

## Rýchly a citlivý spôsob diferenciácie živých a mŕtvych buniek kvasiniek

JÚLIUS ŠUBÍK

**Súhrn.** Po interakcii kvasiniek s etídiumbromidom a fluoresceíndiacetátom sa v ultrafialovom svetle fluorescenčného mikroskopu mŕtve bunky javia ako červené a živé bunky ako zelené. Spôsob diferenciácie živých a mŕtvych buniek kvasiniek je jednoduchý, citlivý a rýchly. Multiplikačná schopnosť fluoresceínom farbiteľných buniek kvasiniek môže však byť za istých podmienok poškodená.

Vo výskumných laboratóriách i v prevádzkovej praxi pivovarov, liehovarov, droždiarní alebo pekární často treba rýchlo stanoviť počet živých i mŕtvych buniek v populácii kvasiniek. Životaschopnosť kvasinkových buniek možno stanoviť výsevom mikroskopicky stanoveného počtu buniek na živné pôdy alebo časovo úspornejším spôsobom — farbením mŕtvych buniek v mikroskopických preparátoch. V bežnej praxi sa na farbenie používa roztok metylénovej modrej, ktorým sa mŕtve bunky sfarbia na modro a živé ostávajú nesfarbené. Reprodukovateľnosť a citlivosť tejto klasickej metódy však nie je vždy uspokojivá [1].

Na prípravu cytoplazmatických respiračnodeficitných mutantov kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* sa s úspechom využíva špecifický mutagénny účinok etídiumbromidu [2]. Efektívnosť mutagénneho účinku etídiumbromidu závisí okrem iných faktorov aj od jeho intracelulárnej a intramitochondriálnej koncentrácie, ktorá je významne ovplyvnená energetickým stavom bunky [3, 4]. Etídiumbromid preniká do intaktných buniek relatívne pomaly [5], kým do poškodených buniek vstupuje rýchlo, adsorbujúc sa na bielkoviny a nukleové kyseliny bunky [6, 7]. Táto skutočnosť dovoľuje využiť výraznú fluorescenciu etídiumbromidu na diferenciálne farbenie mŕtvych a živých buniek, ktorá je v prípade kvasiniek predmetom tejto práce. Mŕtve bunky kvasiniek sa v ultrafialovom svetle sfarbia etídiumbromidom na červeno, živé bunky sa nefarbia. Pre lepší kontrast možno živé bunky farbiť do zelena fluoresceínom, ktorý je akumulovateľný v živých bunkách cicavcov, baktérií, bĺčikovcov a kvasiniek po intracelulárnej hydrolýze fluoresceíndiacetátu esterázami [8—11].

## Materiál a metódy

Bunky kmeňov kvasiniek uvedených v tabuľke 1 rástli 24 hodín v polosyntetickej alebo syntetickej pôde s glukózou (20 g/l) ako zdrojom uhlíka [12]. Bunky sa usmrtili osemhodinovou inkubáciou pri teplote 105 °C alebo päťminútovou inkubáciou s *N,N*-dimetyl-1-metyldodecylaminoxidom (1 g/l) [13]. Pre fluorescenčné farbenie sa suspenzia premytých buniek kvasiniek (koncentrácie  $1-9 \times 10^7$  buniek/ml) zmiešala v skúmavke alebo priamo na podložnom skielku s rovnakým objemom vodného roztoku (nepufrovaného alebo pufrovaného s  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,3 (20 mmol/l) obsahujúceho etídiumbromid (25 µg/ml) a fluorescendiacetát (4 µ/ml). Zmes oboch fluorescenčných farbív pochádzajúcich zo SERVA (Heidelberg, NSR) sa pripravila vždy pred použitím nariedením z koncentrovaných zásobných roztokov. Po 5–60-minútovej inkubácii pri teplote 20 až 30 °C sa preparát na podložnom skielku prikrytý krycím skielkom pozoroval fluorescenčným mikroskopom Fluoval v ultrafialovom svetle pri zaradených filtroch ortuťovej výbojky 2 × KP490 a B229, resp. okulárovom filtre G249 alebo G247. Životaschopnosť buniek kvasiniek kultivačnou metódou sa stanovila postupom podľa ČSN [14].

Tabuľka 1. Životaschopnosť buniek kvasiniek vyrastených v polosyntetickej pôde stanovená metódou fluorescenčnej mikroskopie a kultivačnou metódou

Kvasinka	Životaschopnosť (počet buniek v 1 ml)	
	fluorescenčná metóda	kultivačná metóda
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DT XII	$4,2 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fett Dä	$8,4 \times 10^6$	$8,1 \times 10^6$
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	$1,5 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	$2,5 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$

## Výsledky a diskusia

Diacylderiváty fluoresceínu sa dajú použiť ako citlivý indikátor aktivity intracelulárnych esteráz. Bezfarebná neutrálna diacetátová zlúčenina difunduje do buniek, kde intracelulárne enzýmy odstránením acetátových skupín uvoľňujú silný chromofór fluoresceín [15]. Vstup neionizovateľného fluoresceíndiacetátu, ako aj retencia uvoľneného, negatívne nabitého fluoresceínu sú u intaktných živočíšnych buniek relatívne nezávislé od pH vonkajšieho prostredia [16]. Fluorescencia intracelulárne vzniknutého fluoresceínu, odrážajúca intaktnosť bunkových membrán, dovoľuje

preto diferencovať živé bunky od mŕtvych [17] a s úspechom sa využila dokonca i pri meraniach intracelulárnych zmien pH v mikroorganizmoch [9], resp. živočíšnych bunkách [16].

Pridanie fluoresceíndiacetátu (1—4  $\mu\text{g/ml}$ ) k suspenzii premytých, čerstvo vyrastených buniek kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* DTXII malo za následok zelenú fluorescenciu viac ako 99 % buniek. Intenzita fluorescencie vzrastala s časom (5—45 min) a teplotou inkubácie (5—35 °C). Výrazná fluorescencia buniek sa pozorovala už po 10-minútovej inkubácii pri 30 °C, čo je teplotné optimum rastu a metabolizmu kvasinkových buniek. Pri inkubačnej teplote 0 °C sa fluorescencia buniek nepozorovala ani po 2 hodinách inkubácie. Bunky inaktivované teplom (5 h, 105 °C) alebo chemicky (5-minútová interakcia s *N,N*, -dimetyl-1-metyldodecylaminoxidom koncentrácie 1 g/l) po inkubácii s fluoresceíndiacetátom nefluoreskovali. Za rovnakých podmienok inkubácie intenzita zelenej fluorescencie buniek toho istého kmeňa kvasiniek vyrastených v syntetických minimálnych pôdach bola relatívne vyššia ako u buniek vyrastených v komplexnejších polosyntetických pôdach, čo pravdepodobne súvisí s odlišným obsahom, resp. aktivitou vnútrobunkových esteráz.

Ako v prípade fluoresceíndiacetátu, inverzný obraz sa pozoroval po inkubácii buniek s etídiumbromidom (10—30  $\mu\text{g/ml}$ ). V čerstvo vyrastenej populácii kvasiniek *S. cerevisiae* DTXII menej ako 1 % buniek fluoreskovalo červeno, kým v tepelne inaktivovanej populácii buniek alebo v populácii buniek permeabilizovaných s amínoxidom [13] všetky bunky fluoreskovali červeno. Intenzita fluorescencie bola nezávislá od teploty inkubácie (5—35 °C) a pozorovala sa hneď po príprave preparátu.

Kombinácia oboch fluorescenčných farbív umožňuje kontrastne označiť a jednoznačne rozlíšiť mŕtve červené od živých, zeleno fluoreskujúcich buniek. Farbiť možno v nepufrovaných i pufrovaných vodných roztokoch, s bunkami premytými alebo, ako sa ukázalo v prípade syntetických pôd, dokonca i nepremýtanými, v skúmavke alebo priamo na podložnom skielku. Ak sa umele pripravená zmes živých a mŕtvych buniek kvasiniek alebo prirodzená populácia kvasiniek inkubovala 5—30 min v roztoku obsahujúcom etídiumbromid a fluoresceíndiacetát, potom koncentrácia mikroskopicky stanovených živých buniek fluorescenčnou metódou bola vo veľmi dobrej korelácii s koncentráciou buniek stanovených kultivačne na živných pôdach (tab. 1).

Pri stanovení životaschopnosti buniek kvasiniek si však treba uvedomiť, že kultivačná metóda sa zakladá na schopnosti buniek deliť sa a vytvárať kolónie, kým mikroskopické metódy odrážajú iba metabolickú aktivitu buniek a integritu ich membrán. Preto za istých podmienok môžu metabolicky aktívne bunky stratiť svoju multiplikačnú schopnosť, inými slovami, živé bunky podľa výsledku fluorescenčného farbenia budú mŕtve podľa výsledku kultivačnej metódy. Takáto situácia nastáva napríklad u respiračne deficitných mutantov kvasiniek *S. cerevisiae* (tab. 2) rastúcich

Tabuľka 2. Strata multiplikačnej schopnosti metabolicky aktívnych buniek respiračnodeficitného mutanta kvasiniek *S. cerevisiae* DT XIIA vyrasteného za podmienok deficiencie v intramitochondriálnom ATP. Bunky rástli 24 hodín v polosyntetickej pôde s glukózou (20 g/l) v neprítomnosti a v prítomnosti inhibítora mitochondriálnej translokácie adenínových nukleotidov

Podmienky rastu	% živých buniek v populácii	
	fluorescenčná metóda	kultivačná metóda
Bez inhibítora	99,3	94,2
Kyselina bongreková (5 µg/ml)	99,5	3,1

v polosyntetickej pôde za podmienok deficiencie v intramitochondriálnom ATP, ktorú možno špecificky vyvolať prítomnosťou kyseliny bongrekovej v kultivačnej pôde [18]. Pravdepodobne rovnako sa budú správať aj bunky auxotrofných mutantov, pokiaľ by sa životaschopnosť stanovovala kultivačne na živných pôdach neobsahujúcich doplnkové živiny.

Fluorescenčný spôsob stanovenia mŕtvych buniek kvasiniek, opísaný pre typický experiment v metodickú časť tejto práce, je však jednoznačný. Naviac je citlivý a najmä rýchly v porovnaní s kultivačnou metódou. V prípade aglutinovaných populácií haploidných kultúr alebo niektorých prevádzkových kmeňov kvasiniek fluorescenčná metóda dovoľuje odstrániť i nepresnosti kultivačného stanovenia životaschopnosti buniek. Tieto nepresnosti vyplývajú tak z nemožnosti stanoviť koncentrácie buniek v zhlukoch, ako aj z nemožnosti určiť, či dané kolónie vznikli z jedinej bunky alebo zo zhluku takýchto buniek. Diferenciácia živých a mŕtvych buniek kvasiniek metódou fluorescenčnej mikroskopie je preto vhodná pre výskumné laboratória i pre prevádzkovú prax, vyžaduje si iba vhodný mikroskop a jedno až dve komerčne dostupné fluorescenčné farbivá.

## Literatúra

1. KOCKOVÁ—KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Kvasinky. Bratislava, SVTL 1957, s. 35.
2. SLONIMSKI, P. P.—PERRODIN, G.—CROFT, J. H.: Biochem. biophys. Res. Commun., 30, 1968, s. 232.
3. PETERAJOVÁ, E.—ŠUBÍK, J.—KOLAROV, J.—VIDOVÁ, M.—KOVÁČ, L.: Abstracts of 3rd Colloquium on Bioenergetics and Mitochondria. Tihany 1973.
4. PEÑA, A.—CHÁVEZ, E.—CARABEZ, A.—GÓMEZ—PUYOU, M. T.: Arch. Biochem. Biophys., 180, 1977, s. 522.
5. EDIDIN, M.: J. Immunol., 104, 1970, s. 1303.
6. GITLER, C.—RUBALCAVA, B.—CASSWEL, A.: Biochim. Biophys. Acta, 193, 1969, s. 479.
7. WARING, M. J.: J. mol. Biol., 13, 1965, s. 269.

8. ROTMAN, B.—PAPERMASTER, B.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 55, 1966, s. 134.
9. THOMAS, J. A.—COLE, R. E.—LANGWORTHY, T. A.: Federation proc., 35, 1976, s. 1455.
10. BURNS, V. W.: Biochem. biophys. Res. Commun., 37, 1969, s. 1008.
11. CERCEK, L.—CERCEK, B.: Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med., 21, 1972, s. 445.
12. ŠUBÍK, J.—TAKÁCSOVÁ, G.: Bull. VÚP, 17, 1978, č. 4, s. 2.
13. TAKÁCSOVÁ, G.—ŠUBÍK, J.: Folia microbiol., 24, 1979, s. 153.
14. ČSN 56 0100. Mikrobiologické vyšetrenie potravín, predmetov bežného užívania a prostredia potravinárskych prevádzok.
15. NAIRN, R. C.: Fluorescent Protein Tracing. Edinburgh—London, Livingstone Ltd. 1964, s. 34.
16. THOMAS, J. A.—BUCHSBAUM, R. N.—ZIMNIAK, A.—RACKER, E.: Biochemistry, 18, 1979, s. 2210.
17. BONNER, W. A.—HULETT, H. R.—SWEET, R. G.—HERZENBERG, L. A.: Rev. Sci. Instrum., 43, 1972, s. 404.
18. ŠUBÍK, J.—DUDÍKOVÁ, E.—GBELSKÁ, Y.—LEŠKOVÁ, Z.—TAKÁCSOVÁ, G.: Závěrečná správa P11-529-264/02, Bratislava 1980.

### **Быстрый и чувствительный способ дифференциации живых и мертвых клеток дрожжей**

#### Резюме

После взаимодействия дрожжей с этидиум бромидом и флуоресцеин диацетатом в ультрафиолетовом свете флюоресцентного микроскопа мертвые клетки выглядят красными, а живые — зелеными. Способ дифференциации живых и мертвых дрожжей является однозначным, чувствительным и быстрым. Однако мультипликационная способность флуоресцеином окрашиваемых дрожжей может быть при определенных условиях нарушена.

### **Quick and sensitive method of differentiation of living and dead yeast cells**

#### Summary

After interaction yeast with ethidium bromide and fluorescein diacetate in the ultraviolet light of fluorescent microscope the dead cells appear as red and the living ones as green. The differentiation method of living and dead yeast cells is unambiguous, sensitive and quick. Multiplicative capacity of yeast cells stainable by fluorescein, however, can be damaged under certain conditions.