

## Biotechnologia Farmaceutyczna - Ćwiczenia

Organizacja pracy: grupa odbywająca ćwiczenie zostaje podzielona na zespoły. Wszystkie zespoły przygotowują wspólny bulion i agar hodowlany; każdy zespół bada żywotność i stan odżywienia biobankowanego materiału, każdy zespół przygotowuje skos agarowy i materiał do głębokiego mrożenia.

### **Ćwiczenie 1 – Przygotowanie podłoża do ożywienia zakonserwowanego szczepu**

Celem ćwiczenia jest przygotowanie drożdży piekarskich (*Saccharomyces cerevisiae*) do wzrostu po krioprezerwacji.

**Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji lub mieszanin chemicznych używanych w poniższym ćwiczeniu.**

**Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.**

Względy bezpieczeństwa: Żaden ze stosowanych odczynników nie został oznaczony jako niebezpieczny dla zdrowia, z wszelkimi odczynnikami należy jednak postępować z ostrożnością, w szczególności nie spożywać, nie dopuszczać do kontaktu ze skórą i oczami.

Materiały:

- zamrożone drożdże w -80°C,
- jednorazowe końcówki do pipet,
- pipety automatyczne,
- rękawice ochronne,
- płyn do dezynfekcji przestrzeni roboczej,
- szalki Petriego,
- probówki typu falcon 50 ml z zakrętką,
- kolby 250 ml, 500 ml,
- pirometr bezdotykowy,
- ezy mikrobiologiczne,
- folia aluminiowa,
- łożnia wodna,
- filtry strzykawkowe.

Odczynniki:

- bulion YPD,
- agar YPD,
- woda destylowana.

### **Przygotowanie medium hodowlanego:**

1. Do kolby 250 ml odważyć 7 g agaru YPD, uzupełnić wodą destylowaną do 100 ml, zakryć folią aluminiową.
2. Do kolby 500 ml odważyć 14 g agaru YPD, uzupełnić wodą destylowaną do 200 ml, zakryć folią aluminiową.
3. Kolby z podłożem hodowlanym wysterylizować w 121°C przez 20 min.
4. Do probówki 50 ml dodać 1 g bulionu YPD, uzupełnić do 20 ml wodą destylowaną, korek zakręcić.

### **Przywrócenie metabolizmu mrożonego szczepu:**

1. Głęboko-mrożony materiał wyjąć z zamrażarki inkubować przez 2 min w łaźni wodnej w temperaturze 30°C.
2. Otworzyć probówkę i kilka razy przepipetować roztwór tipsem. Przenieść do 2 ml probówki Eppendorf.
3. Dodać 1 ml PBS, kilka razy przepipetować, wirować 5 min przy 1500 RCF.
4. Usunąć supernatant, osad zawiesić w 1 ml PBS, wirować 5 min przy 1500 RCF.
5. Usunąć supernatant, osad zawiesić w 1 ml bulionu YPD (z 50 ml falconu z bulionem YPD, przepuszczony przez filtr strzykawkowy 0,2 µm).
6. Probówkę umieścić w cieplarni w 37°C.

### **Posianie mrożonego szczepu:**

1. W warunkach sterylnych wylać agar YPD na szalki Petriego.
2. Po zestaleniu agaru pobrać cząstkę rozmrożonej hodowli i wykonać posiew redukcyjny.

### **Ćwiczenie 2 - Bankowanie *S. cerevisiae* dwoma metodami: mrożenie z glicerolem, posiew na skosach agarowych.**

Celem ćwiczenia jest przygotowanie drożdży piekarskich (*Saccharomyces cerevisiae*) do krioprezerwacji i długoterminowym przechowywaniu w warunkach chłodniczych.

**Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji lub mieszanin chemicznych używanych w poniższym ćwiczeniu.**

**Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.**

Względy bezpieczeństwa: glicerol nie jest toksyczny, należy jednak unikać kontaktu ze skórą; nie wdychać, nie spożywać, nie przecierać oczu, nie dotykać twarzy podczas pracy z odczynnikami. Z karty charakterystyki: po połknięciu podać dużą ilość wody do picia (1-2 szklanki), u osoby przytomnej spowodować wymioty lub zastosować płukanie żołądka, przy poważniejszym zatruciu wezwać lekarza.

Ciekły azot może spowodować oparzenia kriogeniczne lub obrażenia.

Materiały:

- płynna hodowla drożdży piekarniczych (*Saccharomyces cerevisiae*),
- stałe podłoże hodowlane YPD po sterylizacji,
- probówki 15 ml,
- krioprobówki 1.8 ml,
- jednorazowe końcówki do pipet,
- pipety automatyczne,
- rękawice ochronne,
- płyn do dezynfekcji przestrzeni roboczej,
- ezy bakteriologiczne,
- ciekły azot w naczyniu Dewara.

Odczynniki:

- glicerol,
- woda.

#### A) głębokie mrożenie z krioprotektantem

##### **Przygotowanie 30% roztworu glicerolu w 15 ml probówce falcon:**

1. Odpipetować 1,51 ml 99% sterylnej glicerolu i rozcieńczyć w 3,49 ml sterylnej wody
2. Całość zworteksować i zwirować.

##### **Bankowanie *S. cerevisiae*:**

1. Odpipetować 0,5 ml bulionu z drożdżami w fazie logarytmicznego wzrostu do 2 ml krioprobówki.
2. Dodać 0,5 ml 30% roztworu glicerolu, całość wymieszać przez pipetowanie.
3. Probówkę zworteksować.
4. Zanurzyć probówkę w ciekłym azocie, przenieść do zamrażarki niskotemperaturowej; przechowywać w temperaturze -80°C.

#### B) bankowanie *S. cerevisiae* na skosie agarowym

##### **Posiew eż na skos agarowy**

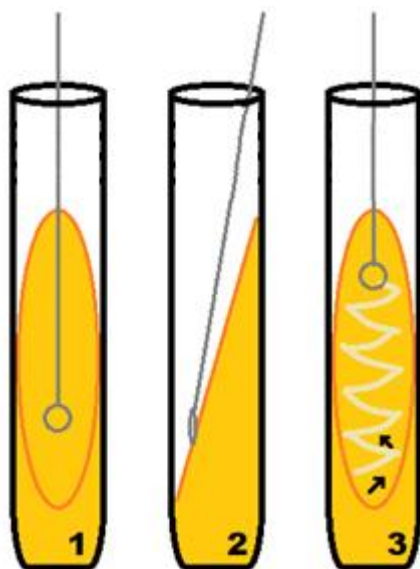
Przygotowanie skosu:

1. Należy przygotować miejsce pracy: dezynfekcja blatu, przygotowanie probówek 15 ml (poluzowanie nakrętek, podpisanie probówki).
2. Zaczekać, aż temperatura podłoża po sterylizacji spadnie do około 40-45°C (blisko zastygnięcia, ale nadal płynne).
3. Wlać podłoże do probówek (ok. 6-8 ml) i zakręcić zakrętki.
4. Zanim agar zakrzepnie probówkę kładzie się pod kątem 20-35° (pochylenie powinno być takie, żeby skos kończył się około 1-2 cm przed zakrętką i zaczynał 2-3 cm od podstawy), agar zastyga tworząc charakterystyczne zbocze; taki kształt zwiększa pole powierzchni oraz umożliwia prowadzenie eży po całej jego długości.
5. Zaczekać, aż podłoże zwiąże.

Hodowle na skosie agarowym stosuje się głównie do przechowywania szczepów.

##### **Wykonanie posiewu:**

1. Wyżarzyć i schłodzić eż (jednorazowej, plastikowej eży się nie wyżarza...).
2. Pobrać eż zawieszinę z płynnej hodowli drożdży i delikatnie rozprowadzić ją po powierzchni skosu agarowego zaczynając od dołu i prowadząc eż zygzakiem ku górze skosu.
3. Po posiewie ponownie wyżarzyć eż.



4. Posianą hodowlę inkubować w temperaturze pokojowej przez 2-3 dni. Drożdże w tym czasie wyrosną w postaci szlaczka, codziennie należy delikatnie poluzować zakrętkę w celu pozbycia się nadmiaru dwutlenku węgla.

5. Przed przeniesieniem skosu do warunków chłodniczych należy ostatni raz upuścić nadmiar CO<sub>2</sub>. Należy zdezynfekować probówkę i przenieść je do lodówki. Skosy najczęściej przechowuje się w pozycji pionowej. Powinny być trzymane w dedykowanym termoizolacyjnym pudełku z wkładami chłodzącymi w celu niwelowania wahań temperatury. Wydłuży ich to czas przydatności.

Po inkubacji opisać efekty posiewu (intensywność wzrostu, kolor, połyskliwość itp.)

### Ćwiczenie 3 - Barwienie błękitem metylenowym

Celem ćwiczenia jest oznaczenie przeżywalności drożdży piekarskich (*Saccharomyces cerevisiae*) po krioprezerwacji i długoterminowym przechowywaniu w warunkach chłodniczych.

**Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji lub mieszanin chemicznych używanych w poniższym ćwiczeniu.**

**Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.**

Względy bezpieczeństwa: Błękit metylenowy działa szkodliwie po połknięciu. Należy postępować z ostrożnością, w szczególności nie spożywać, nie dopuszczać do kontaktu ze skórą i oczami. Dokładnie umyć po kontakcie ze skórą.

Materiały:

- płynna hodowla rozmrożonych drożdży,
- jednorazowe końcówki do pipet,
- pipety automatyczne,
- rękawice ochronne,
- płyn do dezynfekcji przestrzeni roboczej,
- mikroskop z powiększeniem x40,
- szkiełka podstawowe.

Odczynniki:

- błękit metylenowy,
- olejki immersyjne,
- roztwór PBS.

1. Na odtłuszczone szkiełko podstawowe nanieść kroplę płynnej hodowli *S. cerevisiae* (w przypadku hodowli na podłożu stałym drobnoustroje zawieszamy w roztworze PBS).
2. Na szkiełko nanieść kroplę barwnika – błękitu metylenowego.
3. Całość przykryć szkiełkiem nakrywkowym, oglądać pod mikroskopem stosując powiększenie 40-100x.
4. Obliczyć zawartość procentową komórek martwych drożdży: policzyć komórki zabarwione na niebiesko przypadające na 100 komórek drożdży.

#### **Ćwiczenie 4 - Badanie obecności glikogenu**

W czasie wzrostu *S. cerevisiae* gromadzi się w nich glicerol i w niewielkich ilościach ergosterol, trehaloza, a także glikogen, stanowiący substancję zapasową komórek. Glikogen — rezerwowy węglowodan świadczy o dobrym odżywieniu komórek.

Celem ćwiczenia jest oznaczenie stanu odżywienia drożdży piekarskich (*Saccharomyces cerevisiae*).

**Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji lub mieszanin chemicznych używanych w poniższym ćwiczeniu.**

**Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.**

Względny bezpieczeństwa: Płyn Lugola przy długotrwałym lub powtarzalnym narażeniu może powodować uszkodzenie narządów (gruczoł tarczycy). Nie spożywać, nie dopuszczać do kontaktu ze skórą i oczami, nie wdychać oparów.

Materiały:

- płynna hodowla rozmrożonych drożdży,
- skosy hodowlane z lodówki,
- jednorazowe końcówki do pipet,
- pipety automatyczne,
- rękawice ochronne,
- płyn do dezynfekcji przestrzeni roboczej,
- mikroskop z powiększeniem x40,
- szkiełka podstawowe.

Odczynniki:

- płyn Lugola,
- olejki immersyjne,
- roztwór PBS.

Barwienie materiałów zapasowych i struktur komórkowych drożdży:

1. Na odtłuszczone szkiełko podstawowe nanieść kroplę płynnej hodowli *S. cerevisiae* (w przypadku hodowli na podłożu stałym drobnoustroje zawieszamy w roztworze PBS).
2. Na szkiełko nanieść kroplę barwnika – płynu Lugola,
3. Przykryć preparat szkiełkiem nakrywkowym i po 2- 3 min. oglądać pod mikroskopem.

Komórki zawierające glikogen wykazują ciemnobrunatne zabarwienie natomiast jasnożółte zabarwienie komórek świadczy o braku tej substancji zapasowej i tym samym o słabej kondycji badanych mikroorganizmów.