

Optimiziranje metode za brzo određivanje vijabilnosti kvasaca

Radović, Mia

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:614799>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Mia Radović
6819/BT

OPTIMIZIRANJE METODE ZA BRZO ODREĐIVANJE VIJABILNOSTI KVASACA

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Genetičko inženjerstvo

Mentor: doc.dr.sc. Anamarija Štafa

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Završni rad

Optimiziranje metode za brzo određivanje vijabilnosti kvasaca

Mia Radović, 0058203807

Sažetak: Alkoholna fermentacija proces je proizvodnje etanola iz fermentabilnih šećera, a najčešće ju provode kvasci iz roda *Saccharomyces*. Proces je potrebno kontinuirano nadzirati zbog pravovremenog otkrivanja potencijalne kontaminacije nepoželjnim mikroorganizmima. Jedan od važnih proizvodnih parametara je vijabilnost stanica kvasaca, no klasične mikrobiološke metode koje se koriste za analizu često su dugotrajne. Cilj ovog rada bio je optimizirati metodu za brzo određivanje postotka nevijabilnih stanica kvasaca, temeljenu na fluorescencijskoj mikroskopiji, pri čemu su korišteni kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, koji provodi alkoholnu fermentaciju mošta, i kvasac *Dekkera bruxellensis*, najčešći kontaminant tijekom proizvodnje vina. Za usporednu analizu postotka nevijabilnih stanica u kulturi korištene su komercijalno dostupne fluorescentne boje: akridin oranž, floksin B, propidij jodid i tripan plavo, a rezultati su uspoređeni s postotkom nevijabilnih stanica određenim bojenjem metilenskim modrilom. Utvrđeno je da se bojanje tripan plavim ili propidij jodidom može koristiti za pouzdano određivanje postotka nevijabilnih stanica kvasaca *S. cerevisiae* i *D. bruxellensis*.

Ključne riječi: fluorescencijska mikroskopija, *Dekkera bruxellensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, vijabilnost

Rad sadrži: 28 stranica, 7 slika, 5 tablica, 47 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Anamarija Štafa

Pomoć pri izradi: doc.dr.sc. Anamarija Štafa

Datum obrane: 8.9.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics
Scientific area: Biotechnical Sciences Scientific
Field: Biotechnology

Bachelor thesis

Optimization of method for fast assesment of yeast viability

Mia Radović, 0058203807

Abstract: Alcohol fermentation is a process of ethanol production from fermentable sugars, usually done by yeasts from the *Saccharomyces* genus. It is necessary to continuously monitor fermentation process in order to detect different contaminant microorganisms. One of the most important parameters monitored is yeast viability, but the classical microbiological methods used for its determination require long time. The aim of this work was to optimise a method, based on a fluorescent microscopy, that will allow fast detection of the percentage of non viable yeasts in the culture. Several commercially available fluorescent dies were used: acridine orange, phloxin B, propidium iodide and tripan blue. The obtained results were compared with the percentage determined by staining with methylene blue. Both tripan blue and propidium iodide can be used for reliable determination of the percentage of non viable yeast cells of *S. cerevisiae*, the species responsible for alcohol fermentation, and *Dekkera bruxellensis*, the main contaminant during wine production.

Keywords: fluorescence microscopy, *Dekkera bruxellensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, viability

Thesis contains: 28 pages, 7 figures, 5 tables, 47 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Asst.Prof. Anamarija Štafa, Ph.D.

Technical support and assistance: Asst.Prof. Anamarija Štafa, Ph.D.

Defence date: 8.9.2017.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kvasci	2
2.1.1. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.1.2. Kvasac <i>Brettanomyces/Dekkera bruxellensis</i>	3
2.2. Metode za identifikaciju kvasaca	5
2.3. Metode za određivanje postotka vijabilnih stanica u kulturi.....	5
2.3.1. Određivanje broja živih stanica nacjepljivanjem.....	5
2.3.2. Određivanje postotka živih stanica mikroskopiranjem.....	6
2.3.2.1. Boje koje se koriste za određivanje postotka nevijabilnih stanica mikroskopiranjem	7
2.3.2.1.1. Akridin oranž.....	8
2.3.2.1.2. Floksin B.....	9
2.3.2.1.3. Propidij jodid	9
2.3.2.1.4. Tripan plavo	9
2.3.2.1.5. Metilensko modrilo	10
2.4. Metode za određivanje postotka fiziološki aktivnih (vitalnih) stanica mikroskopiranjem	10
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Mikroorganizmi.....	12
3.1.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasaca.....	12
3.1.3. Otopine i boje korištene pri mikroskopiranju	14
3.2. Metode.....	14
3.2.1. Priprema uzoraka za mikroskopiranje	14
3.2.2. Određivanje postotka nevijabilnih stanica	15
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	16
4.1. Određivanje postotka nevijabilnih stanica u kulturi kvasca <i>S. cerevisiae</i>	16
4.2. Određivanje postotka nevijabilnih stanica u kulturi kvasca <i>D. bruxellensis</i>	19
5. ZAKLJUČCI	24
6. POPIS LITERATURE	25

1. UVOD

Vino nastaje alkoholnom fermentacijom (vrenjem) mošta, iscijeđenog soka grožđa, koju provode određeni sojevi vinskih kvasaca, a ovisno o tipu, razlikuje se spontana i kontrolirana fermentacija. Spontanu fermentaciju izazivaju kvasci prisutni na grožđu i na površini opreme vinarije. Prevladavajuća vrsta na površini grožđa je *Kloeckera apiculata*, koja može činiti i više od 50% prirodno prisutne flore (Fugelsang i Edwards, 2007), dok su u manjim koncentracijama prisutni i rodovi: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia* i *Rhodotorula* (Fleet i Heard, 1993; Ribereau-Gayon i sur., 2006). Na površini opreme u vinariji najčešće se nalazi kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (Martini i Vaughan-Martini, 1990), iako su u manjim koncentracijama izolirani i rodovi: *Brettanomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia* i *Torulasporea*. Oni započinju spontanu fermentaciju mošta do nastanka 4% (v/v) etanola koji inhibira daljnji rast nekih rodova. Vrenje nastavljaju i završavaju sojevi kvasaca iz roda *Saccharomyces* koji toleriraju veće koncentracije etanola. U kontroliranom vrenju prevladavaju selekcionirani vinski kvasci *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces bayanus*, ali su u manjem broju prisutne su i ostale, manje značajne vrste iz prirodne populacije koje se tada smatraju kontaminacijom jer izlučuju razne metabolite u vino.

Važni indikatori dobrog procesa vrenja su koncentracije ukupnih i vijabilnih kvasaca koje je potrebno kontinuirano pratiti jer mikrobna kontaminacija vina rezultira velikim ekonomskim gubitcima. Vijabilnost je definirana kao postotak živih stanica u cjelokupnoj populaciji, no zbog razlike između smrti stanice i gubitka metaboličke aktivnosti uveden je i pojam stanične vitalnosti koja označava fiziološku aktivnost stanice. Iako postoje mnoge mikrobiološke metode određivanja vitalnosti i vijabilnosti, koje se temelje na naciepljivanju uzoraka na kompletne i selektivne hranjive podloge, intenzivno se istražuju nove, brže i preciznije metode kojima bi se smanjilo vrijeme potrebno za kontrolu tijekom fermentacije.

Cilj ovog rada optimizirati je metodu za brzo određivanje vijabilnosti kvasaca, temeljenu na mikroskopiji, koristeći komercijalno dostupne boje: akridin oranž, floksin B, propidij jodid, tripan plavo i metilensko modriilo. Optimiziranje metode provedeno je koristeći kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, koji provodi alkoholnu fermentaciju mošta, i kvasac *Dekkera bruxellensis*, najčešći kontaminant tijekom proizvodnje vina.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kvasci

Kvasci su mikroskopski jednostanični eukarioti s heterotrofnim fermentativnim metabolizmom koji spadaju u carstvo *Fungi*. Pokazuju veliku heterogenost u morfološkim i fiziološkim karakteristikama, a važni su u proizvodnji piva i vina, pekarskih proizvoda, sireva, industrijskih enzima i antibiotika.

Komunikacija stanice sa okolišem odvija se posredstvom slojevitih struktura koje okružuju citoplazmu te kontroliraju permeabilnost i osmotski tlak stanice. Od unutarstaničnog prema izvanstaničnom prostoru to su: (cito)plazmatska membrana, periplazmatski prostor, stanična stijenka i dodatni slojevi karakteristični za pojedine vrste, a kod najbolje istraženog kvasca, *Saccharomyces cerevisiae* oni mogu činiti i do 15% staničnog volumena. Citoplazmatska membrana ima strukturu fluidnog mozaika (Singer i Nicolson, 1972), a sastoji se od lipidnog dvosloja s nekonzistentnim globularnim proteinima. Ona predstavlja primarnu barijeru za prolaz hidrofilnih molekula i služi za sprečavanje miješanja unutarstaničnog i izvanstaničnog sadržaja. Selektivno je permeabilna zbog postojanja specifičnih membranskih proteina sa funkcijama aktivnog transporta (ATPaze). Lipidni sastav utječe na svojstva membrane, fosfolipidi pridonose fluidnosti, a steroli krutosti membrane. Periplazma ili periplazmatski prostor je tanak (35-45 Å), eksterni dio citoplazmatske membrane. Sadrži sekretorne proteine koji ne mogu proći kroz staničnu stijenku i u tom se prostoru enzimski hidroliziraju. Stanična stijenka stanici daje karakteristični oblik, pruža zaštitu i predstavlja barijeru na koju se vežu brojni enzimi, poput hidrolaza, važni za odvijanje staničnih procesa. Debela je 100-200 nm i građena pretežno od polisaharida: glukana, manana i hitina, čiji se omjer razlikuje ovisno o vrsti kvasaca (Walker, 1998). Na površini stanične stijenke nalaze se manoproteini koji čine 25-50% stijenke (Riberau-Gayon i sur., 2006). Disulfidne veze i hidrofobne interakcije manoproteina određuju poroznost stanice i stvaraju nepropusni sloj za makromolekule.

2.1.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* nepatogeni je jednostanični eukariot iz carstva *Fungi* i razreda *Ascomycetes*. Prvi je eukariotski organizam kojemu je sekvencioniran cijeli genom (Goffeau i sur., 1996). Ovalne, haploidne stanice imaju dimenziju 4,76 x 4,19 µm, a diploidne 6,01 x 5,06 µm (Herskowitz, 1988). Prirodni izolati kvasca *S. cerevisiae* najčešće su diploidi, no javljaju se i kao poliploidi ili čak aneuploidi (Balkansky i Snow, 1990; Codon i sur., 1995).

Vinski kvasci roda *S. cerevisiae* su prototrofi, za rast ne zahtijevaju aminokiseline ili nukleotide, što ih razlikuje od aukrostrofnih laboratorijskih sojeva. Generacijsko vrijeme laboratorijskih sojeva iznosi 90 minuta pri rastu u kompleksnoj hranjivoj podlozi (podloga YPD), dok je u kemijski definiranoj hranjivoj podlozi 140 minuta, a optimalna temperatura za rast iznosi 28-30 °C.

Haploidne stanice kvasca *S. cerevisiae* mogu biti **a** ili α tipa parenja i razmnožavaju se vegetativno, pupanjem, pri čemu se nakon svake diobe možemo razlikovati stanicu majku i stanicu kćer. Uz mogućnost vegetativnog razmnožavanja, diploidne stanice, heterozigotne za tip parenja i u uvjetima niske koncentracije dušika i ugljika, mogu ući u mejotičku diobu. Mejozom iz jedne diploidne stanice nastaju četiri haploidne askospore, dvije **a** i dvije α tipa parenja. Konjugacijom dviju haploidnih stanica različitog tipa parenja ponovno nastaje stabilni diploid. Prirodni izolati kvasca *S. cerevisiae* su najčešće homotalični (Thornton i Eschenbruch, 1976), što znači da nakon diobe stanica majka mijenja tip parenja, čime iz jedne haploidne spore nastaje diploidna kolonija.

S. cerevisiae upotrebljava se kao glavni modelni organizam pri proučavanju gotovo svih staničnih procesa eukariotskih organizama zbog nepatogenosti, kratkog generacijskog vremena i dobro razvijenih metoda za manipulaciju genoma. Dodatno, ovaj kvasac ima široku u prehrambenoj industriji, proizvodnji alkohola i alkoholnih pića, krmiva i enzima. Dodijeljen mu je GRAS (engl. Generally Regarded As Safe) status, što znači da je bezopasan za ljudsko zdravlje. U vinskoj industriji komercijalno je dostupno više od 200 različitih, selekcioniranih sojeva koji se u procesu vođene fermentacije mošta dodaju ili u liofiliziranom obliku ili kao tekuća starter kultura. U industrijskim procesima značajan je zbog svoje tolerancije na visoke koncentracije etanola i niski pH koji se pojavljuju u većini bioprocesa. Također, zbog jednostavnog unošenja i integracije gena u genom domaćina zahvaljujući uspješnoj homolognoj rekombinaciji, pogodan je za ekspresiju i proizvodnju rekombinantnih proteina.

2.1.2. Kvasac *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*

Klasifikacija gljiva vezana je uz seksualnu reprodukciju te se u literaturi mogu naći dualna imena za istu vrstu kvasaca, kao što je slučaj za kvasac *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. Kvasac *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* jednostanični je eukariot iz carstva *Fungi* i razreda *Ascomycetes*. *Brettanomyces* je naziv za anamorfnu, aseksualnu obliku kvasca, kojeg je 1904. godine otkrio Hjelte Claussen iz „New Carlsberg“ pivovare istražujući specifičnu aromu engleskih ale piva. Ime mu je dodijelio prema grčkim riječima „brettano“ (britansko) i „myces“ (gljiva). Kasnije je, otkrićem teleomorfne, seksualne i sporogene oblike, istoj vrsti

dodijeljen i naziv „*Dekkera*“ u čast Nellie Margarethe Stelling-Dekker, pionirke u sistematizaciji kvasaca (van der Walt, 1964). Danas je za vrstu uvriježeno ime *D. bruxellensis* koje će se koristiti u nastavku.

D. bruxellensis je daleki srodnik kvasca *S. cerevisiae*, od kojeg se evolucijski razdvojio prije 200 milijuna godina (Rozpedowska i sur, 2011). Morfološka karakterizacija roda *Dekkera* subjektivna je zbog raznovrsnosti oblika stanica. Naime, stanice su često nehomogenog izgleda, variraju od elipsoidnih, cilindričnih, sfernih do izduljenih. Ovaj kvasac prirodno je prisutan u uzorcima vina (naročito crnim desertnim), na površini grožđa, na opremi u vinarijama i u starim hrastovim bačvama. *D. bruxellensis* je fakultativni anaerob i Crabtree pozitivan kvasac (Rozpedowska i sur. 2011). Prilagodljiviji je od ostalih kvasaca što mu je omogućilo egzistenciju u oštrim i limitirajućim okolišnim uvjetima poput visoke koncentracije etanola, niske koncentracije izvora dušika i niskog pH (Fugelsang, 1996; Rozpedowska i sur., 2011). Optimalna temperatura za rast je u rasponu između 19 °C i 35 °C, a pri temperaturi iznad 45 °C rast je onemogućen. Ovaj kvasac pokazuje negativan Pasteurov efekt, tj. Custerov efekt u kojem kisik stimulira katabolizam glukoze u posebnom fermentativnom putu (Scheffers, 1966).

Rod *Dekkera*, sa najzastupljenijom vrstom *D. bruxellensis*, smatra se glavnim svjetskim uzročnikom kvarenja vina (Boulton i sur, 1996; Fugelsang, 1996). Raznolikost sojeva *D. bruxellensis*, značajno doprinosi varijaciji kvarenja proizvoda, a kontaminirana vina poprimaju nepoželjne arome koje podsjećaju na miris spaljene plastike, mokre kože i životinjske dlake, sedla itd. (Licker i sur., 1998). Za te arome zaslužni su produkti metabolizma kvasca, u najvećem udjelu nestabilni fenol 4-etilfenol (4-EP), ali i 4-etilguajakol (4-EG) te 4-etilkatehol (4-EC). Mnogi kvasci, uključujući *S. cerevisiae*, imaju mogućnost dekarboksilacije 4-vinilfenola u 4-etilfenol, ali samo *D. bruxellensis* može istovremeno reducirati i dekarboksilirati crno vino (Chatonnet i sur., 1995) zbog sinteze enzima hidrocinamat dekarboksilaze i vinilfeonol reduktaze (Phister i Mills, 2003). Upravo je zbog tog svojstva standardizirana metoda određivanja aktivnosti *D. bruxellensis* mjerenjem koncentracije 4-etilfenola (Loureiro i Malfeito-Ferreira, 2003). *D. bruxellensis* se najčešće javlja za vrijeme starenja i odležavanja vina u hrastovim bačvama. Metode detekcije i identifikacije ovog kvasca dobro su razvijene, kako bi vinari pravovremeno mogli reagirati na kontaminacije i spriječiti gubitke u proizvodnji. Za razliku od nepoželjnog prisustva u vinu, *D. bruxellensis* je poželjan kvasac u proizvodnji piva poput belgijskog Stouta, Lambika i Gueuze. Budući da nije dio prirodne mikroflore tj. ne sudjeluje u spontanoj fermentaciji u pivskoj industriji, pivari ga naknadno dodaju u proces kao starter kulturu. Prirodno se nalazi u okruženju varionice, gdje živi u hrastovim bačvama, a glavna mu je uloga u razvoju arome tijekom odležavanja i starenja piva.

2.2. Metode za identifikaciju kvasaca

Osnovne mikrobiološke metode za identifikaciju kvasaca temelje se na upotrebi biokemijskih testova i selektivnih podloga. Biokemijski testovi omogućuju identifikaciju na razini vrste, a najpoznatiji je API test (engl. Application programming interfaces). Selektivne podloge najčešće imaju različiti kemijski sastav i omogućuju rast jedne ili malog broja vrsta kvasaca (Ambriović Ristov, 2007). Najčešće se upotrebljavaju minimalne hranjive podloge koje služe za selekciju auksotrofnih mutanata, sojeva i vrsta koji ovise o nekim tvarima rasta, jer sadrže samo mineralne soli i glukozu kao izvor ugljika. Osim njih, upotrebljavaju se i podloge sa antibioticima koje selekcioniraju rezistentne mikroorganizme.

Osim mikrobioloških, u identifikaciji mikroorganizama koriste se i brojne molekularne metode, temeljene na analizi DNA kao što su: elektroforeza u gradijentu denaturirajućeg agensa (DGGE), lančana reakcija polimerazom (PCR) i sekvencioniranje. Za detekciju, identifikaciju i brojanje stanica kvasaca roda *Dekkera* u uzorcima iz vinarije, često se koristi FISH metoda (engl. fluorescent *in situ* hybridization, Connell i sur., 2002). Iako su ove metode precizne, ograničene su na identifikaciju već poznatih vrste mikroorganizama, a pri analizi ne razlikuju žive i mrtve stanice.

2.3. Metode za određivanje postotka vijabilnih stanica u kulturi

Vijabilnost se najčešće koristi za određivanje postotka živih stanica u populaciji. Nasuprot tome, vitalnost opisuje metaboličku aktivnost stanice (poglavlje 2.4.). U skladu s tim, stanica može biti živa, i metabolički aktivna ili inaktivna, ili mrtva. Određivanje vijabilnosti stanica najčešća je i najzastupljenija metoda za analizu utjecaja kemijskih i fizikalnih faktora na mikroorganizme, a svakodnevno se koriste dvije kategorije testova (Kwolek-Mirek i Zadrag-Tecza, 2014). U prvoj kategoriji su metode koje analiziraju rast stanica u tekućem ili na čvrstom hranjivom mediju kao što su CFU (poglavlje 2.3.1). U drugoj su metode za diferencijalno bojanje pojedinačnih stanica koje se temelje na nepropusnosti stanične stijenke i funkcionalnosti stanične membrane (poglavlje 2.3.2).

2.3.1. Određivanje broja živih stanica nacjepljivanjem

Jedna od najčešće korištenih mikrobioloških metoda je određivanje broja živih stanica koje su sposobne stvoriti kolonije (engl. CFU, Colony Forming Units). Na čvrstu hranjivu podlogu nacjepljuje se originalni uzorak, ili odgovarajuće decimalno razrjeđenje, te se nakon inkubacije na podlozi mogu vidjeti i prebrojati pojedinačne kolonije, uz pretpostavku da je svaka kolonija potekla iz jedne stanice. Dobivene vrijednosti se izražavaju kao jed. CFU mL⁻¹

za tekuće ili jed. CFU mg⁻¹ za čvrste uzorke. Iako je ova metoda jeftina, najveći problem predstavlja vrijeme potrebno za porast kolonija, što ovisi o generacijskom vremenu različitih vrsta kvasaca.

2.3.2. Određivanje postotka živih stanica mikroskopiranjem

Mikroskopija je tehnika promatranja sitnih, oku nevidljivih objekata mikroskopom. Mikroskop nam pruža uvid u oblike čestica, njihovu strukturu, veličinu, broj i slično. Ovisno o načinu dobivanja slike promatranog objekta, konstruirani su različiti tipovi mikroskopa kao što su svjetlosni, elektronski i mikroskop sa pretražnom sondom.

Svjetlosni mikroskop optički je instrument u kojem slika nastaje skupljanjem vidljive svjetlosti s promatranog objekta pomoću optičkih leća. Najmanja veličina promatranih objekata mjeri se u desetinama mikrometara za standardni svjetlosni mikroskop, a kod posebnih izvedbi svjetlosnih mikroskopa u desecima nanometara. Najjednostavniji je svjetlosni mikroskop za mikroskopiranje u svijetlom vidnom polju, prikladan za obojene uzorke. Elektronski mikroskop elektronički je uređaj u kojem slika promatranog objekta nastaje pomoću zraka elektrona koje se skupljaju elektromagnetskim lećama. Najmanja veličina promatranih objekata mjeri se u nanometrima, a u upotrebi su dvije tehnike: TEM (engl. Transmission electron microscopy) i SEM (Scanning electron microscopy). Mikroskop sa pretražnom sondom (engl. Scanning Probe Microscope) elektronički je uređaj u kojem kontakt površine promatranog objekta i vrlo tanke sonde sastavljene do nekoliko atoma, daje podatke o objektu koji se kombiniraju u računalno dobivenu sliku. Najmanja veličina promatranih objekata mjeri se u angstromima ($\text{Å} = 10^{-10}$ m), a najpoznatije tehnike su STM (engl. Scanning Tunneling Microscopy) i AFM (engl. Atomic Force Microscopy).

Fluorescencijska mikroskopija, poznatija i pod nazivom mikroskopija širokog polja, metoda je svjetlosne mikroskopije koju karakterizira svojstvo dobre vidljivosti fluorescentnih objekata u mraku. Fluorescencija je pojava u kojoj je uzorak izložen zračenju više energije, čime se uzrokuje ekscitacija slobodnih i vezanih elektrona, atoma ili molekula. Dio te energije se apsorbira, a dio emitira u obliku svjetlosti određene valne duljine koja se može detektirati. Fluorescencijski mikroskop detektira razliku između valnih duljina ekscitirane i emitirane svjetlosti, koje su odabrane pomoću posebnih sustava pobudnih i emisijskih filtera. Primjenjuje se za istraživanje različitih tipova stanica i vizualizaciju proteinskih struktura, nukleinskih kiselina i iona. Neki organizmi prirodno fluoresciraju, tj. posjeduju svojstvo autofluorescencije pri određenim valnim duljinama, dok drugi nemaju to svojstvo zbog čega je za pojavu fluorescencije potrebno je dodati posebne tvari (fluorescentne boje). Da bi tvar emitirala fluorescenciju mora imati fluorofor (fluorokrom), kemijsku tvar koja omogućava visoko

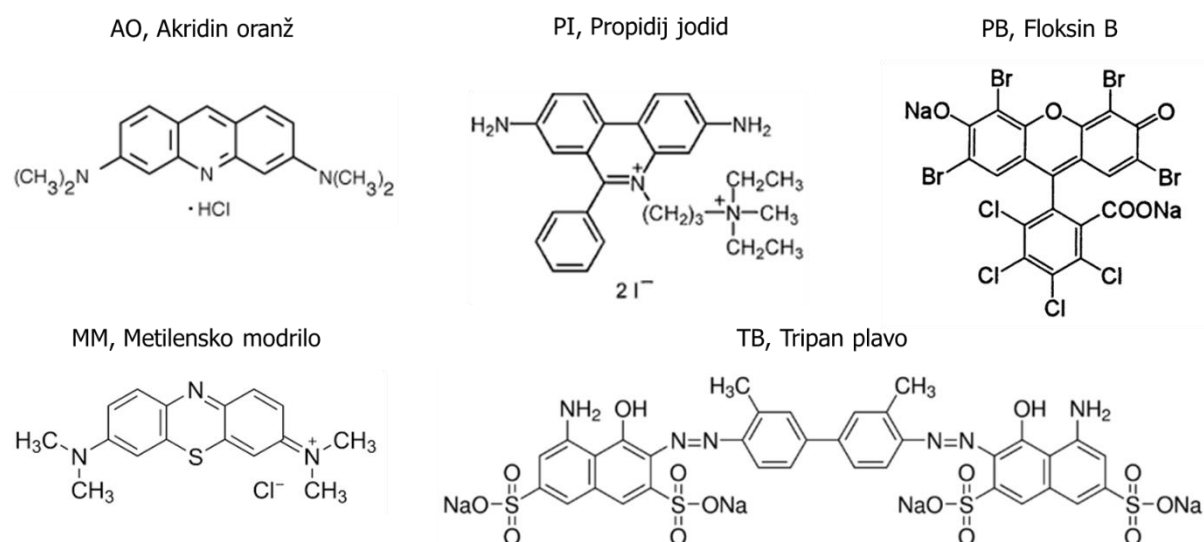
specifičnu vizualizaciju fluorescentnih objekata na tamnoj pozadini. Prema tome razlikujemo dvije metode vizualizacije željene tvari. Fluorokrom može doći u obliku fluorescentnog proteina, poput zelenog fluorescentnog proteina (engl. GFP, green fluorescent protein), prirodno izoliranog iz meduze *Aequoria victoria* (Shimomura, 1962). Razvijeni su komercijalni vektori koji sadrže gen koji kodira za fluorescentni protein i omogućavaju kloniranje gena od interesa ispred ili iza GFP-a, čime nastaje fuzionirani protein čiju je funkciju i lokalizaciju lagano pratiti. Druga, značajno brža metoda koristi diferencijalno bojenje stanica bojama koje se direktno vežu na ciljne stanične makromolekule ili protutijela obilježena fluorescentnim bojama, fluorokromima, koja se direktno ili indirektno vežu na ciljanu strukturu. Direktno vezanje podrazumijeva specifičnu interakciju fluorescentno obilježenih protutijela i antigena. U slučaju indirektno fluorescencije, npr. pomoću FITC-a (fluorescein izotiocijanat) ili Alexa Fluor boje (Panchuk-Voloshina, 1999), koriste se dva protutijela - primarno protutijelo nije fluorescentno obilježeno, ali se izravno veže na željenu strukturu. Sekundarno protutijelo obilježeno je fluorescentnom bojom i veže se na primarno protutijelo, te omogućuje vizualizaciju čitave strukture.

2.3.2.1. Boje koje se koriste za određivanje postotka nevijabilnih stanica mikroskopiranjem

Boje koje se koriste u mikroskopiji vežu se na stanične komponente različitim mehanizmima. Ovisno o električnom naboju molekule, dijele se na kisele i bazične. Bazične (kationske) boje imaju pozitivan naboj i reagiraju s jezgrenim komponentama dok su kisele (anionske) boje negativno nabijene i najčešće se vežu na citoplazmatski materijal i neke vrste staničnih granula, no mogu bojati i jezgru (DNA-vezajuće boje). Jednostavno bojenje uključuje primjenu samo jedne boje, kao što je metilensko modrilo, a nasuprot tome, složena ili diferencijalna bojenja uključuju više boja.

Mehanizam djelovanja boja ovisi o kemijskom sastavu stanične stijenke i svojstvima stanične membrane (poglavlje 2.1). Naime, stanična membrana odvaja unutarstanični od izvanstaničnog prostora, pa njeno oštećenje najčešće dovodi do smrti stanice. S jedne strane, anionske boje, kao što DNA-vezajuće fluorescentne boje poput propidij jodida (Lomezamoroz i sur., 1995; Fannjiang i sur., 2004) ili kolorimetrijske boje poput tripan plavog (McGahon i sur., 1995), ne mogu penetrirati u žive stanice zbog negativnog naboja membrane, pa ulaze samo u stanice s oštećenom membranom (mrtve stanice) gdje boje jezgru ili citoplazmu. S druge strane, boje poput floksina B i metilenskog modrila ulaze u žive i mrtve stanice, no žive će stanice ovakve boje ili ispumpati ili reducirati te postati bezbojne, dok će mrtve ostati obojane.

Boje koje se koriste za fluorescencijsku mikroskopiju (fluorokromi) mogu se svrstati u 4 grupe ovisno o valnim duljinama pobuđivanja i emitiranja: *a)* boje koje se pobuđuju u ultraljubičastim dijelom spektra (~ 350 nm) te emitiraju u plavom dijelu spektra (~ 450 nm); *b)* derivati fluorescein-izotiocijanata (FITC), pobuđuju se u plavom (~ 490 nm), a emitiraju u zelenom dijelu spektra (~ 520 nm); *c)* boje srodne rodaminu, pobuđuju se u zelenom dijelu spektra (~ 560 nm), a emitiraju u crvenom dijelu spektra (~ 580 nm), *d)* derivati karbocijanidna (tip Cy2) pobuđuju u crvenom dijelu spektra (~ 630 nm), a emitiraju u dalekom crvenom dijelu spektra (~ 660 nm). Strukturne formule i fizikalno-kemijska svojstva, najčešće korištenih boja za određivanje postotka vijabilnosti, prikazane su na Slici 1 i u Tablici 1.



Slika 1. Strukturne formule boja koje se koriste za određivanje postotka vijabilnosti stanica u kulturi.

Tablica 1. Fizikalne i kemijske karakteristike boja koje se koriste za određivanje postotka vijabilnosti stanica u kulturi (Mr=molekulska masa, Ex=valna duljina ekscitacije, Em=valna duljina emisije)

Boja (kratica)	Ex [nm]	Boja spektra	Em [nm]	Boja spektra	Mr
Akridin oranž (AO)	460-500	plavo	520-650	zeleno	301,82
Floksin B (PB)	540	zeleno	654	crveno	829,63
Propidij jodid (PI)	493-532	zeleno	630	crveno	668,39
Tripan plavo (TB)	530-550	zeleno	675	crveno	960,79
Metilensko modriilo (MM)	-	-	-	-	319,85

2.3.2.1.1. Akridin oranž

Akridin oranž organski je spoj molekulske formule $C_{17}H_{20}ClN_3$ koji se koristi za detekciju staničnog ciklusa i vijabilnosti stanica. Može proći kroz staničnu stijenku i membranu pa se u stanici specifično veže na nukleinske kiseline (Kregiel, Berlowska, 2009). Naime, ova boja može interkalirati između parova dušičnih baza ili se elektrostatski vezati za nukleinske kiseline. Kada

je vezan na DNA, ekscitiran je pri maksimalnoj valnoj duljini od 502 nm, a emitira pri 525 nm (zeleno), dok kad je vezan na RNA ekscitiran je s 460 nm, a emitira pri 650 nm (crveno). Dodatno, akridin oranž u protoniranom stanju ima sposobnost ulaska u odjeljke poput lizosoma, koji imaju kiseli pH. Budući da kod apoptotičnih stanica dolazi do raspadanja lizosoma, akridin oranž se, u kombinaciji s etidijevim bromidom, često koristi kao marker za diferencijalno bojanje vijabilnih, nekrotičnih i apoptotičnih stanica.

2.3.2.1.2. Floksin B

Floksin B je kisela boja, derivat fluoresceina, empirijske formule $C_{20}H_2Br_4Cl_4Na_2O_5$. Boju karakterizira antimikrobno djelovanje, jer u prisustvu svjetlosti djeluje baktericidno na gram pozitivne bakterije. Gram negativne bakterije otporne su na floksin B zahvaljujući dodatnom lipopolisaharidnom sloju na površini stanice, no uz dodatak EDTA, koji uzrokuje povećanu permeabilnost membrane, moguć je ulazak boje u stanicu i njena smrt. Floksin B koristi se za bojenje mrtvih stanica više vrsta kvasaca uključujući *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*. Crveno se oboje sve stanice kvasca ali samo metabolički aktivne mogu ispumpati boju izvan stanice i ostati neobojane (Minois i sur., 2005) dok nevijabilne stanice s izgubljenim integritetom stanične membrane akumuliraju crvenu boju u unutrašnjosti stanice (Kwolek-Mirek i Zadrąg-Tecza, 2014).

2.3.2.1.3. Propidij jodid

Propidij jodid polarna je boja molekulske formule $C_{27}H_{34}I_2N_4$ koja ulazi samo u stanice koje su izgubile cjelovitost stanične membrane. Stanice kvasaca mogu se, u određenim uvjetima, oporaviti od gubitka integriteta stanične membrane što može utjecati na određivanje postotka vijabilnih stanica jer broj obojanih stanica može biti veći od broja stvarno mrtvih stanica (Haase i Reed, 2002). Ova boja interkalira između parova dušičnih baza DNA ili dvolančanih RNA molekula te tako vezana fluorescira crvenom bojom (Ambrović Ristov, 2007). Uz određivanje vijabilnosti stanica, u praksi se propidij jodid često koristi i za bojenje DNA (ThermoFisher database).

2.3.2.1.4. Tripian plavo

Tripian plavo organska je stanična boja molekulske formule $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$ koja se koristi u rutinskim analizama za određivanje stanične vijabilnosti. Naime, nevijabilne stanice akumuliraju plavu boju u citoplazmi i citosolu dok ju vijabilne stanice aktivno izbacuju preko transmembranskih pumpi. Negativna karakteristika ove boje je veći afinitet za serumske proteine od staničnih, pa prilikom mikroskopiranja može doći do prejakog pozadinskog

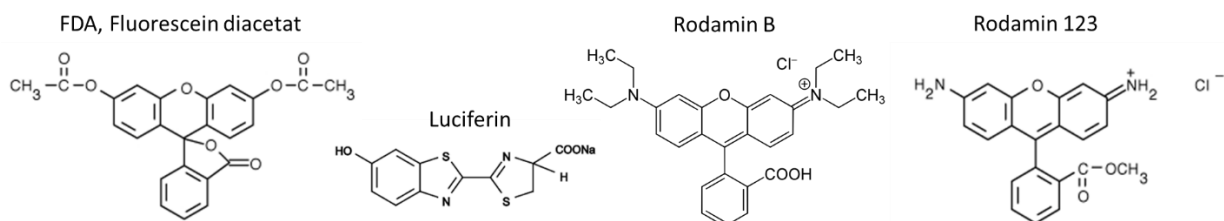
obojenja dok predugo izlaganje boji može dovesti do obojenja živih stanica (Ambrović-Ristov, 2007).

2.3.2.1.5. Metilensko modrilo

Metilensko modrilo (tetrametilitionin klorid) kristalni je spoj metalno plavozelenog sjaja, molekulske formule $C_{16}H_{18}ClN_3S$. Predstavnik je bazičnih tijazinskih boja, a upotrebljava se kao boja za papir, pamuk, lan, konoplju i kožu, u medicini kao antiseptik, a u mikroskopiji za bojenje stanica. U prisutnosti kisika, vodena otopina metilenskog modrila izrazito je modre boje, no kako koncentracija kisika pada, u kiselom mediju se lako reducira u bezbojan oblik. Zahvaljujući upravo tom svojstvu služi kao akceptor vodika i kemijski indikator u istraživanju bioloških redoks reakcija. Zbog jednostavnosti postupka i korištenja običnog svjetlosnog mikroskopa, svakodnevno se koristi za određivanje nevijabilnih stanica koje boji plavo (Kwolek-Mirek i Zdrag-Tecza, 2014), dok vijabilne stanice postaju bezbojne zbog redukcije boje (Painting i Kirsop, 1990).

2.4. Metode za određivanje postotka fiziološki aktivnih (vitalnih) stanica mikroskopiranjem

Vitalnost je mjera fiziološkog stanja stanice i pruža uvid u djelovanje kemijskih i fizikalnih faktora na morfološke, intracelularne i metaboličke promjene. Metode određivanja vitalnosti se grubo mogu podijeliti na tri kategorije (Kwolek-Mirek i Zdrag-Tecza, 2014): *a*) mjerenje aktivnosti enzima; *b*) mjerenje koncentracije staničnog ATP-a reakcijom s luciferinom i *c*) mjerenje mitohondrijskog membranskog potencijala bojenjem rodaminom B ili rodaminom 123 (Slika 2 i Tablica 2). Od navedenih metoda, najčešće se koristi mjerenje aktivnosti esteraza pomoću fluorescein diacetata ili unutarstaničnih enzima bojom FUN-1 (Millard i sur., 1997) no iako su navedene metode objektivnije one zahtijevaju i znatno skuplju opremu.



Slika 2. Strukturne formule boja koje se koriste za određivanje postotka vitalnih stanica u kulturi.

Tablica 2. Fizikalne i kemijske karakteristike boja koje se koriste za određivanje postotka vitalnih stanica u kulturi (Mr=molekulska masa, Ex=valna duljina ekscitacije, Em=valna duljina emisije)

Boja (kratica)	Ex [nm]	Boja spektra	Em [nm]	Boja spektra	Mr
Fluorescein diacetat (FDA)	489	plavo	514	zeleno	416,39
Luciferin	327-385	ultraljubičasto	537	zeleno	280,32
Rodamin B	540	zeleno	625	crveno	479,02
Rodamin 123	511	zeleno	534	zeleno	380,83

Fluorescein diacetat boja je molekulske formule $C_{24}H_{16}O_7$ koja se koristi u određivanju enzimske aktivnosti i stanične vitalnosti (Breeuwer i sur., 1995). Nenabijena je nefluorescentna boja koja nepromijenjena prolazi kroz membranu stanice. Unutar stanice, brzo je hidrolizirana unutarstaničnom esterazom pri čemu nastaje fluorescein, koji fluorescira zeleno, a zbog svoje polarnosti ne može izaći iz živih stanica (Nikolova i sur., 2000-2002). Učestala je upotreba boje u kombinaciji sa propidij jodidom za određivanje vijabilnosti u eukariotskim stanicama. Naime, mrtve stanice, sa narušenom staničnom membranom, fluorescirati će crveno zahvaljujući propidij jodidu, dok će žive biti zelene zbog nastanka fluoresceina.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizmi

U ovome radu korišteni su kvasac *Saccharomyces cerevisiae* soj NCYC 3582 (UWOPS87-2421) i kvasac *Dekkera bruxellensis* soj 2499 CBS.

3.1.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasaca

Sve podloge i otopine steriliziraju se u autoklavu 20 minuta pri 121°C i čuvaju pri sobnoj temperaturi ili se pripremaju iz sterilnih matičnih otopina i sterilne deionizirane vode. Krute podloge dobiju se iz tekućih dodatkom agara prije sterilizacije.

Za uzgoj kvasca *S. cerevisiae* korištena je kompletna kompleksna podloga YPD (engl. Yeast Peptone Dextrose), a za kvasac *D. bruxellensis* kompleksna podloga GYP (engl. Glucose Yeast Peptone). Rast stanica *S. cerevisiae* bez autofluorescencije omogućila je YNB kemijski definirana hranjiva podloga (engl. Yeast Nitrogen Base) koja je komplementirana sa 1,7 gL⁻¹ smjese nukleinskih baza i aminokiselina.

YPD podloga:

Ekstrakt kvasca	10 g L ⁻¹
Bakto-pepton	20 g L ⁻¹
Glukoza	20 g L ⁻¹
Agar	20 g L ⁻¹

GYP podloga:

Ekstrakt kvasca	5,0 g L ⁻¹
Bakto-pepton	10,0 g L ⁻¹
Glukoza	20,0 g L ⁻¹
Agar	20,0 g L ⁻¹

YNB podloga:

Amonijev sulfat	5 gL ⁻¹
Magnezijev sulfat	0,5 gL ⁻¹
Natrijev klorid	0,1 gL ⁻¹
Kalcijev klorid	0,1 gL ⁻¹
Kalijev dihidrogenfosfat	1 gL ⁻¹

Borna kiselina	0,0005 gL ⁻¹
Bakrov (II) sulfat	0,00004 gL ⁻¹
Kalijev jodid	0,0001 gL ⁻¹
Željezov (III) klorid	0,0002 gL ⁻¹
Manganov sulfat	0,0004 gL ⁻¹
Natrijev molibdat	0,0002 gL ⁻¹
Cinkov sulfat	0,0004 gL ⁻¹
Biotin	0,000002 gL ⁻¹
Kalcijev pantotemat	0,0004 gL ⁻¹
Niacin	0,0004 gL ⁻¹
PABA (Paraaminobenzojeva kiselina)	0,0002 gL ⁻¹
Piridoksin HCl	0,0004 gL ⁻¹
Tiamin hidroklorid	0,0004 gL ⁻¹

Smjesa nukleinskih baza i aminokiselina:

Adenin sulfat	2,5 g
Uracil	1,2 g
L-arginin-klorid	1,2 g
L-asparaginska kis.	6,0 g
L-glutaminska kis.	6,0 g
L-histidin-klorid	1,2 g
L-leucin	3,6 g
L-lizin-klorid	1,8 g
L-metionin	1,2 g
L-fenilalanin	3,0 g
L-serin	22,5 g
L-treonin	12,0 g
L-triptofan	2,4 g
L-tirozin	1,8 g
L-valin	9,0 g

3.1.3. Otopine i boje korištene pri mikroskopiranju

Stanice kvasca prije bojanja resuspendirane su ili u sterilnoj deioniziranoj vodi ili u 0,1 M natrijevom citratu.

Boje za određivanje vijabilnosti i vitalnosti nabavljene su u praškastom obliku, a otapala koja su korištena za pripremu koncentriranih matičnih otopina navedena su u Tablici 3.

Tablica 3. Koncentracije otopina boja korištenih u ovom radu (DMSO=dimetil sulfoksid)

Boja (kratica)	Proizvođač	Otapalo	Koncentracija matične otopine	Koncentracija radne otopine	Temperatura skladištenja
Akridin oranž (AO)	Kemika, Hrvatska	voda	0,5 gL ⁻¹	0,005 gL ⁻¹	4 °C
Floksin B (PB)	Sigma-Aldrich, SAD	DMSO	10 gL ⁻¹	1 gL ⁻¹	4 °C
Propidij jodid (PI)	Sigma-Aldrich, SAD	voda	1 gL ⁻¹	0,5 gL ⁻¹	4 °C
Tripan plavo (TB)	Sigma-Aldrich, SAD	DMSO	40 gL ⁻¹	0,04 gL ⁻¹	4 °C
Metilensko modriilo (MM)	Kemika, Hrvatska	voda	0,1 gL ⁻¹	0,05 gL ⁻¹	4 °C

3.2. Metode

3.2.1. Priprema uzoraka za mikroskopiranje

Stanice kvasaca *S. cerevisiae* uzgojene su u kompletnoj kompleksnoj podlozi YPD ili u kompletnoj kemijski definiranoj podlozi, a stanice kvasca *D. bruxellensis* uzgojene su u kompletnoj kompleksnoj podlozi GYP. Stanice su izdvojene iz 5-10 mL kulture, centrifugiranjem na sobnoj temperaturi pri 3000 okretaja tijekom 3 minute. Supernatant je odbačen, a preostali talog resuspendiran je u 500 µL 0,1 M natrijevog citrata. Suspenzija stanica ponovno je centrifugirana pri 3000 okretaja tijekom 3 minute, a talog je ponovo resuspendiran u 0,1 M natrijevom citratu te su pripravljena dva prva decimalna razrjeđenja originalne suspenzije stanica u sterilnoj deioniziranoj vodi. Jedna paralela je zagrijavana pri 100°C, 10 min u PCR uređaju ili 15 min u vrijućoj vodenoj kupelji, i ovako pripremljen uzorak s nevijabilnim stanicama pomiješan je s uzorkom pripremljenim iz kulture stanica u eksponencijalnoj fazi.

Uzorcima su dodane pojedinačne boje do radnih koncentracija navedenih u Tablici 3 i ostavljeni su na sobnoj temperaturi u mraku, 30-60 minuta. U slučaju slabog obojenja, produljeno je vrijeme inkubacije s bojom. 20 µL svakog uzorka korišteno je za mikroskopiranje.

3.2.2. Određivanje postotka nevijabilnih stanica

Korišten je epifluorescentni EVOS FLoid Imaging Station mikroskop opremljenom sa monokromnom visoko osjetljivom CCD kamerom i Invitrogen „FLoid“ Imaging Station programskim paketom. Za detekciju i vizualizaciju fluorescentnih signala u ovom radu korištena su tri filtera: plavi (ekscitacija/emisija: 390/446 nm), zeleni (ekscitacija/emisija: 482/532 nm) i crveni (ekscitacija/emisija: 586/646 nm). Pri fotografiranju različitih fluorescentnih kanala korišten je konstantni intenzitet svjetlosti, 50% za kvasac *S. cerevisiae* i 70% za kvasac *D. bruxellensis*, kako bi se omogućila što bolja reproducibilnost. Iznimka je bojenje stanica kvasca *S. cerevisiae* bojom tripan plavo, gdje je intenzitet svjetlosti po potrebi korigiran na 70% čime je omogućena bolja vizualizacija rezultata.

Prednost EVOS FLoid Imaging Station sustava leži u mogućnosti simultanog prikaza stanica, fotografiranih pod svjetlim vidnim poljem i uz upotrebu fluorescentnih filtera, bez upotrebe dodatnih programskih paketa za obradu i analizu fotografija čime je pojednostavljeno brojanje fluorescentnih obojanih stanica.

Na svijetlom vidnom polju EVOS FLoid Imaging Station mikroskopa prebrojano je minimalno 300 stanica kvasaca, a korištenje različitih fluorescentnih filtera omogućilo je kvantitativno određivanje postotka stanica obojanih odgovarajućom bojom koja je korištena za bojenje vijabilnih ili nevijabilnih stanica. Zbog specifičnih karakteristika boja, brojani su i pupovi na stanicama majkama kao jedinstvene stanice neovisno o njihovoj veličini. Kao referentna vrijednost za kvasac *S. cerevisiae* korišten je postotak nevijabilnih stanica određen bojenjem s metilenskim modrilom.

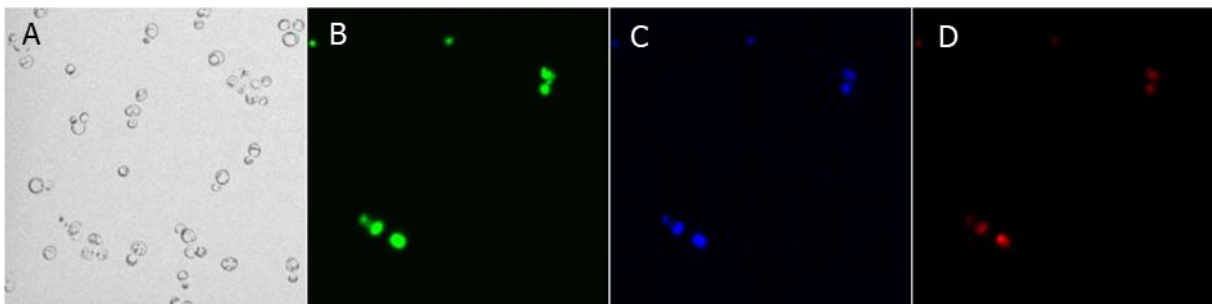
4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada optimizirati je metodu za brzo određivanje postotka nevijabilnih stanica kvasca, temeljenu na fluorescencijskoj mikroskopiji. U tu svrhu korištene su kulture kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, koji provodi alkoholnu fermentaciju te kvasca *Dekkera bruxellensis*, najčešćeg kontaminanta tijekom proizvodnje vina. Fluorescentne boje korištene u ovom radu boje nevijabilne stanice, ali se mehanizam koji dovodi do obojenja stanica razlikuje. Naime boje akridin oranž i propidij jodid ulaze u stanice koje imaju narušen integritet stanične membrane, dok boje metilensko modrilo, floksin B i tripan plavo ulaze u sve stanice, ali se vijabilne stanice obezboje. Postotak nevijabilnih (mrtvih) stanica detektiran bojenjem komercijalno dostupnim fluorescentnim bojama uspoređen je s postotkom nevijabilnih stanica određenim bojenjem metilenskim modrilom.

4.1. Određivanje postotka nevijabilnih stanica u kulturi kvasca *S. cerevisiae*

Uzorci kvasca *S. cerevisiae* (poglavlje 3.2.1.), bojeni su komercijalno dostupnim fluorescentnim bojama, a fotografije, snimljene pomoću EVOS Flouid Imaging mikroskopa, analizirane su kako bi se odredilo koje su fluorescentne boje najprikladnije za određivanje postotka nevijabilnih stanica i koji intenzitet osvjetljenja je potrebno koristiti pri fotografiranju s ciljem standardizacije metode.

Bojenje mrtvih stanica propidij jodidom rezultiralo je pojavom signala koji je detektiran upotrebom sva tri fluorescentna filtera (Slika 3).

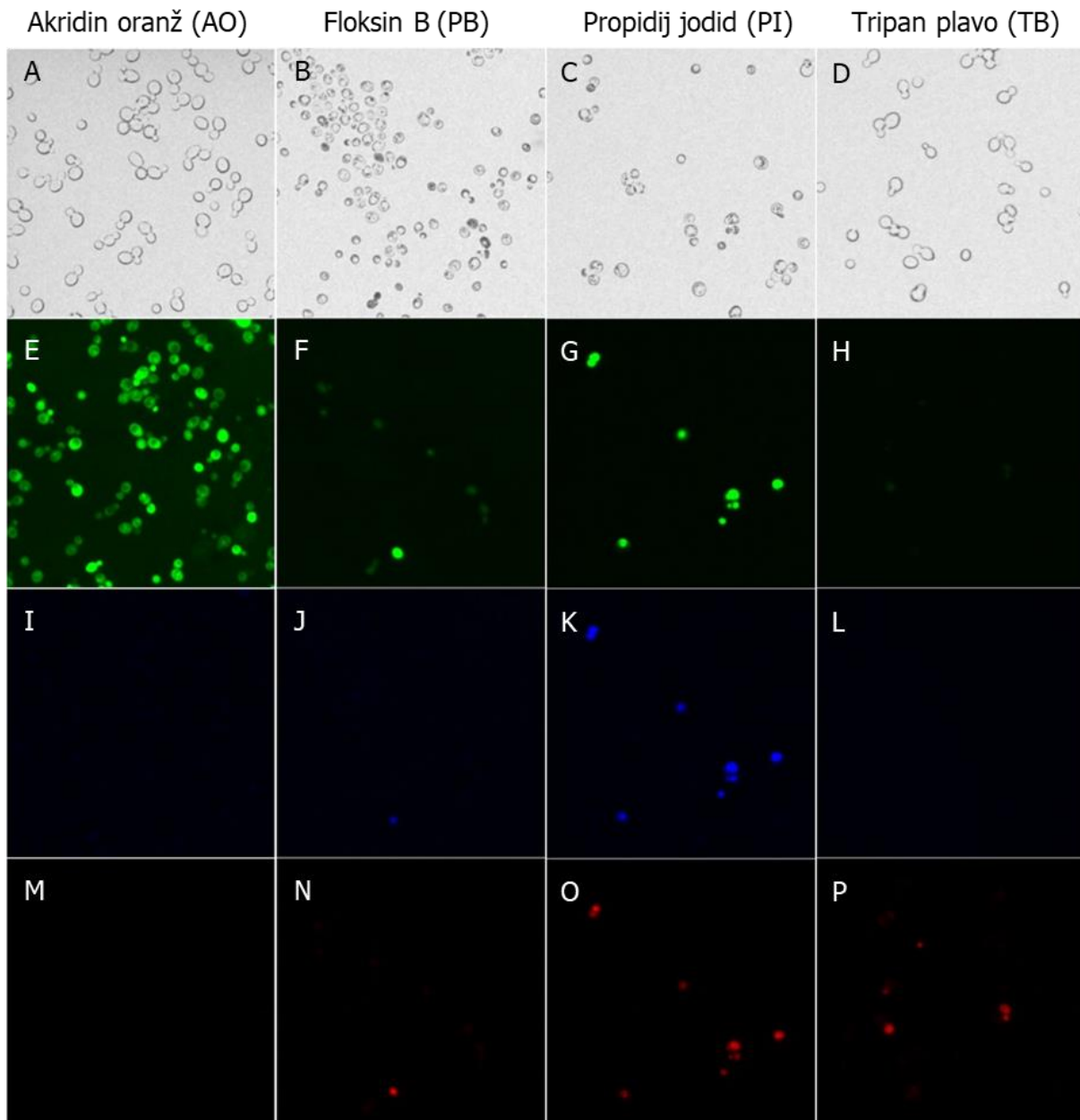


Slika 3. Analiza postotka nevijabilnih stanica kvasca *S. cerevisiae* obojenih propidij jodidom na svijetlom vidnom polju (A) i uz upotrebu zelenog (B), plavog (C) i crvenog (D) filtera EVOS FLoid Imaging Station mikroskopa.

Unatoč pojavi fluorescentnog signala pri upotrebi sva tri filtera te pri istom intenzitetu osvjetljenja, signal dobiven korištenjem zelenog filtera je najintenzivniji i najjasniji čime je omogućeno lagano brojanje nevijabilnih stanica. Osim za fluorescencijsku mikroskopiju, bojanje propidij jodidom izrazito često koristi se i pri određivanju ploediteta stanica kvasca

(Svetec i sur., 2007 i Štafa i sur., 2014) ili faze staničnog ciklusa protočnom citometrijom (Haase i Reed, 2002).

Kultura kvasca *S. cerevisiae*, korištena je za usporedbu postotka nevijabilnih stanica određenih bojanjem s akridin oranžem, floksinom B, propidij jodidom i tripan plavim sa postotkom određenim bojanjem metilenskim modrilom (Slika 4, Tablica 4).



Slika 4. Bojanje nevijabilnih stanica u kulturi kvasca *S. cerevisiae* različitim fluorescentnim bojama. Fotografije svijetlog vidnog polja (A-D) i dobivene upotrebom zelenog (E-H), plavog (I-L) i crvenog (M-P) fluorescentnog filtera.

Tablica 4. Usporedba postotka nevijabilnih stanica u kulturi kvasca *S. cerevisiae* određenih bojenjem različitim bojama. Navedeni su fluorescentni filteri sa pripadajućim intenzitetima svjetlosti korištenim pri fotografiranju.

Fluorescentni filter (intenzitet svjetlosti)	Akridin oranž	Floksin B	Propidij jodid	Tripan plavo	Metilensko modriilo	
Svijetlo vidno polje (30%)	100,00 %	100,00 %	100,00 %	100,00 %	Ukupno 100 %	Mrtvo 5,76 %
Zeleni (50%)	7,02 %	6,61 %	4,86 %	5,50 %	-	
Plavi (50%)	0,00 %	0,00 %	4,86 %	0,00 %	-	
Crveni (50%)	0,00 %	0,00 %	4,86 %	5,69 %	-	

Najveći postotak nevijabilnih stanica određen je pri bojenju akridin oranžem, koji ulazi u sve stanice no metabolički aktivne ga ispumpavaju u okoliš. Zbog toga se pri korištenju akridin oranža primjećuje kontinuirani porast jakosti signala što otežava određivanje praga intenziteta signala nakon kojeg će stanice biti proglašene nevijabilnima (Jerabkova, 2005).

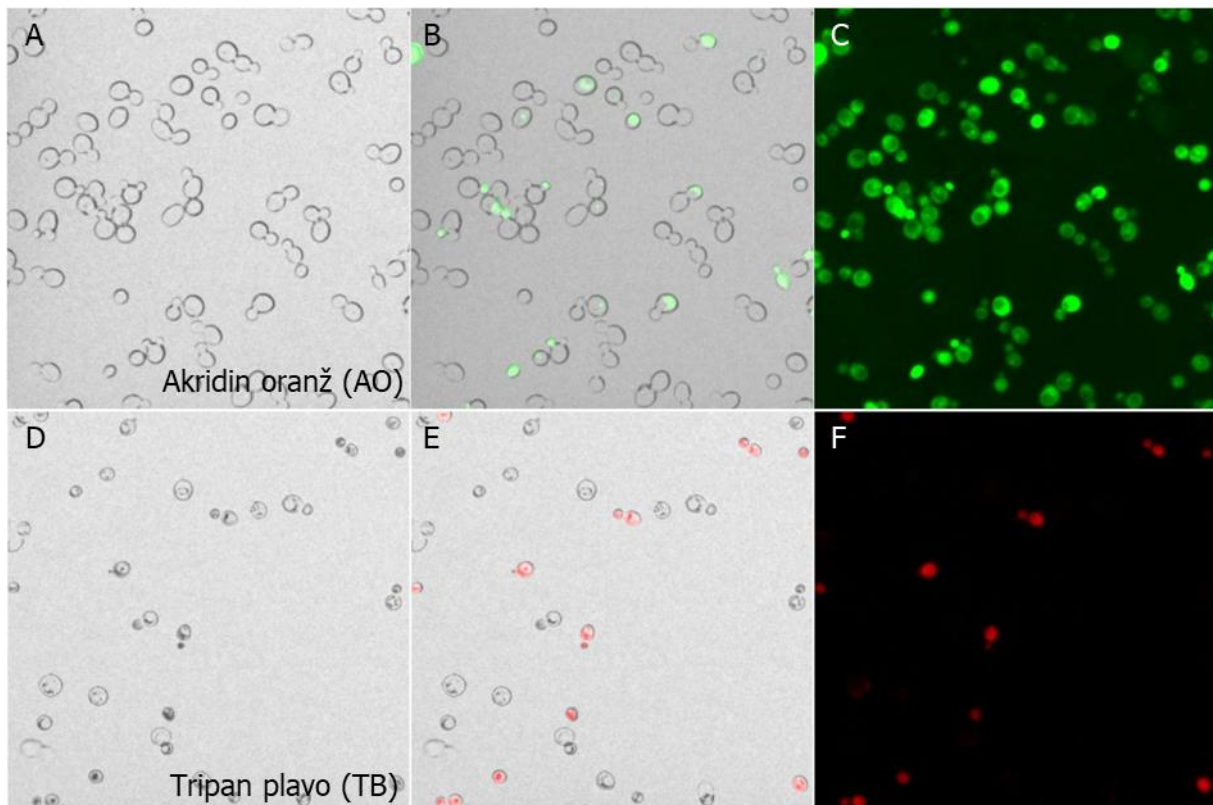
Floksin B omogućuje vizualizaciju nevijabilnih stanica upotrebom zelenog fluorescentnog filtra, no u usporedbi s ostalim korištenim bojama, intenzitet signala znatno je slabiji, što otežava analizu (Slika 4). Na slici 4, na svim kanalima vidljiv je i jak signal, za kojega je usporedbom sa svijetlim vidnim poljem utvrđeno da se ne radi o nevijabilnoj stanici, već o onečišćenju.

Najmanji postotak nevijabilnih stanica utvrđen je bojanjem s propidij jodidom (Tablica 4), budući da integritet stanice mora biti potpuno izgubljen kako bi boja mogla ući u stanicu (Ambrović-Ristov, 2007).

Bojanje tripan plavim omogućilo je detekciju signala upotrebom crvenog fluorescencijskog filtra, no primijećena je i pojava difuznih signala pri korištenju zelenog filtra koje nije moguće kvantificirati (Slika 4).

Vizualizacija obojenih stanica korištenjem samo jednog fluorescentnog filtra omogućuje bržu analizu fotografija i određivanje postotka nevijabilnih stanica. Nasuprot tome, bojenje propidij jodidom omogućuje korištenje sva tri fluorescentna filtera, čime je omogućena točnija analiza postotka nevijabilnih stanica, ali je istovremeno produljeno vrijeme analize. Iako dobiveni rezultati pokazuju relativno mala odstupanja od referentnih vrijednosti dobivenih bojenjem metilenskim modrilom, najpreciznije određivanje postotka vijabilnosti postiže se korištenjem boje tripan plavo (Tablica 4).

Dodatno, radi sprječavanja pogrešne interpretacije rezultata, ali i lakšeg brojanja mrtvih stanica moguće je koristiti i preklopljene fotografije dobivene fotografiranjem svijetlog vidnog polja i odgovarajućeg fluorescentnog kanala (Slika 5).



Slika 5. Preklapanje fotografija pojednostavljuje određivanje postotka nevijabilnih stanica u kulturi kvasca *S. cerevisiae*. Svijetlo vidno polje (A i D), preklapljeni slika (B i E), fotografija dobivena upotrebom odgovarajućeg fluorescentnog filtera (C i F).

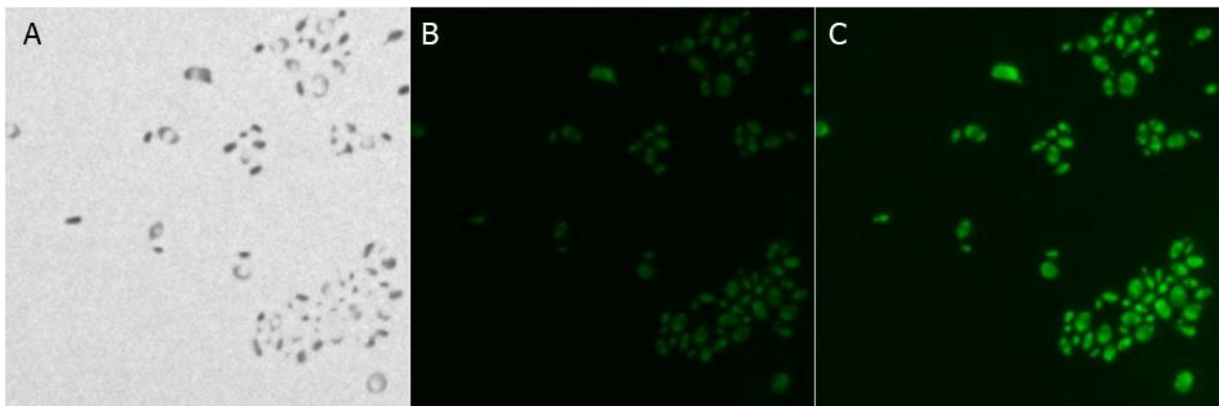
Preklapanje fotografija izrazito je korisno pri određivanju postotka nevijabilnih stanica bojanjem s akridin oranžem jer neujednačenost intenziteta signala može rezultirati subjektivnošću pri brojanju te odstupanjem rezultata od stvarnih vrijednosti (Tablica 4). Kod korištenja drugih fluorescentnih boja, npr. tripan plavog, preklapanje fotografija omogućuje izrazito brzo određivanje postotka nevijabilnih stanica. Pregledom literature ustanovljeno je se preklapanje fotografija ne koristi često što je najvjerojatnije posljedica toga da većina fluorescentnih mikroskopa, za razliku od ovdje korištenog EVOS Flouid Imaging sustava, nema u svom programskom paketu mogućnost preklapanja fotografija, nego je takvo preklapanje moguće napraviti tek upotrebom dodatnih računalnih programa.

4.2. Određivanje postotka nevijabilnih stanica u kulturi kvasca *D. bruxellensis*

Nakon što su u ovome radu određeni parametri za reproducibilnu i brzu analizu postotka nevijabilnih stanica kvasca *S. cerevisiae* (poglavlje 4.1.), glavnog mikroorganizma koji provodi alkoholnu fermentaciju mošta, željelo se utvrditi da li se ova metoda može koristiti i pri radu s kvascem *D. bruxellensis* koji je najčešći kontaminant vina. Naime, kvasac *D. bruxellensis* postao je tema temeljnih i primijenjenih istraživanja tek u zadnjih dva desetljeća i o njemu još uvijek ne postoji velika količina informacija. Za analizu postotka nevijabilnih

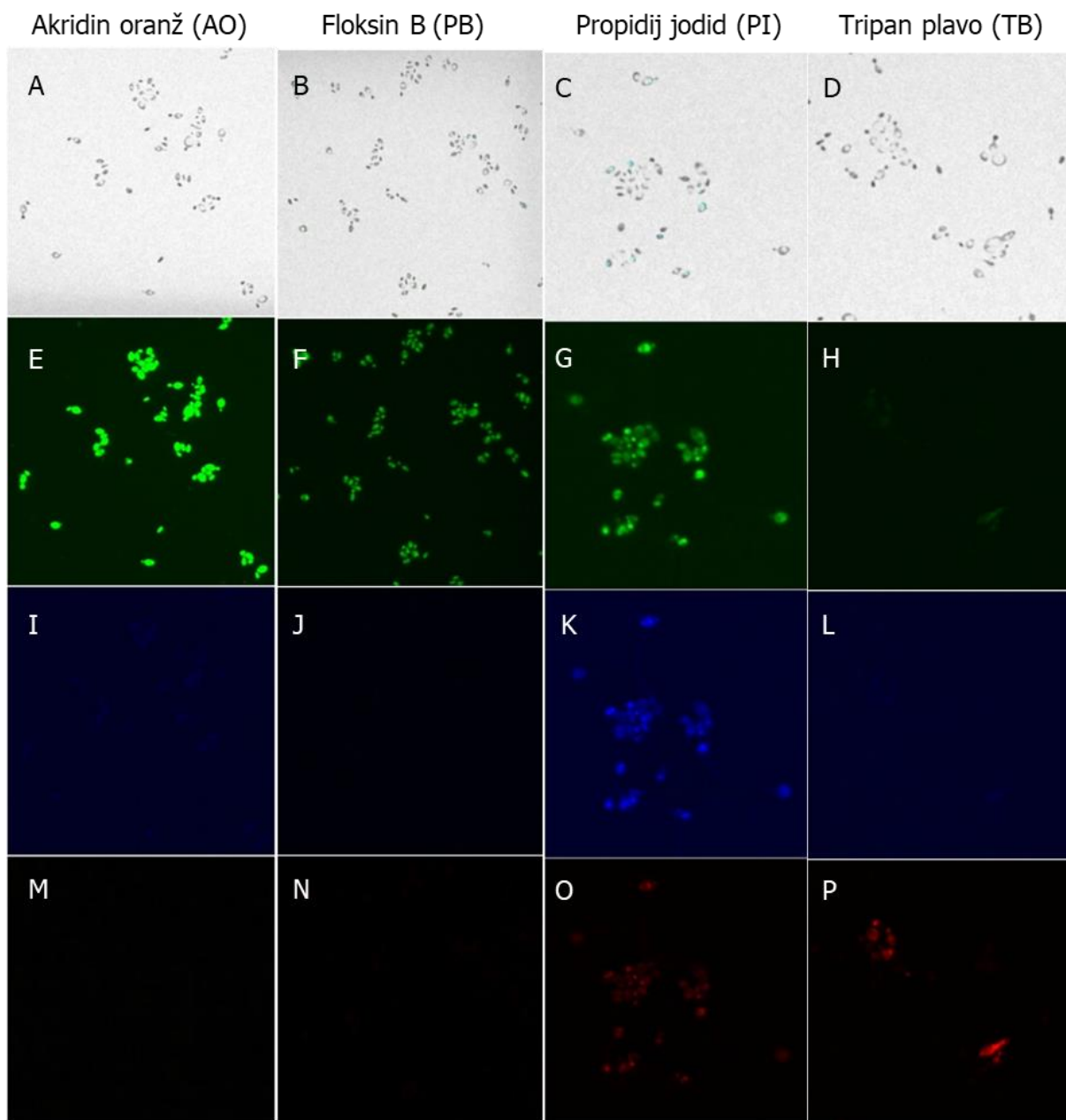
stanica do sada je korišteno metilensko modrilo (Painting i Kirsop, 1990), dok su za analizu protočnom citometrijom korišteni propidij jodid, tijazol oranž i SYTO16 (Thorton i sur., 2002). Iako su *S. cerevisiae* i *D. bruxellensis* kvasci iz razreda *Ascomycetes*, stanice *D. bruxellensis* znatno su manje i nisu morfološki uniformne, zbog čega je bilo potrebno prilagoditi uvjete mikroskopiranja.

U eksperimentima opisanim u ovom poglavlju korištene su kulture u kojima je većina stanica bila termički inaktivirana. Slika 6 prikazuje utjecaj različitog intenziteta osvjetljenja na određivanje postotka vijabilnosti stanica obojenih floksinom B.



Slika 6. Bojenje kulture kvasca *D. bruxellensis* floksinom B. Svjetlo vidno polje (A) i obojene stanice fotografirane pri 50% (B) i 70% (C) intenziteta svjetlosti pri korištenju zelenog fluorescentnog filtera.

Kako bi se spriječilo različito očitavanje broja obojenih i neobojenih stanica, pri radu s kvascem *D. bruxellensis*, sve su fotografije napravljene koristeći 70% intenzitet osvjetljenja (Slike 6 i 7, Tablica 5).



Slika 7. Bojenje nevijabilnih stanica u kulturi kvasca *D. bruxellensis* različitim fluorescentnim bojama. Fotografije svijetlog vidnog polja (A-D) i dobivene upotrebom zelenog (E-H), plavog (I-L) i crvenog (M-P) fluorescentnog filtera.

Bojenje stanica akridin oranžem dalo je jasan signal samo upotrebom zelenog fluorescentnog filtera (Slika 7), iako je primijećena je i pojava slabo obojanih stanica, koje nije bilo moguće prebrojati, uz upotrebu crvenog filtera.

Stanice obojane floksinom B mogu se uočiti samo pri korištenju zelenog filtera, no primijećena je i pojava slabo obojanih stanica, koje nije bilo moguće prebrojati, uz upotrebu crvenog filtera.

Bojanje propidij jodidom, kao i kod kvasca *S. cerevisiae*, dalo je uniformne signale koji se mogu vizualizirati upotrebom sva tri fluorescentna filtera što, iako daje bolji uvid u točnost rezultata, produljuje vrijeme analize.

Za detekciju stanica obojanih tripan plavim najadekvatniji je bio crveni fluorescentni filter, iako se pri korištenju zelenog moglo opaziti difuzno obojenje stanica.

Tablica 5. Prikaz vrijednosti fluorescentnih signala analiziranog uzorka netretirane laboratorijske kulture *D. bruxellensis*. U prvom stupcu navedeni su svijetlo vidno polje i fluorescentni filteri sa pripadajućim intenzitetima svjetlosti

Fluorescentni filter (intenzitet svjetlosti)	Akridin oranž	Floksin B	Propidij jodid	Tripan plavo
Svijetlo vidno polje (30%)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Zeleni (70%)	98,41%	97,52%	96,45%	0,00%
Plavi (70%)	0,00%	0,00%	96,45%	0,00%
Crveni (70%)	0,00%	98,02%	96,45%	98,20%

Iz rezultata prikazanih u tablici 5, vidljivo je kako se najmanji postotak nevijabilnih stanica obojio propidij jodidom, čime je potvrđen eksperimentalni rezultat dobiven i kod kulture *S. cerevisiae*. Nasuprot tome, bojenje akridin oranžem ponovno je rezultiralo najvećim postotkom nevijabilnih stanica, no u slučaju kvasca *D. bruxellensis* odstupanje je manje u odnosu na ostale boje.

U eksperimentima bojanja kvasca *D. bruxellensis* različitim fluorescentnim bojama generirane su i preklapajuće slike dobivene fotografiranjem svijetlog vidnog polja i određenog fluorescentnog kanala. Ovakve fotografije ponovo su bile posebno bitne kod utvrđivanja postotka nevijabilnih stanica bojanjem akridin oranžem, čime je minimizirana subjektivnost u bojanju uzrokovana različitim intenzitetima fluorescentnih signala.

Rezultati prikazani u tablicama 3 i 4 sugeriraju da se bojenje kultura kvasaca *S. cerevisiae* i *D. bruxellensis* tripan plavim ili propidij jodidom može koristiti za točno određivanje postotka nevijabilnih stanica. Štoviše, bojenje tripan plavim ili propidij jodidom moglo bi se koristiti i za određivanje postotka nevijabilnih stanica pojedinačnih vrsta kvasaca u miješanoj kulturi *S. cerevisiae* i *D. bruxellensis* jer se ove dvije vrste znatno razlikuju veličinom i morfologijom. Također, moguće su i daljnje modifikacije metode opisane u ovom radu kako bi se ona mogla što jednostavnije koristiti za praćenje procesa u kojima se pojavljuju *S. cerevisiae* i *D. bruxellensis*, kao što je na primjer alkoholna fermentacija pri proizvodnji vina. Naime, sastav i građa staničnih stijenki ova dva kvasca nije potpuno jednaka pa bi dodatno korištenje boje koja selektivno boji jednu vrstu, moglo značajno skratiti vrijeme potrebno za određivanje

udjela specifične vrste kvasca u miješanoj populaciji te za analizu postotka vijabilnosti različitih vrsta kvasaca tijekom alkoholne fermentacije.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti:

1. Najniži postotak nevijabilnih stanica detektiran je bojenjem kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* i *Dekkera bruxellensis* propidij jodidom jer boja ulazi samo u stanice koje imaju narušen integritet stanične stijenke.
2. Određivanje postotka nevijabilnih stanica u kulturi kvasaca *S. cerevisiae* i *D. bruxellensis* bojenjem propidij jodidom i tripan plavim je jednostavno, brzo i pouzdano.
3. Bojenje akridin oranžem, zbog subjektivnosti pri interpretaciji intenziteta obojenja stanica, ne može se koristiti kao pouzdana metoda za određivanje postotka nevijabilnih stanica u kulturi kvasaca *S. cerevisiae* i *D. bruxellensis*.

6. POPIS LITERATURE

Ambriović Ristov A. (2007) Metode u molekularnoj biologiji, Brozović A., Bruvo Mađarić B., Četković H., Herak Bosnar M., Hranilović D., Katušić Hećimović S., Meštrović Radan N., Mihaljević S., Slade N. i Vujaklija D., ur., Institut Ruđer Bošković. Str. 94-96, 616-626, 723-724, 735-737.

Bakalinsky A. T., Snow R. (1990) The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **6**: 367, 382.

Barata A., Caldeira J., Botelho R., Pagiara D., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. (2007) Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *International Journal of Food Microbiology* **121**: 201-207.

Boulton R., Singleton V., Bisson L., Kunkee R. (1996) Principles and Practices of Winemaking. Chapman & Hall, Str. 352-368.

Carracosa A. V., Munoz R., Gonzales R. (2011) Molecular wine microbiology, 1. izd., Elsevir. Str. 1-4, 85-88.

Chatonnet P., Viala C., Dubourdieu D. (1997) Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *Am. J. Enol. Vitic.* **48**: 443- 448.

Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J. N. (1995) The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am J Enol Viticult* **46**: 463-8.

Codon A. C., Gasent-Ramirez J. M., Benitez T. (1995) Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* bakers yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 345, 386.

Connell L., Stender H., Edwards C. G. (2002) Rapid detection and identification of *Brettanomyces* from winery air samples based on peptide nucleic acid analysis. *Am. J. Enol. Vitic.*, **53**: 322-324.

Fannjiang Y., Cheng W. C., Lee S. J. i sur. (2004) Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev* **18**: 2785–2797.

Fleet G. H., Heard G. (1993) Yeast growth during fermentation. Wine microbiology and biotechnology, Harwood Academic Publishers. Str. 27-57.

Fugelsang K. C., Edwards C. G. (2007) Wine microbiology: Practical applications and procedures, 2 izd, Springer Science Business Media. Str. 3-28.

- Fugelsang K. C. (1996) *Wine Microbiology*. Chapman & Hall Pub. Co.
- Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J. D., Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H. W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S. G. (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546–563.
- Haase S. B., Reed S. I. (2002) Improved flow cytometric analysis of the budding yeast cell cycle. *Cell Cycle*, **1**: 117-121.
- Henschke P., Curtin C., Grbin P. (2007) Molecular characterisation of the wine spoilage yeast – *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Under the Microscope*: 76-78.
- Heresztyn T. (1986) Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **37**: 127-132.
- Heresztyn T. (1986) Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. *Arch. Microbiol.* **146**: 96-98.
- Herskowitz I. (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, **52**: 536-553.
- Jerabkova P. (2005) Determination of yeast viability by means of fluorescence microscopy and image analysis. *Sborník soutěže Studentské tvůrčí činnosti Student 2006*: 115-118.
- Konig H., Uden G., Frohlich J. (2009) Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Springer, Str. 47-51.
- Kregiel D., Berłowska J. (2009) Evaluation of yeast cell vitality using different fluorescent dyes. *Food chemistry and Biotechnology*, **73**: 5-13.
- Kwolek-Mirek M., Zadrag-Tecza R. (2014) Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Res* **14**: 1068-1079.
- Licker J. L., Acree T. E., Henick-Kling T. (1998) What is 'Brett' (*Brettanomyces*) flavour? A preliminary investigation. In *Chemistry of Wine Flavour*. Waterhouse A. L., Ebeler S. E., ur. American Chemical Society, ACS Symposium Series Vol. 714: str. 96–115.
- Lopezamoros R., Comas J., Vivesrego J. (1995) Flow cytometric assessment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* starvation-survival in seawater using rhodamine-123, propidium iodide, and oxonol. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2521–2526.
- Loureiro V., Malfeito-Ferreira M. (2003) Spoilage yeasts in the wine industry. *Int J Food Microbiol* **86**: 23-50.

- Martini A., Vaughan-Martini A. (1990) Grape must fermentation: Past and present. Spencer J. F. T., Spencer D. M., ur. *Yeast technology*, Springer-Verlag. Str. 105-123.
- McGahon A. J., Martin S. J., Bissonnette R. P. i sur. (1995) The end of the (cell) line – methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods Cell Biol* **46**: 153–185.
- Millard P. J., Roth B. L., Thi H. P. T., Yue S. T., Haugland R. P. (1997) Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2897–2905.
- Minois N., Frajnt M., Wilson C., Vaupel J. W. (2005) Advances in measuring lifespan in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *P Natl Acad Sci USA* **102**: 402–406.
- Nikolova M., Savova I., Marinov M. (2000-2002) An optimized method for investigation of the yeast viability by means of fluorescent microscopy. *Journal of culture collections*, Vol. **3**: 66-71.
- Painting K., Kirsop B.. (1990) A quick method for estimating the percentage of viable cells in a yeast population, using methylene-blue staining. *World J Microbiol Biotechnol* **6**: 346–347.
- Panchuk–Voloshina N., Haugland R. P., Bishop–Stewart J., Bhalgat M. K., Millard P. J., Mao F., Leung W.-Y., Haugland R. P. (1999) Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **47**(9): 1179–1188
- Phister T. G., Mills D. A. (2003) Real-Time PCR Assay for Detection and Enumeration of *Dekkera bruxellensis* in Wine. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(12): 7430-7434.
- Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A. (2006) Handbook of Enology, Vol. 1: The Microbiology of Wine and Vinifications, 2. izd., John Wiley & Sons, Ltd. Str. 1-11.
- Rozpedowska E., Hellborg L., Ishchuk O. P. i sur. (2011) Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nature Communications* **2**: 302.
- Ruzin, S. (1999) NGB WMD-CST Microscope specialty training program: Fluorescence microscopy v3.2. workshop in fluorescence microscopy, Oxford University Press, Portions. Str. 1-22.
- Scheffers W. A. (1966) Stimulation of fermentation in yeasts by acetoin and oxygen. *Nature* **210**: 533-534.

- Schifferdecker A. J., Dashko S., Ishchuk O. P., Piškur J. (2014) The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. *Yeasts* 2014; **31**: 323-332.
- Shimomura O., Johnson F. H., Saiga Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**: 223-29.
- Singer S. J., Nicolson G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**: 720–731.
- Svetec I. K., Štafa A., Zgaga Z. (2007) Genetic side effects accompanying gene targeting in yeast: the influence of short heterologous termini. *Yeast* **24**: 637-652.
- Štafa A., Miklenić M., Žunar B., Lisnić B., Symington L. S., Svetec I. K. (2014) Sgs1 and Exo1 suppress targeted chromosome duplication during ends-in and ends-out gene targeting. *DNA repair* **22**: 12-23.
- Termo Fisher (2006), Applications & Techniques, Propidium Iodide Nucleic Acid Stain, Molecular Probes <<https://tools.thermofisher.com>> Pristupljeno 8. srpnja 2017.
- Thornton R. J., Eschenbruch R. (1976) Homothalism in wine yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **42**: 503-509.
- van der Walt, J. P. (1964) *Dekkera*, a new genus of the Saccharomycetaceae. *Antonie Van Leeuwenhoek* **30**: 273–280.
- Walker G. M. (1998) *Yeasts Physiology & Biotechnology*. John Wiley & Sons, Ltd. Str. 17-28

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Mia Radović