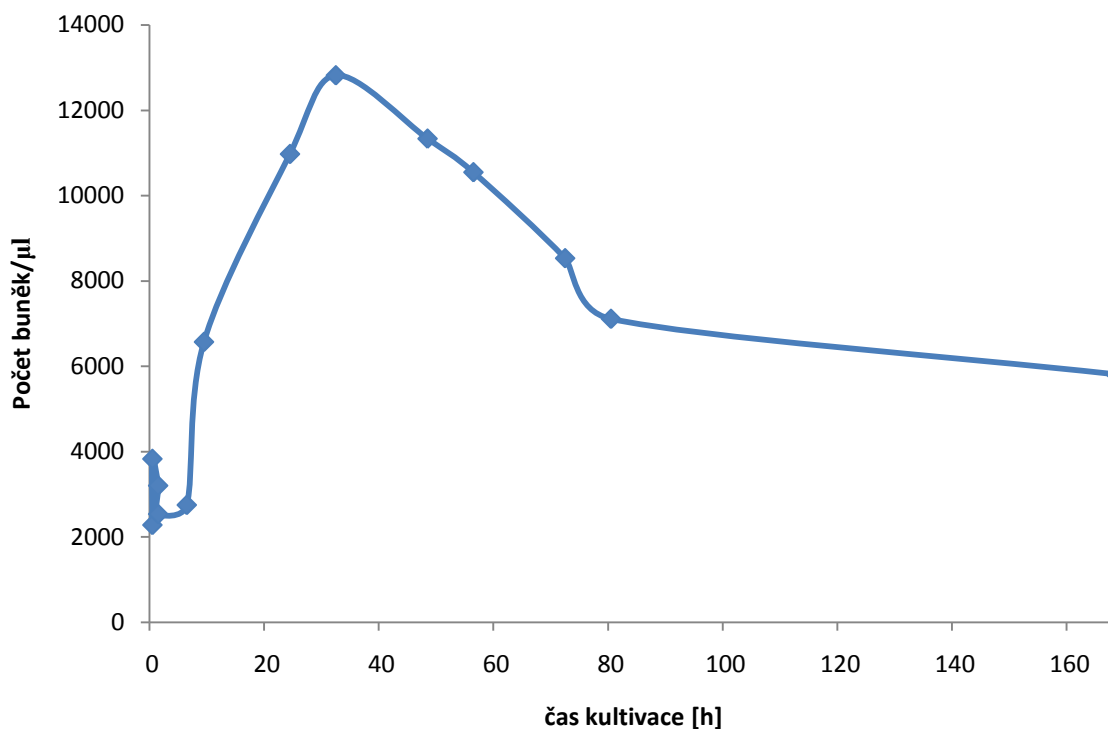


Obrázek 24: Závislost živých buněk na čase kultivace - kontrolní médium

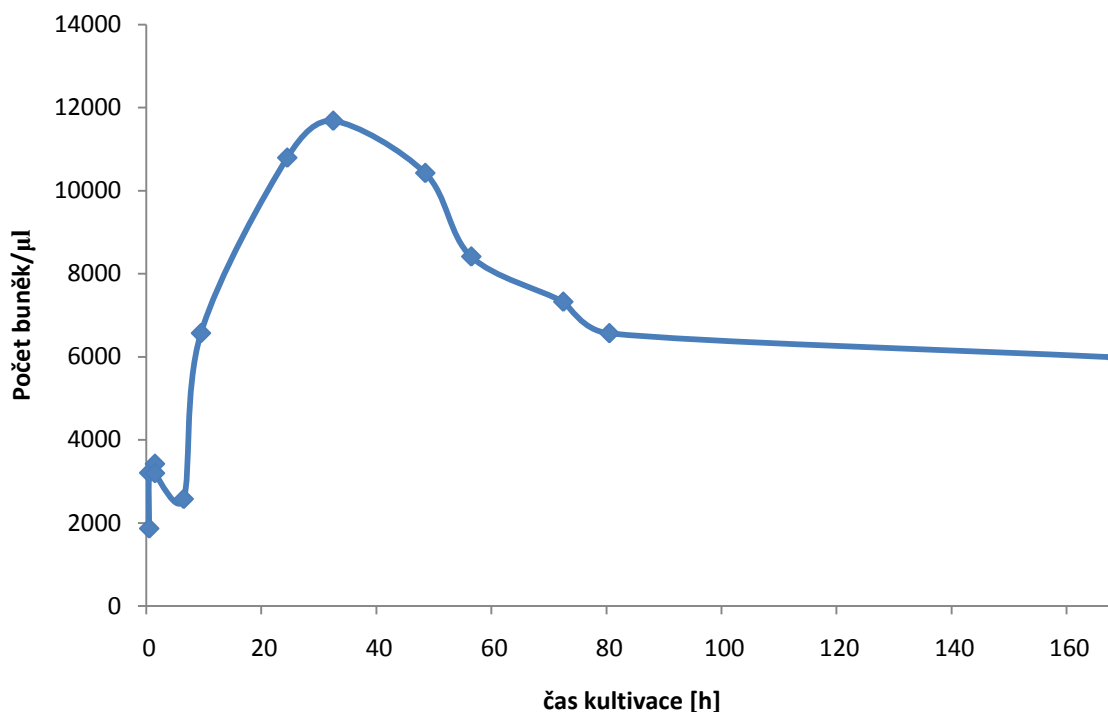


Obrázek 25: Závislost živých buněk na čase kultivace - lipidové médium

Grafy 25 a 26 znázorňují závislost živých buněk na čase kultivace. Můžeme zde vidět závislost integrity buněčné stěny na čase kultivace. Lze pozorovat i odolnost buněk při 10, 20 a 30 minutách při 60°C.



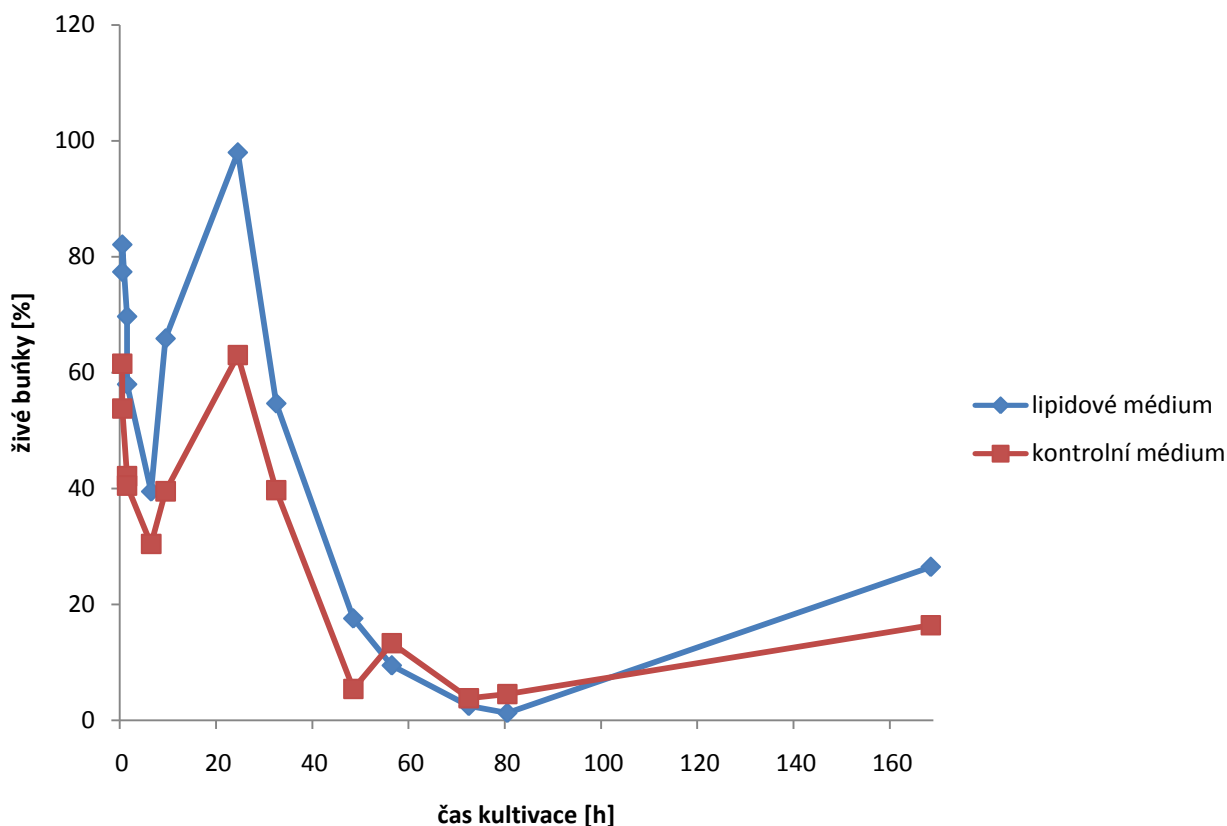
Obrázek 26: Závislost počtu buněk na čase - lipidové médium



Obrázek 27: Závislost počtu buněk na čase - kontrolní médium

Závislost počtu buněk na čase je vlastně růstovou křivkou. Lze pozorovat, že v průběhu 24–48 hod kultivace byl největší nárůst buněk a poté počty už klesají. Od 6. do 24. hod kultivace

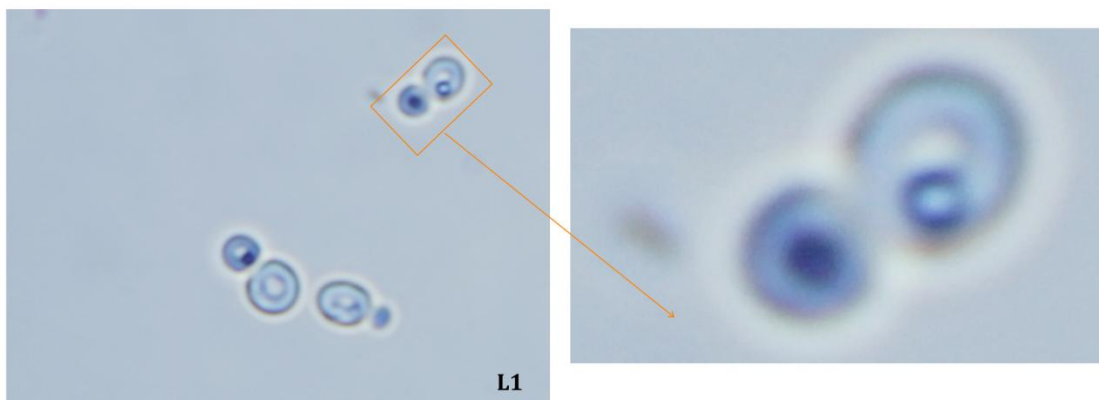
je tzv. exponenciální fáze růstové křivky. Při porovnání růstové křivky z kontrolního média a média pro podporu syntézy lipidů vidíme velice podobný průběh růstu kvasinky *Cystofilobasidium capitatum*.



Obrázek 28: Závislost počtu živých buněk na čase kultivace po teplotním šoku mražením

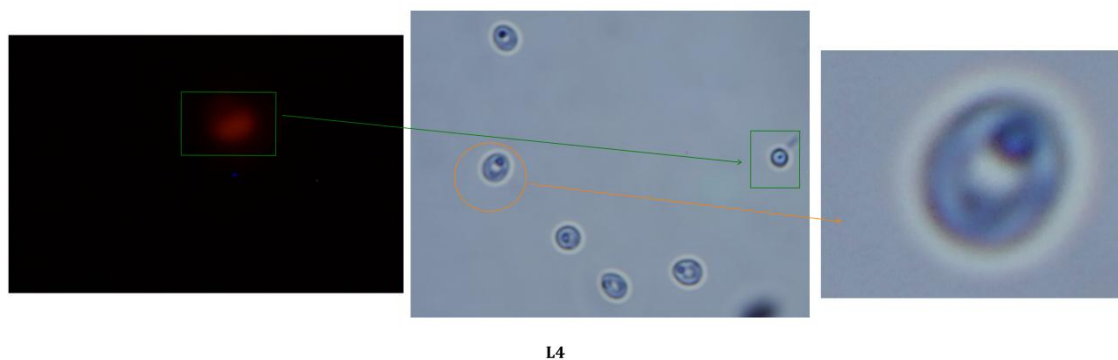
Odolnost buněčné stěny kvasinky v různých fázích růstu byla sledována i při chladovém teplotním šoku (mražení a rozmražení). Buňky z jednotlivých odběrů byly uskladněny v mrazničce do úplného zamražení a po rozmrazení byla změřena životaschopnost pomocí průtokového cytometru fluorescenční sondou MB. Z uvedeného obrázku můžeme vidět, že kvasinky kultivované v médiu podporujícím syntézu lipidů vykazovaly vyšší odolnost vůči teplotnímu stresu. Můžeme tak předpokládat větší životaschopnost buněk lze přisoudit hromadění lipidických komponent v buněčné membráně, případně různých glykolipidových látek umístěných vevnitř či v okolí buněčné membrány.

Buňky byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu. Byla použita NČ o koncentraci 1mg/ml. K 1ml buněk byly přidány 2μl NČ. Poté byly buňky ponechány 5 min při 30°C na inkubaci.



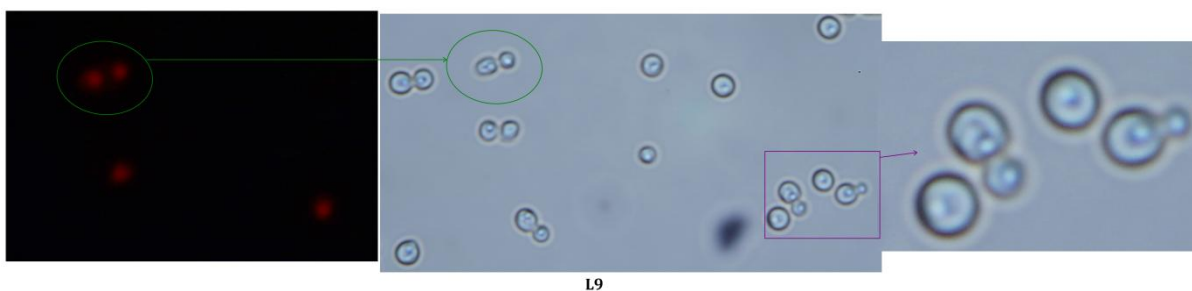
Obrázek 29: První odběr v čase 0- lipidové médium

U prvního až čtvrtého odběru nebyla pozorovaná fluorescence. Fotografie (obr.30) zachycuje dělení buněk.

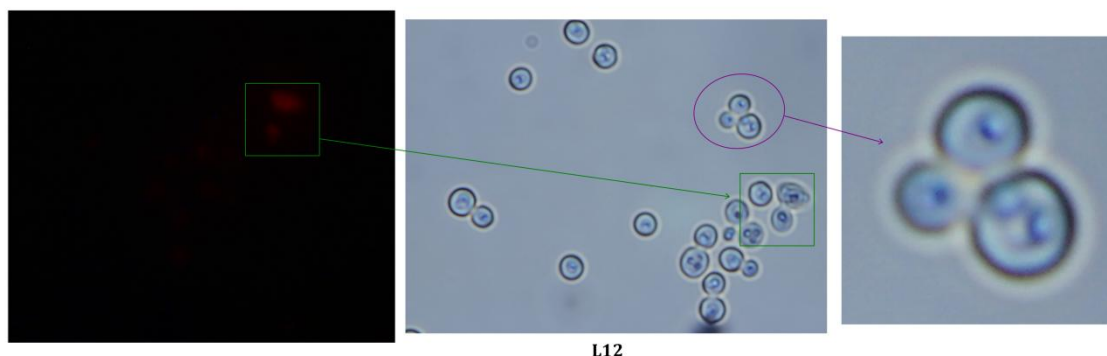


Obrázek 30: Čtvrtý odběr lipidové médium

U čtvrtého odběru (obr.31) byla poprvé viditelná fluorescence buněk. Buňky pravděpodobně začaly produkovat karotenoidy typické svojí autoflourescencí.

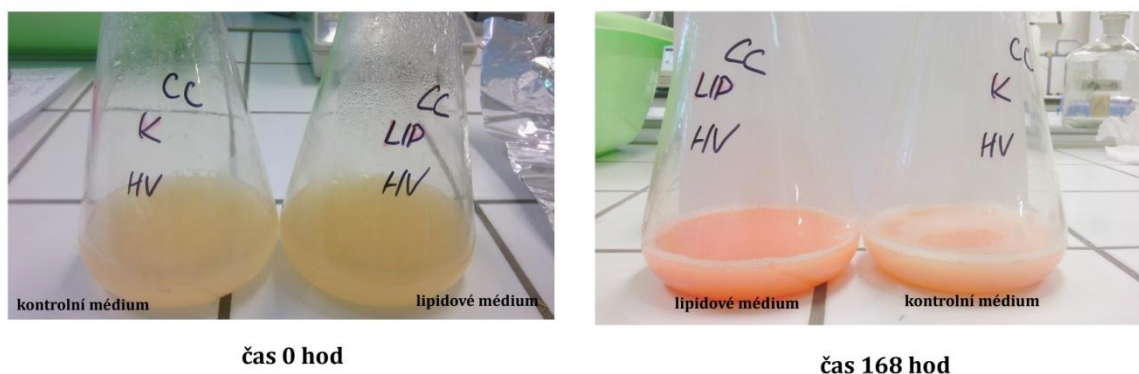


Obrázek 31: Odběr č.9 – médium pro produkci lipidů



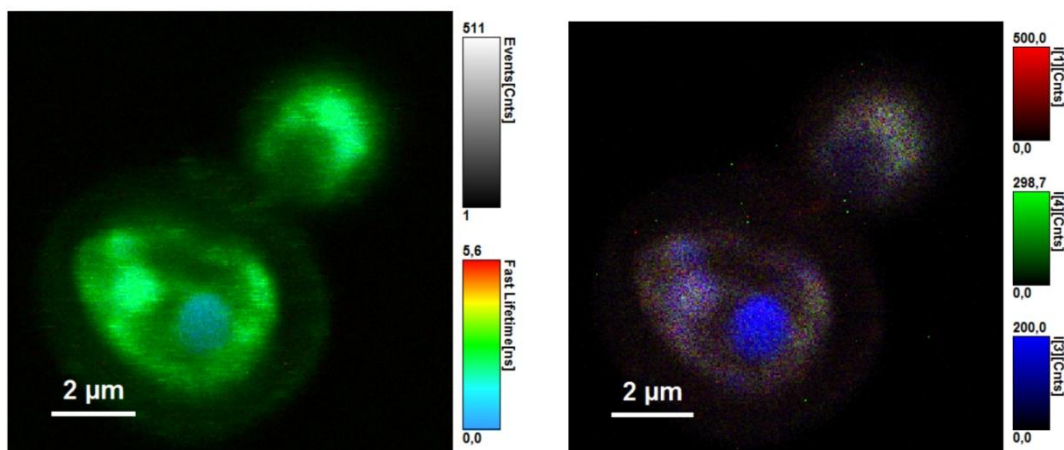
Obrázek 32: Dvanáctý odběr z média pro produkci lipidů

Pokud porovnáme odběr 9 a 12 (obr.32, 33), je u odběru 12 viditelné větší množství lipidových zrn. Tvorba lipidových zrn se dále bude zvyšovat. Stejně tak můžeme sledovat silnější buněčnou stěnu, která pak lépe odolávala teplotnímu stresu aplikovanému v dřívějších pokusech při měření průtokovým cytometrem.



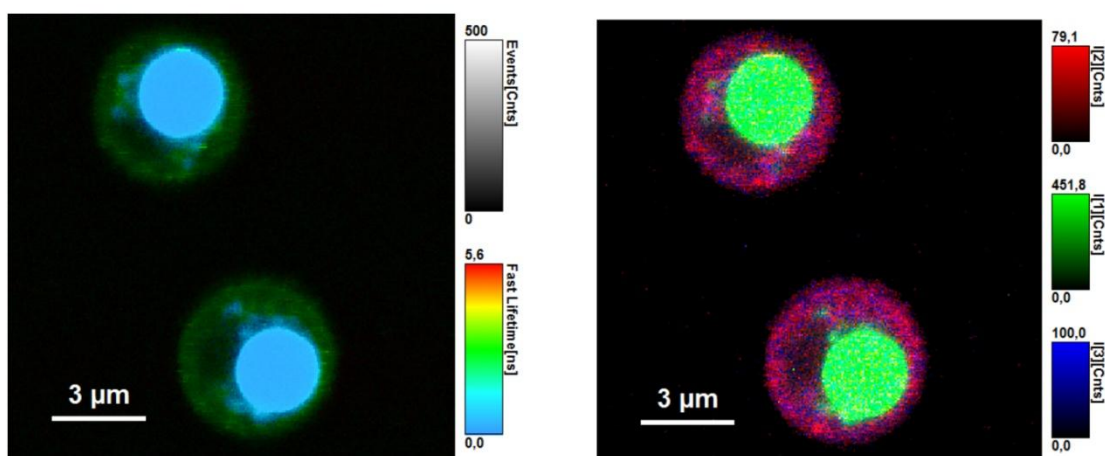
Obrázek 33: Porovnání zbarvení kultury v čase 0 po 168 hodinách kultivace

Z inokulačního média byly zaočkované buňky do dvou produkčních médií: K – kontrolní, L – podporující produkci lipidů. Z obrázků zbarvení kultivačních médií (obr.34) jsou vidět rozdíly v produkci barevných pigmentů v těchto médiích, kde v médiu podporující syntézu lipidů je kromě zvýšené produkce lipidických látek (viz mikroskopické pozorování granul) i větší produkce karotenoidů. Veškeré tyto látky pravděpodobně zvyšují odolnost kvasinkové buněčné stěny vůči různým typům dezintegrace a stresovým faktorům.



Obrázek 34: Mikroskopický snímek z konfokálního mikroskopu – *C.capitatum* kultivované na kontrolním médiu

Pro srovnání byla pořízena rovněž fotografie buněk *C.capitatum* pomocí konfokálního mikroskopu při 168 hod kultivace, buňky byly barveny nilskou červení (obr.35).

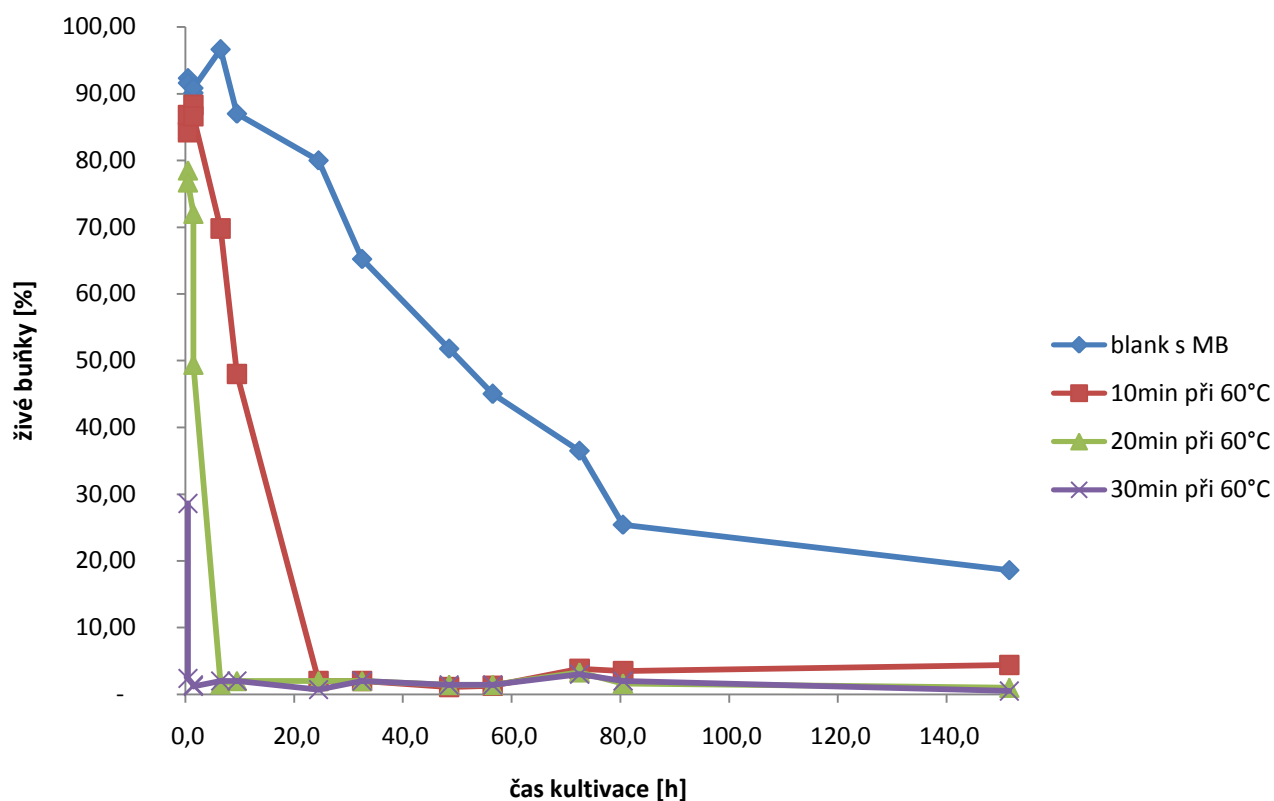


Obrázek 35: Mikroskopický snímek z konfokálního mikroskopu – *C.capitatum* kultivované na lipidovém médiu

Z výsledných obrázků (obr.36) můžeme jednoznačně pozorovat výskyt lipidových granulí, které dosahují skoro až poloviny obsahu buňky při kultivaci kvasinek v médiu podporujícím syntézu lipidů.

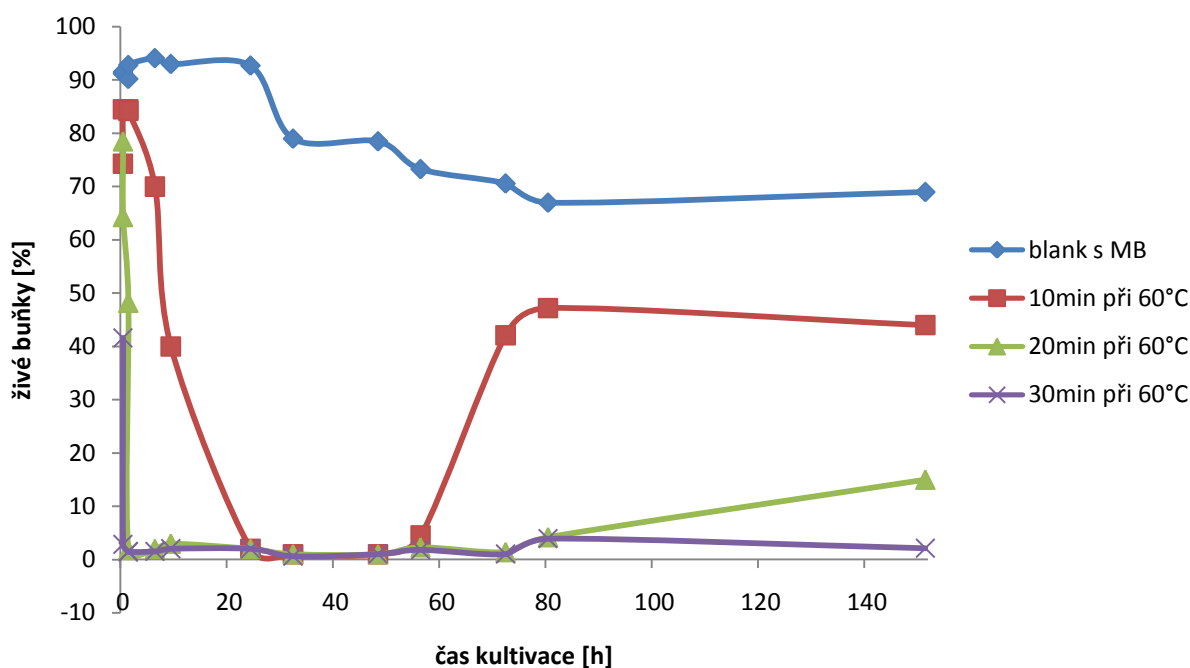
5.3.2 *Rhodotorula glutinis*

Z dat získaných pomocí průtokového cytometru byly zaznamenány hodnoty životaschopnosti a počtu buněk. Pomocí těchto dat byly vytvořeny následující grafy. Buňky byly barveny pomocí MB.



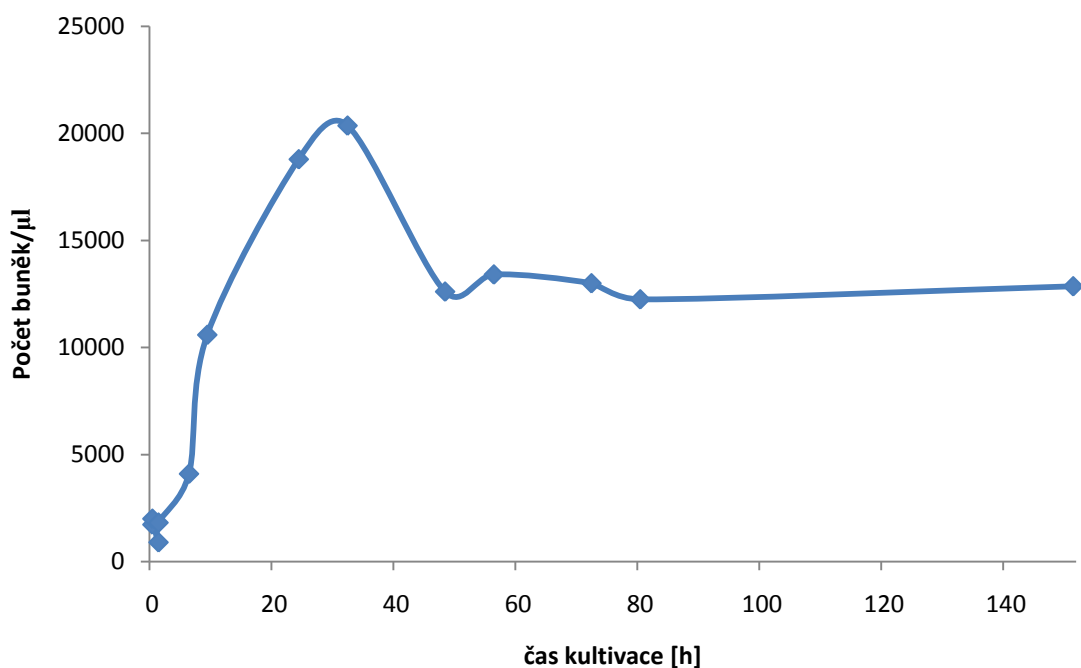
Obrázek 36: Závislost počtu živých buněk na čase - kontrolní médium

Tento graf (obr.37) znázorňuje závislost živých buněk na čase kultivace v kontrolním médiu. Z grafu lze pozorovat změny životaschopnosti buněk při působení teplotního šoku 60°C. Je patrné, že buňky relativně odolávaly teplotnímu šoku při 60°C v časových intervalech 10 a 20min lépe, zatímco při 30min přežilo malé procento buněk.



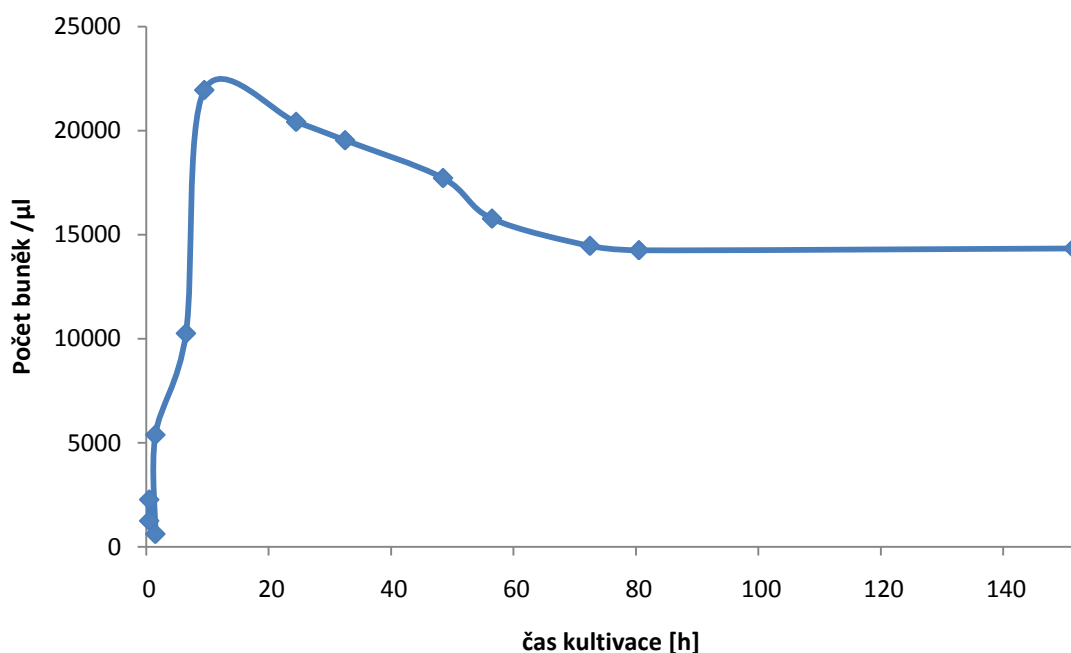
Obrázek 37: Závislost živých buněk na čase - lipidové médium

Z hodnot získaných z jednotlivých odběrů kvasinky *Rhodotorula glutinis* kultivované na médiu podporujícím syntézu lipidů je jasné vidět vyšší odolnost buněk vůči teplotnímu stresu v porovnání s buňkami kultivovanými na kontrolním glukózovém médiu. Přibližně od 56. hodiny kultivace se odolnost vůči stresu zvyšovala (viz. Obr. 38 – křivka 10 min inkubace při 60°C), což bylo způsobeno pravděpodobně zvýšenou syntézou ochranných lipidických látek a pigmentů v průběhu stacionární fáze růstu.

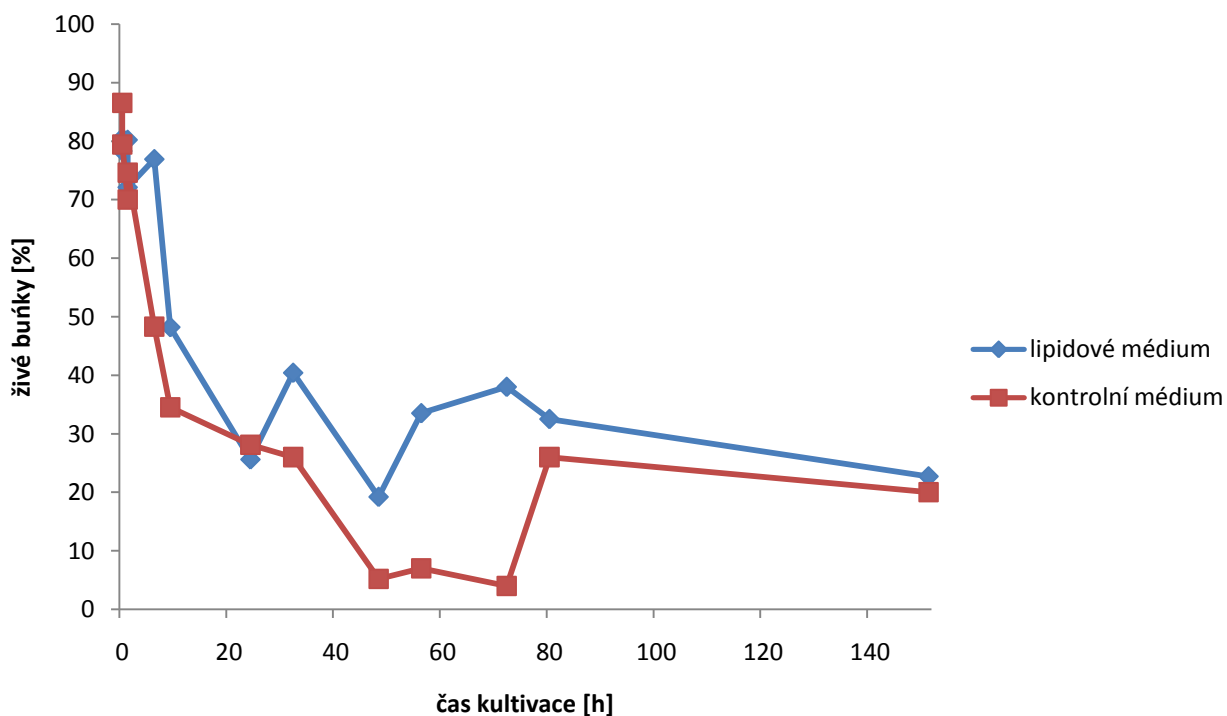


Obrázek 38: Závislost počtu buněk na čase kultivace - lipidové médium

Obrázek č. 39 znázorňuje růstovou křivku kvasinky *Rhodotorula glutinis* kultivované na médiu podporujícím syntézu lipidů. Je zde vyobrazena závislost počtu buněk na čase. Můžeme zde najít konec lag fáze, což je při 1,5h kultivace. Poté křivka roste a nastává exponenciální fáze růstu buněk. Kolem 48h kultivace nastává tzv. stacionární fáze, což je patrné z dalších výsledků při 56, 72 a 80 hodinách kultivace, kdy se od sebe počty buněk velmi neliší.



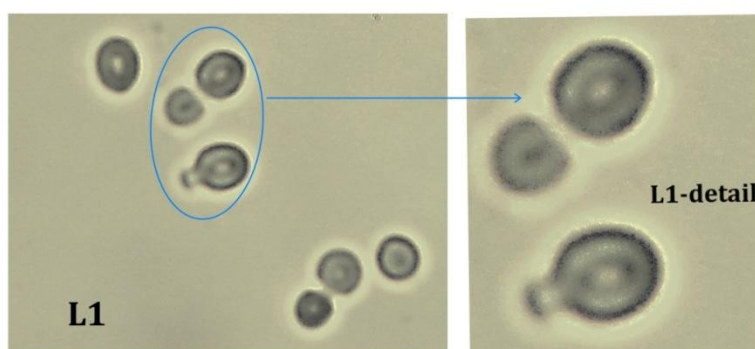
Obrázek 39: Závislost počtu buněk na čase kultivace - kontrolní médium



Obrázek 40: Závislost živých buněk na čase po působení šoku mražením

Graf na obr.41 vyobrazuje závislost životaschopnosti buněk na čase kultivace při chladovém šoku vyvolaném mražením a rozmražením buněk. V rozmezí 6–48 hodin kultivace se snižovala životaschopnost buňky zřejmě z důvodu méně odolné buněčné stěny. Po 48.hodině kultivace byla buněčná stěna pravděpodobně restrukturalizována a zesílena, a proto se životaschopnost buněk začala opět zvyšovat. Stejně tak jako u kvasinky *Cystofilobasidium capitatum*, i u kvasinky *Rhodotorula glutinis* byly buňky více či méně odolné v závislosti na kultivačním médiu, vyšší odolnost vykazovaly v lipidovém médiu.

Při mikroskopickém pozorování buněk v daných časech kultivace byla použita nilská červeně jako fluorescenční sonda, která se váže na lipidy. Do 1ml buněk bylo přidáno 2μl nilské červeně, buňky byly ponechány 5min na inkubaci při 30°C.



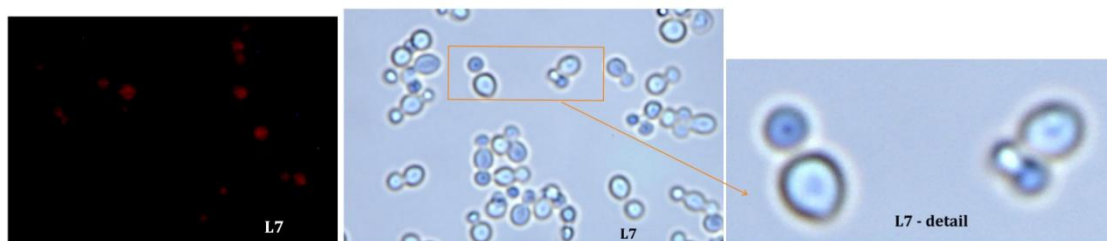
Obrázek 41: První odběr – snímky buněk *R.glutinis* z optického mikroskopu

Na obrázku 42 jsou vyobrazeny buňky v čase růstu 0. Můžeme zde vidět průběh dělení buněk.



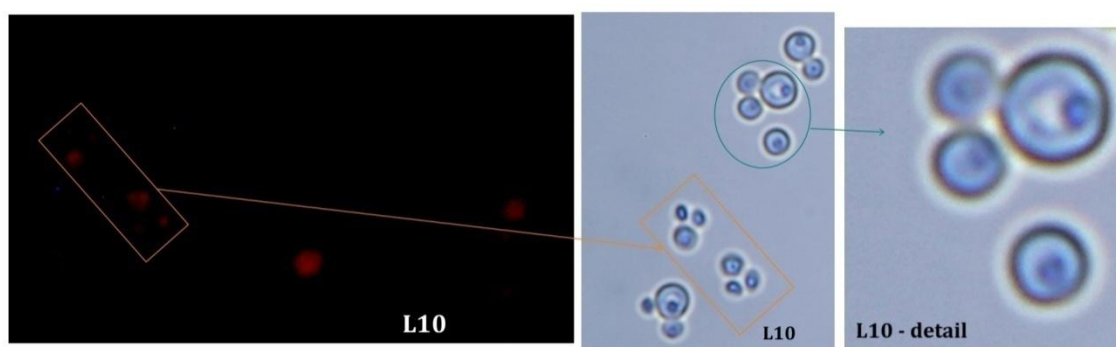
Obrázek 42: Odběr 4 - snímky buněk *R.glutinis* z optického a fluorescenčního mikroskopu

Odběr číslo 4 byl první, na kterém byla pozorována fluorescence. Na fotografii (obr.43) je opět viditelné dělení buněk. Obrázek z optického mikroskopu zachycuje buňky, u kterých je zachycena rovněž fluorescence.



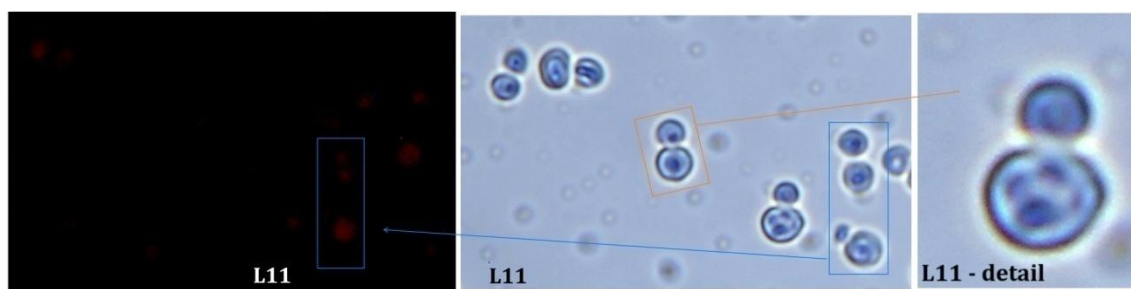
Obrázek 43: Odběr 7 - snímky buněk *R.glutinis* z optického a fluorescenčního mikroskopu

Při odběru po 24h kultivace fluoreskovalo už více buněk (obr.44). Podle grafu závislosti živých buněk na čase se tento odběr nachází v exponenciální fázi.



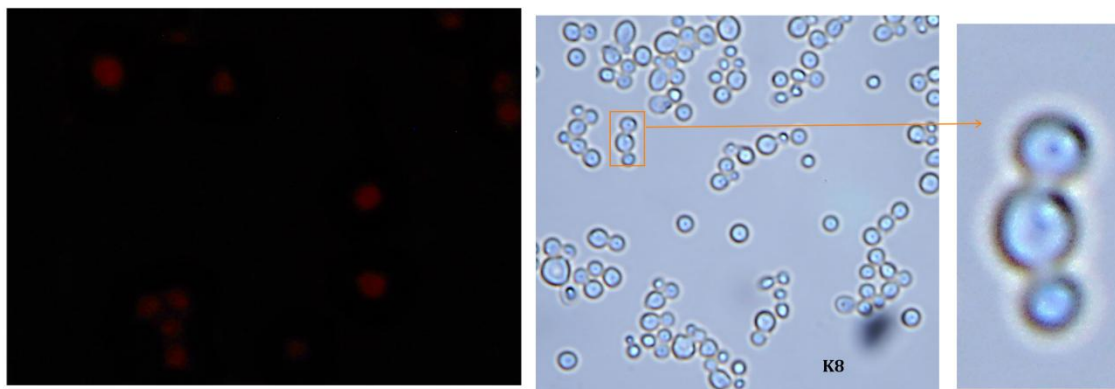
Obrázek 44: Odběr 10 - snímky buněk *R.glutinis* z optického a fluorescenčního mikroskopu

Při desátém odběru byla na mikroskopu pozorována lipidová zrníčka a tvorba vakuol (obr.45).



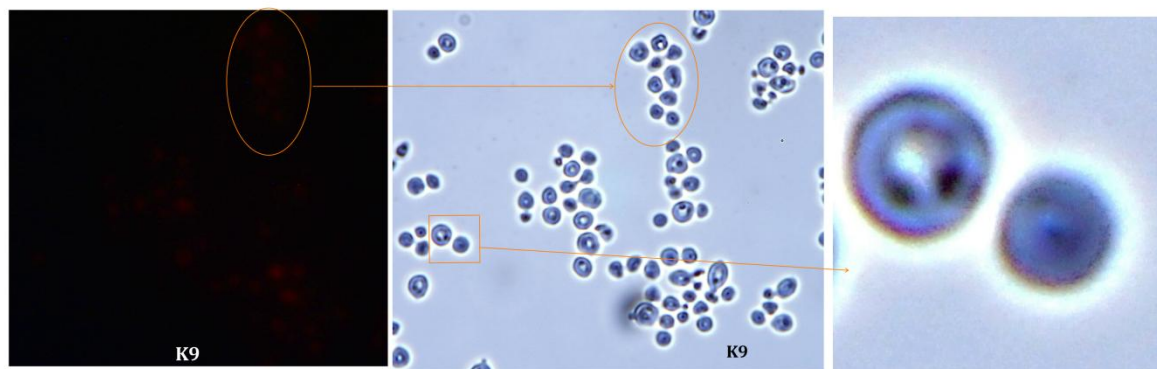
Obrázek 45: Odběr 11-snímky buněk *R.glutinis* z optického a fluorescenčního mikroskopu

V předposledním odběru při kultivaci 72 hodin jsou viditelné větší vakuoly v buňkách, více lipidových zrníček než při odběru L10 (obr.46). Odběr L10 a L11 se nachází podle grafu závislosti počtu buněk na čase ve stacionární fázi růstu.



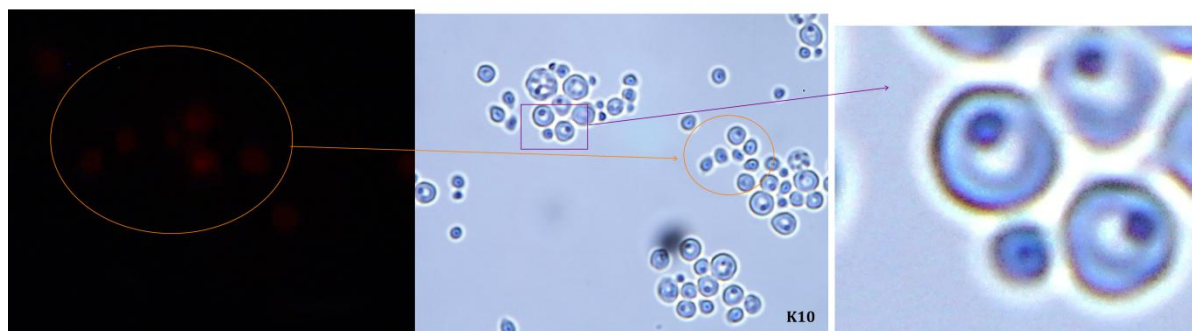
Obrázek 46: Kontrolní médium odběr 8 - snímky buněk *R.glutinis* z optického a fluorescenčního mikroskopu

Na kontrolním médiu byla pozorována fluorescence buněk *R.glutinis* až při odběru osmém při kultivaci 32 hodin. Zde můžeme vidět vliv použitého média na produkci lipidů a pigmentů (obr.47).



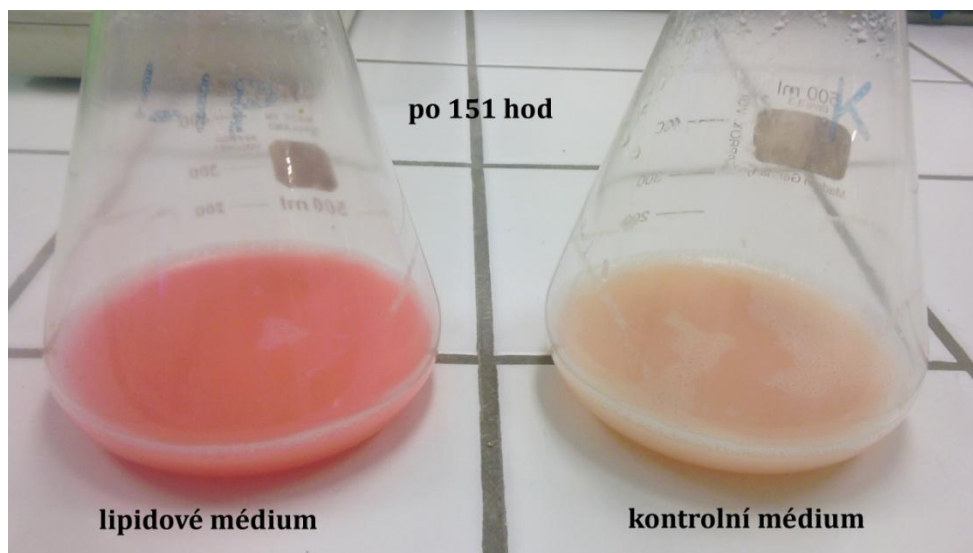
Obrázek 47: Kontrolní médium odběr 9 – snímky buněk *R.glutinis* z optického a fluorescenčního mikroskopu

U odběru 9 byly na optickém mikroskopu viditelné vakuoly a lipidová zrníčka (obr.48).



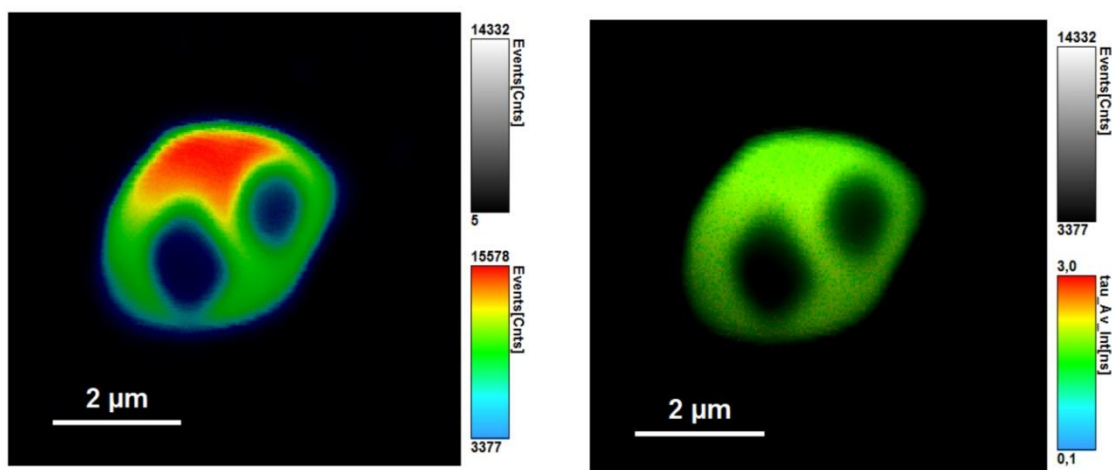
Obrázek 48: Kontrolní médium odběr 10- snímky buněk *R.glutinis* z optického a fluorescenčního mikroskopu

Pokud porovnáme K10 (obr.49) s K9 (obr.48), je viditelný rozdíl ve velikosti vakuol v buňce. V preparátu K10 obsahují buňky už větší vakuoly a menší lipidová zrníčka (v porovnání s odběrem L10, 11).



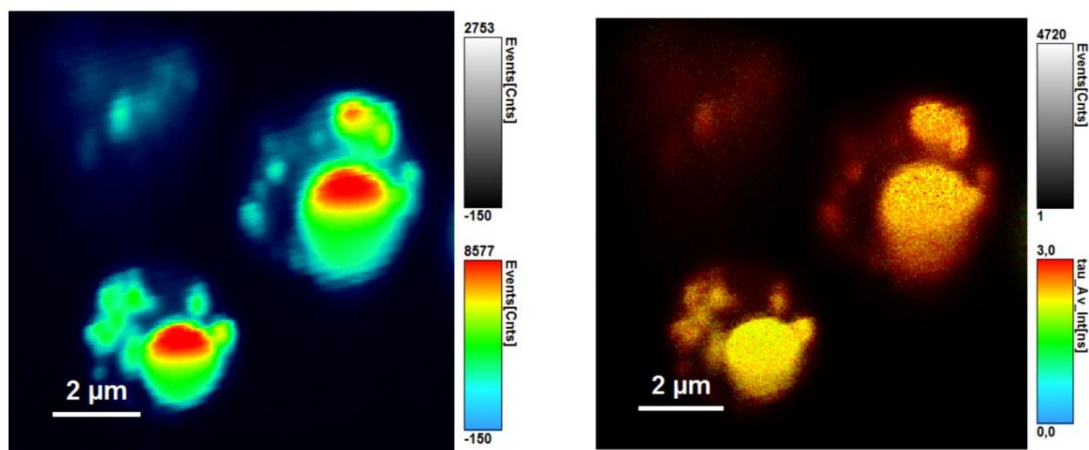
Obrázek 49: Zbarvení kultury *R.glutinis* po 151 hodinách kultivace

I u kvasinky *Rhodotorula glutinis* můžeme pozorovat výrazný rozdíl v zabarvení kultivačního produkčního média. Lipidové médium obsahuje buňky produkující více lipidických látek i karotenoidů.



Obrázek 50: Snímky buněk *R.glutinis* kultivovaných na kontrolním médiu z konfokálního mikroskopu

Na obr.51 je uvedena kvasinka *Rhodotorula glutinis* vyfocena pomocí konfokálního mikroskopu po 151 hod kultivace. Jako fluorescenční sonda byla použita NČ.



Obrázek 51: Snímky buněk *R. glutinis* kultivovaných na lipidovém médiu z konfokálního mikroskopu

Když porovnáme obrázky 51 a 52, můžeme vidět v prvním případě granule tzv. „prázdné“, náležící pravděpodobně vakuolám. Jejich tvar odpovídá též snímkům z optického mikroskopu (obr.49). Ve druhém případě vidíme granule s výrazně intenzivnější fluorescencí. Budou to pravděpodobně obarvené lipidické granule.

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo optimalizovat cytologické metody, jako je průtoková cytometrie a fluorescenční mikroskopie ke sledování karotenogenních kvasinek. K optimalizaci metod byli využiti čtyři zástupci kvasinek, a to *Rhodotorula glutinis*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Sporobolomyces roseus*, *Sporobolomyces shibatanus*. Kvasinky byly kultivovány 90 hodin a část z nich byla následně usmrcena varem při 100°C po dobu 10 min. Byly tak získány mrtvé buňky.

Za využití fluorescenčních sond propidium jodidu a methylenové modři bylo optimalizováno určování životaschopnosti buněk průtokovou cytometrií. Po 10 minutách byly všechny buňky mrtvé. Při porovnání životaschopnosti určené pomocí propidium jodidu s životaschopností určenou pomocí methylenové modři se výsledky lišily minimálně. Tento jev byl pozorován u všech zkoumaných kvasinek. Tím by se mohla potvrdit teorie, že methylenová modř se dá použít místo propidium jodidu k určení životaschopnosti buněk. Použití methylenové modři by bylo výhodnější, protože je levnější a oproti propidium jodidu není mutagenní.

Po optimalizaci metod byli vybráni dva zástupci kvasinek z rodů *Rhodotorula* a *Cystofilobasidium*. Byla měřena růstová křivka kvasinek *Rhodotorula glutinis* a *Cystofilobasidium capitatum* kultivovaných na dvou různých produkčních médiích. Na buňky bylo působeno dvěma stresovými faktory, a to mražením a následným rozmražením (chladový šok) a inkubací při 60°C v časových intervalech 10,20 a 30 minut. Z porovnání výsledků obou kvasinek lze u kmene *C.capitatum* pozorovat menší změny v procentuálním zastoupení počtu živých buněk než u *R.glutinis* bez působení stresových faktorů. Pokud se působilo stresovým faktorem při teplotě 60°C v časových intervalech 10,20 a 30 minut, tak zde se už procentuální zastoupení živých buněk viditelně zmenšuje u obou kvasinek. Lze dále říci, že *Cystofilobasidium capitatum* je vůči vyšší teplotě odolnější než *Rhodotorula glutinis*. Při pohledu na graf životaschopnosti buněk po provedení teplotního šoku mražením u *C.capitatum* je viditelné, že při 24 hod kultivace bylo nejvíce živých buněk a při 168 hod je opět viditelný růst křivky. Avšak u obou druhů kvasinek lze pozorovat zvyšující se odolnost buněčné stěny, a proto jim teplotní šok mražením nepůsobil problémy.

V rámci mikroskopického pozorování byla fluorescence s použitím barviva nilská červeň viditelná až po 1,5 hodině kultivace. Na fotografiích z prvních odběrů je viditelné dělení buněk. U dalších odběrů lze pozorovat tvorbu lipidových zrn. Počet lipidových zrn se výrazně zvyšoval hlavně v médiu podporujícím syntézu lipidů. Z mikroskopického pozorování bylo vidět i silnější buněčnou stěnu z odběrů během pozdější exponenciální a celé stacionární fáze růstu.

Takto optimalizované metody by mohly být využity k dalšímu studiu morfologie červených kvasinek. Získané výsledky týkající se odolnosti buněčné stěny by se mohly využít pro správnou dobu sledování buněčných komponent fluorescenční mikroskopií s využitím vhodné sondy, kdy bude buňka ještě dostatečně propustná k barvení, nebo vhodné doby odběru buněk a následnému použití například v biotechnologii k izolaci žádaných buněčných komponent.

7 LITERATURA

- [1] RAPLEY, Ralph a John M WALKER. Molecular biomethods handbook. Totowa, New Jersey: Humana Press, c1998, xiii, 725 p. ISBN 08-960-3501-8.
- [2] WAITES, Michael J. *Industrial microbiology*. Malden, MA: Blackwell Science, c2001, xi, 288 p.:. ISBN 978-0-632-05307-0.
- [3] DÍAZ, Mario, Mónica HERRERO, Luis A. GARCÍA a Covadonga QUIRÓS. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. 2010, vol. 48, issue 3, s. 385-407. DOI: 10.1016/j.bej.2009.07.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X09002563>
- [4] KLEINEGRIS, Dorinde M. M., Marjon A. VAN ES, Marcel JANSSEN, Willem A. BRANDENBURG, René H. WIJFFELS, M.H.M. EPPINK, R.H. WIJFFELS a D.M.M. KLEINEGRIS. Carotenoid fluorescence in *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*. 2010, vol. 22, issue 5, s. 645-649. DOI: 10.1007/s10811-010-9505-y. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-010-9505-y>
- [5] Spring, K. R. Fluorescence microscopy. in *Encyclopedia of Optical Engineering*, Marcel Dekker, New York, New York, pages 548-555 (2003)
- [6] RAHMAN, Misha. SEROTEC. Introduction to Flow Cytometry. Kidlington, 2005. Dostupné z: <http://static.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf>
- [7] EDITORS IAIN JOHNSON, Michelle T. The molecular probes handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies. 11th ed. Carlsbad, CA: Life Technologies Corporation, 2010, 3 v. (xvi, 3049, 55 p.). ISBN 978-098-2927-915.
- [8] NOVÁK, J., G. BASAŘOVÁ, J. FIALA a P. DOSTÁLEK. PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE VE VÝZKUMU KVASINEK *Saccharomyces cerevisiae* A JEJÍ APLIKACE V PRAXI. *Chemické listy*. 2008, č. 102, s. 183-187. ISSN 1213 7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_03_183-187.pdf
- [9] HERZENBERG, Leonard A., Richard G. SWEET a Leonore A. HERZENBERG. Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Scientific American*. 1976, vol. 234, issue 3, s. 108-117. DOI: 10.1038/scientificamerican0376-108. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/scientificamerican0376-108>
- [10] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

- [11] VESELÁ, Mária. Praktikum z obecné mikrobiologie. 3. vyd. Brno: VUT FCH, 2004, 99 s. ISBN 80-214-2567-9.
- [12] POMMERVILLE, Jeffrey C a I ALCAMO. Alcamo's fundamentals of microbiology. ISBN 07-637-6258-X.
- [13] WALKER, Graeme M. Yeast physiology and biotechnology. John Wiley & Sons, 1998.
- [14] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1982, 483 s.
- [15] KALHOTKA, Libor. Mikromycety v prostředí člověka: vláknité mikromycety (plísňe) a kvasinky. V Brně: Mendelova univerzita, 2014, 77 s. ISBN 978-80-7375-943-8.
- [16] SAMPAIO J. P., GADANHO M. BAUER R.: Taxonomic studies on the genus *Cystofilobasidium*: description of *C. ferigula* sp. nov. and clarification of the status of *C. lari-marini*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, p. 221-229
- [17] BRITTON, George. Structure and properties of carotenoids in relation to function. The FASEB Journal, 1995, 9.15: 1551-1558.
- [18] ŠIVEL, M., KLEJDUS, B., KRÁČMAR, S., KUBÁŇ, V. Lutein – Významný karotenoid ve výživě člověka. Chemické listy, 2013, 107, 456-463. ISSN: 0009-2770
- [19] AWASTHI, By Ajay Kumar. Bioseparation engineering: a comprehensive DSP volumen. New Delhi: I. K. International Publishing House, 2009. ISBN 978-938-0026-084.
- [20] BÍLKOVÁ, Kateřina. Izolace biomakromolekul. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1997, 206 s. ISBN 80-708-0288-X.
- [21] DAVEY, Hazel M.; KELL, Douglas B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. Microbiological reviews, 1996, 60.4: 641-696.

- [22] AVELAR-FREITAS, B.A., V.G. ALMEIDA, M.C.X. PINTO, F.A.G. MOURÃO, A.R. MASSENSINI, O.A. MARTINS-FILHO, E. ROCHA-VIEIRA a G.E.A. BRITO-MELO. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry: Meanings and Methods in Microbiology. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2014, vol. 47, issue 4, s. 307-3015. DOI: 10.1590/1414-431X20143437. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext
- [23] MOSIMAN, Victoria L., et al. Reducing cellular autofluorescence in flow cytometry: an in situ method. Cytometry, 1997, 30.3: 151-156.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CC	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>
PI	propidium jodid
MB	methylenova modř
NČ	nilská červeň
RG	<i>Rhodotorula glutinis</i>
SR	<i>Sporobolomyces roseus</i>
SSh	<i>Sporobolomyces shibatanus</i>
TB	trypanová modř