

## Použitie izolátora pri selekcii kvasiniek

JÁN ARPAI, VÁCLAV STUCHLÍK,

Výskumný ústav potravinárskeho priemyslu, Bratislava

663.12/14

V modernom kvasnom priemysle sa skoro výlučne pracuje s čistými kultúrami, t. j. s takými, ktoré obsahujú iba jeden druh mikroorganizmov. Význam čistých kultúr, ktorými sa zabezpečuje požadovaný priebeh kvasenia s možnosťami racionálnych zásahov do biologického procesu, bol už známy v minulom storočí (Hansen 1886, Lindner 1891), avšak aplikácia čistých kultúr naráža ešte až dnes na niektoré technické ťažkosti. Najmä oddeľovanie jednej bunky, t. j. operácia, ktorou je podmienená príprava čistých kultúr, vyžaduje pri použití klasických metód podľa Hansena alebo Lindnera pomerne veľmi mnoho času, a preto sa len ťažko môže použiť pri sériovej práci. Tiež ťaženie, poťažne riadená selekcia kvasných mikroorganizmov, a to predovšetkým kvasiniek, neobíde sa bez pracovnej techniky oddeľovania mikróbných jednotlivcov, ktorú nemožno v praxi bežne použiť (Kosikov 1954).

Z uvedeného vyplýva potreba pomerne jednoduchej izolačnej metódy, ktorou možno spoľahlivým spôsobom v kratšom čase získať väčší počet izolátorov, pri čom potrebné zariadenie nesmie byť nákladné a jeho realizácia v praxi musí byť ľahko prevediteľná. Podľa našich skúseností všetkým uvedeným požiadavkám pri príprave čistých kultúr, resp. pri ich selekcii, vyhovuje izolátor, ktorý navrhovali Nečásek, Palečková a Tesař (1954). V pôvodnej koncepcii bol síce tento izolátor určený na monosporickú izoláciu húb, najmä na sériovú izoláciu spór penicilii a iných producentov antibiotík, avšak ako to už jeho autori naznačili, dá sa skoro rovnakým spôsobom použiť na oddeľovanie kvasinkovitých mikroorganizmov.



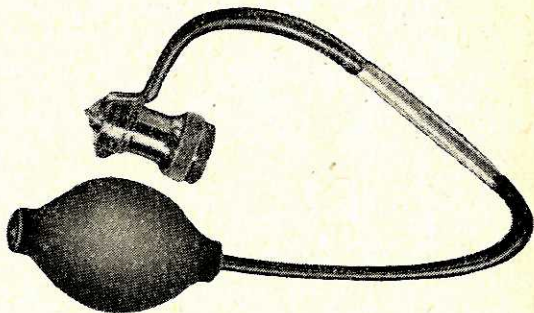
Obr. 1. — Izolátor podľa Nečásk, Palečkovj a Tesařa

Obr. 2. — Izolátor nasunutý na objektív mikroskopu

Prístroj, na ktorom pracujeme už tretí rok, sme získali z Výskumného ústavu antibiotík v Roztokách u Prahy, a to v prevedení, na ktorom jeho autori oproti pôvodne publikovanému prototypu previedli niektoré ďalšie zlepšenia. Presnejšie technické údaje o izolátore sú uvedené v citovanej publikácii. Tuná chceme podať iba informatívny opis prístroja, ktorý predstavuje valcovité teleso nasúvateľné v podobe objímky na objektív mikroskopu (obr. 1 a 2). Zo spodnej časti násadového valčeka, obrátenej k stolu mikroskopu, vyúsťuje trúbka, ktorá sa označuje ako izolačná, keďže slúži k vlastnému oddeľovaniu mikróbných častíc. Izolácia sa prevádza tým spôsobom, že sa nastavova-

cou skrutkou posúva tubus mikroskopu smerom nadol, čím sa koniec trúbky zarezáva do živnej pôdy, na ktorej sa nachádzajú jednotlivé mikróby, poťažne sa touto operáciou vykroji valček tuhej živnej pôdy, na ktorej leží mikroorganizmus, t. j. kvasinka. Na rozdiel od pôvodného prototypu je zdokonalená konštrukcia izolátora opatrená na spodnej časti valčeka prívodnou trubičkou, ktorou možno privádzať do priestoru vo vnútri dutého kužela pod objektív stlačený vzduch, čím sa vyfúkne z izolačnej trubičky valček vyrezaný z agarovej pôdy a obsahujúci izolovanú kvasinku. Valček sa zachytí na podloženej pôde, určenej na kultiváciu čistej kultúry. Vzduch sa vháňa gumovým balónkom a zbavuje sa mikróbných zárodkov pomocou sterilizovaného vatového filtra, zapojeného v podobe medzičlánku na prívodnú gumennú hadičku (obr. 3).

Nami používaný izolátor je zhotovený z nehrdzavejúcej ocele, čo umožňuje sterilizovať ho horúcim vzduchom. Spodný koniec izolačnej trúbky je od frontálnej šošovky objektívu vzdialený približne o pol milimetra menej ako je pracovná vzdialenosť objektívu. Vnútny priemer trúbky bol volený tak, aby jej obvod bol viditeľný v zornom poli okulára a svojimi rozmermi zodpovedá požiadavkám pre prácu na mikroskope Meopta B 36 Bi za použitia objektívu desaťnásobne zväčšujúceho, ktorý s ortoskopickým pätnásobným okulárom dáva pri koeficiente binokulárnej hla-

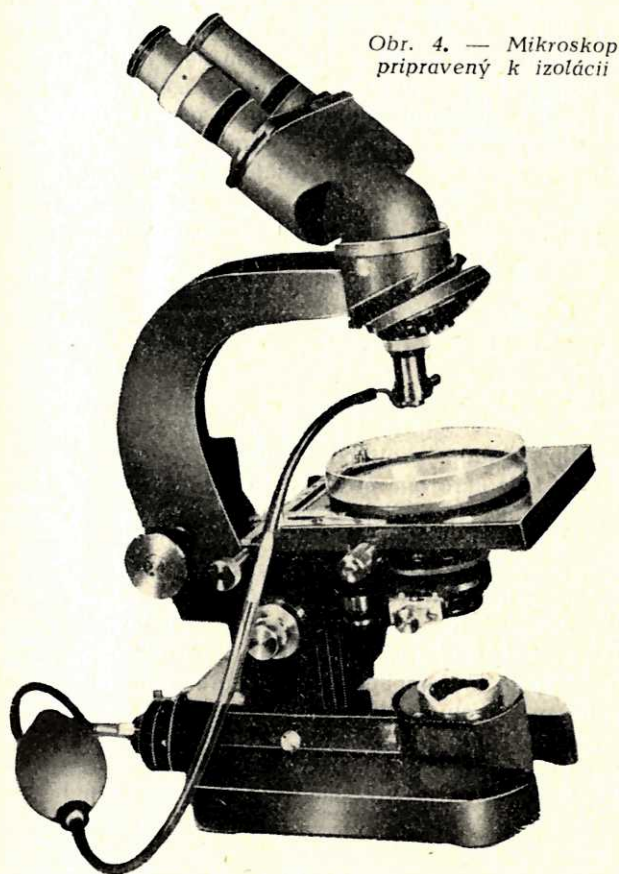


Obr. 3. — Na prívodnú trubičku izolátora je pripojená gumenná hadička, ktorou sa vháňa vzduch z balóna. Vatový filter je zapojený ako medzičlánok

více 1,2 celkové zväčšenie 180násobné. Uvedené zväčšenie pre prácu s kvasinkami úplne vystačuje, ba naopak je vlastne vzhľadom na ich pomerne väčšie rozmery vhodnejšie ako pre spóry, pre ktoré bol izolátor pôvodne určený.

Vlastný pracovný postup pri izolácii kvasiniek vychádza z prípravy dokonale dispergovanej suspenzie kvasiniek. Používame k tomu dôkladnej prepierané kvasinky, ktoré nesmú vykazovať ani najmenšie stopy aglutinácie. Aby sa zlepšila disperzia, odporúča sa pridávať do média povrchové

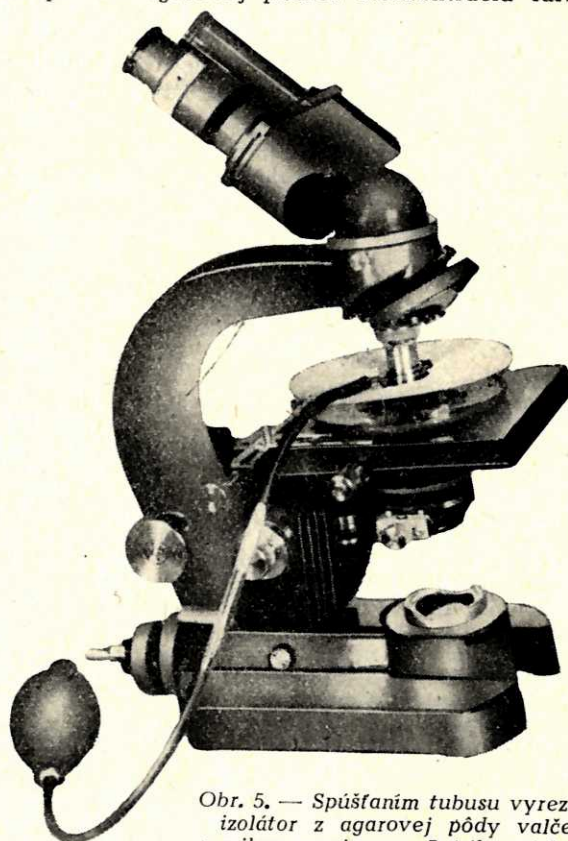




Obr. 4. — Mikroskop  
prípravený k izolácii

Petriho misku s kvasinkami položíme na stolík mikroskopu a spravidla osvetlíme prechádzajúcim svetlom, zaostříme a hľadáme vhodnú kvasinku. Krúživým pohybom misky sa presvedčíme, že v okolí vyhladeného objektu niet iných kvasiniek. Osvedčilo sa nám pritom fixovať, poprípade i kvapkou lepidla, Petriho misku ku krížovému stolku. Okrem selekčných hľadísk morfolologickej povahy je nám pri vyhľadávaní vhodnej kvasinky smerodajnou predovšetkým základná požiadavka životaschopnosti izolátu, čiže chceme oddelovať len živé bunky, aby naša práca nevyšla nazmar a aby metóda nebola nehospodárna. Najistejšie poznávame živé kvasinky podľa toho, že rastú, poľahky že sa rozmnožujú. Ak zachytíme pučiacu kvasinku, môžeme si byť istí o životaschopnosti izolátu. V niektorých prípadoch, avšak i napriek tomu, že sme materiál odobrali v logaritmickú fázu rastu a že živná pôda má vysoký obsah rastových látok, nie je možné dosiahnuť tak intenzívne pučenie kvasiniek počas izolácie, aby sa podľa tohto rozlišovacieho znaku dali vyberať živé bunky. V takomto prípade sme používali metódu vitálneho farbenia. Vychádzali sme pritom z poznatku, že kvasničné bunky, ktoré sa farbja roztokom metylénovej modrej alebo roztokom erytrozinu, treba považovať za mŕtve alebo fyziologicky veľmi oslabené, takže sa ich blana stala pre dané farbivo veľmi priepustnou. Farbenie sme robili tým spôsobom, že sme ku kvasničnej suspenzii pridávali jednu kvapku 0,1% vodného roztoku metylénovej modrej, aspoň 14 dní starej, pred tým, čo sme ju rozliali na povrch agarovej platne. Koncentráciu farbiva

aktívne činidlo, napr. niekoľko kvapiek TWEENU 80, poprípade sa ešte suspenzia prefiltruje cez sterilný hodváb takej pórovitosti, ktorá zodpovedá rozmerom kvasiniek. Takto upravenú suspenziu vhodne riedenú očkujeme na Petriho misku, ktorú plníme veľmi svetlou, poľahky veľmi dobre prievitnou 1,5 až 2 % agarovou pôdou tak, aby výška naliatej platne bola približne 2,5 mm. Dodržiavať správnu výšku vrstvy agarovej pôdy je dôležité najmä preto, že musí zodpovedať dĺžke izolačnej trubičky 2,7 mm, ktorá pri znižovaní tubusu má mať možnosť preniknúť, resp. naraziť na dno Petriho misky a tým vyrezať už opísaný agarový valček s izolátom. Na platňu nanášame 0,5 až 0,7 ml kvasničnej suspenzie, ktorú treba zriediť natoľko, aby sme pri pohľade cez izolačnú trubičku priemeru 1,1 mm videli v zornom poli ojedinelé kvasinky. Pri použití Petriho misky priemeru 10 cm riedili sme obyčajne kvasničné suspenzie na rádove  $10^3$  buniek/ml. Keď sa nanášajú kvasinky na agarovú pôdu, treba dbať na to, aby sa suspenzia veľmi rovnomerne rozložila na povrchu platne. K tomu treba poznamenať, že roztrepanie kvasničnej suspenzie po povrchu platne prudkým krúživým pohybom (podľa našich skúseností) skrýva v sebe nebezpečenstvo, že sa odstredia ťažšie bunky, ktoré sa rozložia pri okraji Petriho misky, odkiaľ sa nedajú vypichnúť izolátorom, najmä však nie v tej úprave, v akej sa teraz všeobecne užíva. Ukázalo sa však, že to môže zmenšiť efektívnosť selekcie, keďže sa v niektorých prípadoch práve medzi ťažšími, resp. rýchlejšie sedimentujúcimi bunkami nachádza selekčne cennejší materiál (Stuchlík 1956).

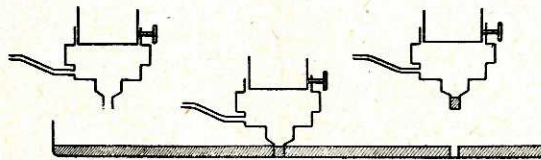


Obr. 5. — Spúšťaním tubusu vyrezáva  
izolátor z agarovej pôdy valček  
s mikroorganizmom. Petriho miska je  
zakrytá kotúčom



sme zvolili tak, aby inokulačná kvasničná suspenzia obsahovala približne 0,01% metylénovej modrej, ktorá je koncentráciou optimálnou na vyfarbenie mŕtvych buniek, najmä ak pH média je pufrované na 4,6.

Pokiaľ sa mikroskopicky vyhľadávali kvasinky na povrchu platne, zamaskovali sme otvorenú Petriho misku doštičkou z plexiskla alebo cellónu vhodne vykrojenou tak, aby izolátor do nej zapadol. Tým sme zmenšili možnosť kontaminácie dopadom mikróbov zo vzduchu, najmä baktérií, ktorých prítomnosť na izolovanom mieste nemožno spozorovať ani so zväčšením.



Obr. 6. — Postup práce s izolátorom

Izolát sa na čistú kultivačnú pôdu prenáša, ako sme už spomenuli, vyfúknutím agarového valčeka s izolačnej trubičky. K tomu položíme novú Petriho misku s kultivačnou pôdou pod izolačný násadec a vyfukujeme agarový valček s izolátom tak, aby sa buď umiestnil jeden izolát uprostred platne, alebo ich rozmiestnime niekoľko, t. j. 3 až 4 na jednu platňu. Rozložiť viacero izolátov na jednu Petriho misku je síce hospodárne, skrýva však nebezpečenstvo vzájomnej kontaminácie. Pri našich selekčných prácach sa nám dobre osvedčilo, keď sme malé štvorčky (2,5×2,5 cm) sterilného filtračného papiera rozložili po povrchu platne, poľažne na agarové podložky rovnakých rozmerov, a na tieto sme potom umiestili jednotlivé izoláty. O správne prevedenej izolácii a umiestnení sa presvedčame mikroskopickou prehliadkou, k čomu používame obyčajne druhý objektív zväčšujúci 20násobne. Až

po takto prevedenej kontrole sme agarové valčeky s kvasinkou položili na bok, čím sa umožní lepší vývoj kolónie. Papierové štvorčky sme očíslovali. Tým sme dosiahli nielen dobrý prehľad o rozmiestnení jednotlivých izolátov, ale sme si aj uľahčili prípadné prenášanie izolátov na diagnostické pôdy.

Izolátor sterilizujeme počas práce medzi jednotlivými operáciami ponorením do alkoholu a opatrným opalovaním. Pri použití popísaného izolátora sú možné i ďalšie modifikácie a zlepšenia pracovnej techniky, ktoré vyplývajú z povahy tej ktorej selekčnej práce. Tak napr. pri zakladaní obrovských kolónií z jednej bunky, ktoré používame pri sledovaní mutantov, vyfukovali sme izoláty priamo do Erlenmayerových baniek, pri čom sme objektív s izolátorom pretočili na bok, držiak nad ústím banky horiaci kahan, aby sme ohňovou clonou zabránili kontaminácii. Vypracovali sme si tiež metódu ako izolovať mikróbné bunky z membránových ultrafiltrov, rozličné kombinácie použitia násadného izolátora so sedimentačným oddeľovaním (Arpai 1957), ako i ďalšie drobné úpravy, o ktorých záujemcom z radov pracovníkov kvasného priemyslu radi poskytneme informácie.

Predloženým príspevkom chceme upozorniť pracovníkov z praxe na výhody použitia násadného izolátora, ktorý, ako sme sa dozvedeli, bude sa sériovo vyrábať v n. p. Meopta, Praha-Košíře.

#### Literatúra

- [1] ARPAI J.: Frakciovanie spór pri selekcii producentov itakónovej kyseliny. Biologické práce (SAV), zväzok III., Bratislava 1957.
- [2] HANSEN CHR. E.: Méthodes pour obtenir des cultures pures de *Saccharomyces* et de microorganismes analogues. *Compt. rend. trav. labor. Carlsb.*, T II., 1886.
- [3] KOSÍKOV V. K.: Genetika droždiej i metódy selekcie droždievych kultúr, Moskva, 1954.
- [4] LINDNER P.: Mikroskopische Betriebskontrollen in den Gärungsgewerben, Berlin 1891.
- [5] NEČÁSEK J., PALEČKOVÁ FR., TESAŘ A.: Monosporická izolace hub. *Perslia* 26 (1954) 105.
- [6] STUHLÍK V.: Selektčné metódy uplatnené pri výbere a vedení násadného droždia v trencianskej droždiarni. *Kvasný průmysl*, 2. (1956) 79.