

Úschova kvasiniek pri ultranízkej teplote

663.12:664.864 582.282.232

RNDR. ANNA KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, DrSc., Chemický ústav SAV, Bratislava

Klíčová slova: *kvasinky, úschova, ultranízka teplota*

Úschovou kultúr kvasiniek rozumieme predĺženie životaschopnosti kultúr tak, aby ich nebolo potrebné často preočkovávať. Častým preočkovávaním nastáva nebezpečenstvo, že sa začas obdrží kultúra o iných vlastnosťach, ako mala pôvodná, a to prispôsobením k prostrediu, selekciami a pod. Tieto momenty majú nemalú úlohu pri údržbe zbierok typových kultúr, priemyslových producentov, vedeckých modelov, mutantov a ď.

Pre úschovu mikroorganizmov bol už navrhnutý celý rad úschovných metód, ktoré možno rozdeliť v podstate do troch skupín:

1. Metódy, ktorými sa spomaluje metabolizmus
2. Metódy rýchleho vysúšania kultúr
3. Metódy úschovy pri veľmi nízkej teplote.

Do každej skupiny prislúcha mnoho rôznych metód úschovy. Z prvej skupiny je najznámejšie a najpoužívanejšie zalievanie kultúr parafínovým olejom, z druhej skupiny vysúšanie kultúr za nízkej teploty vo vakuu, tzv. lyofilizácia, a z tretej skupiny úschova pri ultranízkych teplotách. Ak stojíme pred voľbou metódy na úschovu kultúr, musíme vychádzať zo poznatkov o jej výhodách a nevýhodách pre daný organizmus. Treba si však uvedomiť skutočnosť, že neexistuje jedna určitá metóda úschovy, ktorá by bola vhodná pre všetky mikroorganizmy. Okrem toho mnoho metód nebolo doteraz vyskúšaných na širokom spektre mikroorganizmov.

Zmienim sa tu o niektorých našich skúsenostach o úschove kultúr pri veľmi nízkej teplote. Na dosiahnutie veľmi nízkych teplôt sa používa skvapalnený plyn: vzduch, metan, kyslík, oxid uhličitý, dusík, argon, heliwm, zemný plyn a p. Kvapalným dusíkom (KN) sa dosahuje až $-196,8^{\circ}\text{C}$ (v kontajneroch býva teplota nižšia, nie sú tesne uzavreté a dochádza k odparovaniu), kvapalným helium až -200°C . Pod -5°C sa všetky elementárne procesy zastavia. Tkanivo sa môže neopráviteľne poškodiť a letálny účinok kryštálov ľadu v tkanive je zvlášť nebezpečný. Zistilo sa však, že ak sa mikroorganizmy ponoria do glycerolu, môžu sa pomaly ochladať aj roztápať, pri čom škodlivý účinok nízkej teploty je opraviteľný. Mikroorganizmy tak môžu tieto zmeny teplôt prežiť. Nízke teploty sa používajú v biológii aj za iným cieľom, ako je úschova mikroorganizmov a celý tento biotechnologický proces tvorí vedné odvetvie nazývané kryobiológia. Tak napr. ultranízke teploty nachádzajú použitie v chirurgii, pri transplantáciach tkanív, pri úschove tkanív kože, očnej rohovky, pri inseminačných postupoch atď.

Nízka teplota, ktorá sa docielí KN, je vhodná pre údržbu širokého spektra buniek, ako sú baktérie, kvasinky a iné huby, ale aj pre tkanivové kultúry a vírusy. Nie je to metóda nová. Už r. 1938 Goetz a Goetz [1] podávajú správu o tom, že *Saccharomyces cerevisiae* uschovaná pri teplote -160°C prežila na 85 %. Podrobnejší prehľad literatúry podáva jedna z našich prác [2]. Táto metóda je oproti iným úschovným postupom nákladnejšia, hlavne ak sa má použiť automatické postupné znižovanie teploty a dopĺňovanie chladiva. Na úschovu väčšej zberky je potrebný väčší počet kontajnerov. Pred rozosielaním uschovanych kultúr na iné pracoviská je potrebná rekultivácia (lyofilizát sa môže za-

Tab. 1. Porovnanie prežitia niektorých druhov kvasiniek úschovou v kvapalnom dusíku (KN) a lyofilizáciou (Lyo)

| Druh kvasinky | KN (%) | Lyo (%) |
|-------------------------------------|--------|---------|
| <i>Cryptococcus albidus</i> | 77,3 | 2,4 |
| <i>Candida albicans</i> | 97,0 | 10,6 |
| <i>Hansenula anomala</i> | 62,3 | 7,3 |
| <i>Rhodosporidium toruloides</i> | 97,9 | 10,1 |
| <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> | 73,1 | 8,1 |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | 82,9 | 27,3 |
| <i>Torulopsis sp.</i> | 75,8 | 16,2 |

slaf priamo tak, ako je). Metóda úschovy pri ultranízkej teplote má však obrovskú prednosť pred inými úschovnými metódami v tom, že prežíva veľké percento buniek, priemerne 62 %, u niektorých druhov až 95 % (u lyofilizátov je to priemerne 13 %), čím sa selekcia minimálne obmedzí (tab. 1).

Kultúry sa pripravujú podobne ako pre lyofilizáciu, z šikmeho agaru po 3—4 dňoch inkubácie pri optimálnej teplote. Do úschovného prostredia sa pridáva látka na ochranu proti nepriaznivému vplyvu nízkej teploty, tzv. kryoprezervans. Najčastejšie to býva 10 % dimetylulfuksidu (DMSO). Hustota buniek v suspenzii sa odporúča $10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$. Plní sa do ampuliek po 0,5 ml. S výhodou sa používajú ampule z plastickej hmoty, ktoré odporúčajú Bárdoš a Hubálek [3]. Je s nimi práca bezpečnejšia a manipulácia jednoduchšia. Naplnené ampulky sa ukladajú do kontajnerov, čo sú veľké Dewarove nádoby s obsahom 32 l, vyrábané u nás družtvom v Říčanech u Prahy. Nádoby sú vybavené kanystrami, do ktorých sa ukladajú ampulky. Veľmi často je potrebné tieto kanystry prispôsobiť tak, aby sa určité ampulky mohli hocikeď vybrať. Ampulky sa zatajúvajú teplom. Pred rekultiváciou sa vnášajú do vody 37°C teplej, aby sa ich obsah roztopil. Rekultivačné prostredie má mať to isté zloženie, ako malo prostredie, z ktorého sa kultúra odoberala k úschove. Môžu sa používať aj sklenené ampulky, v ktorých sa vystavuje kultúra na šikmom agare; tieto ampulky sa ukladajú do kontajnerov bez zatavenia len s vatovým uzáverom do priestoru nad KN, kde je teplota asi -150°C . Je to najjednoduchší spôsob úschovy pri ultranízkej teplote.

Pri úschove v ultranízkych teplotách sa používajú ochranné látky, kryoprezervans. Tieto ochranné prostriedky sa môžu rozdeliť do dvoch skupín:

1. Prostriedky, ktoré neprenikajú do buniek, ako je sacharóza, škrob, agar, peptón, mliečne alebo sérové bielkoviny a p.
2. Prostriedky prenikajúce do buniek, ako je glycerol, toluén-etenolová zmes, DMSO, benzén a ď.

Skúsenosti ukázali, že bunky sú schopné lepšie prežívať a ľahšie opravovať poškodenia vzniklé zmrzováním a roztápaním, čím majú vláknejšie (redšie) membrány a naopak bunky s membránami rigidnejšími

(tuhšími) zvyšujú úmrtnosť buniek pri zmenách teploty. Preto sa odporúča brať k zmrzovaniu bunky mladšie z exponenciálnej fázy rastu. Tie kultúry, ktoré majú dlhú lag-fázu, majú spravidla aj menšiu schopnosť prežívať. Vláčnosť bunkových membrán sa môže zvýšiť rôznym spôsobom. Jeden z takých spôsobov je použitie lipofilných perturbérov, látok, ktoré narúšajú organizovanosť textúry bunkových membrán, napr. aromatický uhlovodík adamantín alebo butylovaný hydroxytoluén. Zasahujujú v lipidových oblastiach membrán, kde dezorganizujú uhlovodíkové refazce a vyvolávajú tak vyšší stupeň neusporiadanosť vo vnútri membrán (perturbáciu). Najčastejšie sa študoval účinok DMSO, ktorý permeabilizuje bunkové membrány zrejme tak, že extrahuje steroly. O steroloch je známe, že zvyšujú rigiditu bunkových membrán. DMSO snadno preniká do buniek. Všetky podobné činidlá sa dnes používajú k tzv. dekryptifikácii vnútrobunkových enzýmov, ako je napr. α -glukozidáza.

Miera prežívania kultúry je prvoradý test na hodnotenie účinku úschovy. Môžu sa použiť rôzne metódy:

Roztopenú kultúru vysejeme na povrch živného agaru toho istého zloženia, ako mala kultúra tesne pred úschovou. Aby sa úschova mohla hodnotiť kvantitatívne, je potrebné stanoviť aj na začiatku množstvo životaschopných buniek; vtedy sa dá prežívanie vyhodnotiť percentuálne. Je skúsenosť, že po krátkej dobe úschovy, napr. po roztočení po niekoľkých dňoch, prežíva nižší počet buniek ako po úschove dlhotrvajúcej, čo sa vysvetluje tým, že poškodenie vzniklé stresom z ultranízkej teploty, sa neskoršie opravuje. Aby sa predišlo opakovanému riedeniu, môže sa použiť kalibrovaná očkovacia slučka. Kalibrácia sa prevedie výpočtom z rozdielu hmotnosti 1 ml kvapaliny a po odobratí známeho počtu slúčiek. Treba ešte pripomienúť, že sa neodporúča porovnávať počet vyrastených kolónii na agare s počtom buniek zrátaných v komôrke. Niektoré bunky môžu byť fyziologicky veľmi oslábené, čo sa v komôrke nedá zištiť.

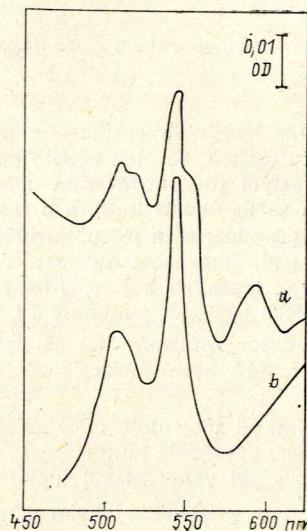
Životaschopnosť kultúry sa môže posudzovať aj v kvapalnom prostredí podľa rýchlosťi, s akou bunky pučia a podľa počtu pučiacich buniek.

Index prežívania môžno stanoviť podľa uvoľňovania značených látok z buniek. Najčastejšie sa k tomu používa ^{51}Cr -chromát sodný ($1,85 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$), ktorý sa pridáva do kultivačného prostredia a v priebehu 2 h sa viaže na bunkové proteíny; viaže sa nešpecificky, ale pevně. Z poškodených buniek letálnym aj opraviteľným stresom sa tento chromát sodný uvoľňuje takisto nešpecifickým spôsobom, čo závisí od stupňa denaturácie bielkoviny. Môžu sa použiť aj iné značené látky, hlavne sa používajú prekurzory zložiek bunkových membrán (fukóza, ergosterol, kyselina palmitová a p.) alebo cytoplazmy (uridín, prolín a p.), vnútrobunkovej zásoby a štrukturálnych proteínov. Takéto metódy umožnia sledovať priebeh celého procesu.

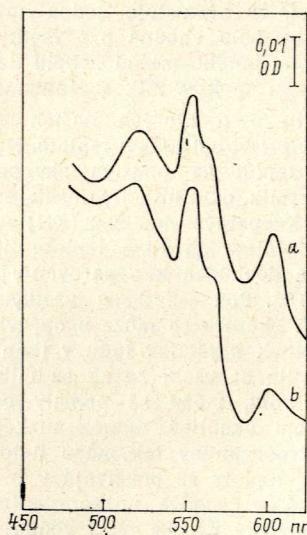
Miera prežívania kultúr je veľmi dôležitá už aj preto, lebo čím viac buniek prežíva, tým je menšie nebezpečenstvo selekcie rôznych odchyliek od pôvodného fenotypu. Pretože sa dnes bunka chápe ako systém membrán, zásahy do membránového systému môžu vyvolať poruchy v oxidatívnom metabolisme organizmu a tak selekciu mutantov auxotrófnych alebo s poruchami v procese dýchania (respiračná deficiencia).

Testovanie respiračne deficíentných mutanov sa dá overiť pomerne jednoducho s použitím metódy TTC testu [4]. Červené kolónie sú respiračne suficitné a biele respiračne deficitné. Pomerne jednoduché je stanovenie cytochrómov v prípade, že je k dispozícii regiszračný spektrofotometer na stanovenie cytochrómov v biomase kvasiniek. Tak sa môžu zistieť mutanty, ktorým chýba niektorý z cytochrómov. Overujú sa vrcholy a ramená v α - (540–610 nm) a β - (500–540 nm) oblasti. V α -ob-

lasti sú význačné tri skupiny: skupina cytochrómú c (549–550 nm, c₁ pri 554 nm), skupina b (b₂ pri 557 nm, b pri 562–566 nm) a skupina a (a, a₃ 602–605 nm), obr. 1–3.



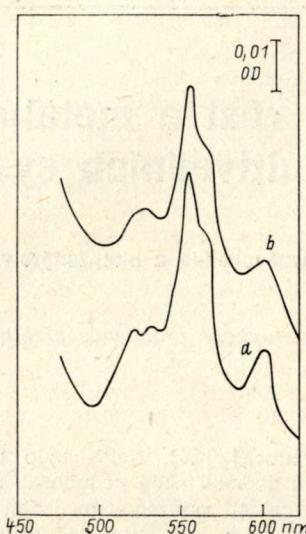
Obr. 1. Cytochromové spektrum celých buniek *Saccharomyces cerevisiae*:
 a — respiračne suficitný kmeň
 b — respiračne deficitný kmeň



Obr. 2. Cytochromové spektrum *Candida utilis* CCY
 29-38-18
 a - po piatich rokoch úschovy v KN
 b - kultúra udržiavaná pod parafinovým olejom

Pracnejšie sú metódy, ktoré majú preverif auxotrófiu, teda výživové mutanty. Môže to byť neschopnosť syntetizovať niektorú aminokyselinu, náročnosť na prítomnosť niektorého vitamínu v prostredí alebo celý rad ďalších výživových nedostatkov. Tieto výživové testy sa prevádzajú tak, že sa od plnlohodnotného prostredia postupuje s vynechávaním jednotlivých zložiek a zostrojujú sa vitaminogramy, aminokyselinogramy a p. [4]. Môže sa použiť aj disková metóda s kombinačným postupom.

Všetky tieto metódy sú pracné a vyžadujú skúsenosti. Možno ich použiť pre vedecké overovania, no nie pre bežnú kontrolu.



Obr. 3. Cytochrómové spektrum *Saccharomyces oviformis* CCY 21-21-24

a — po piatich rokoch úschovy v KN
b — kultúra udržiavaná pod parafínovým olejom

Tab. 2. Príklad stupňa prežitia niektorých kvasinek v KN po piatich rokoch úschovy v porovnaní s pôvodným počtom buniek (Hubálek a Kocková-Kratochvílová, 1982)

| Kmeň CCY | Meno | % prežitia |
|----------|-------------------------------------|------------|
| 29-3-32 | <i>Candida albicans</i> | 69,4 |
| 29-26-4 | <i>C. lipolytica</i> | 66,4 |
| 29-38-18 | <i>C. utilis</i> | 47,7 |
| 17-3-1 | <i>Cryptococcus laurentii</i> | 88,4 |
| 41-15-2 | <i>Debaryomyces formicarius</i> | 45,2 |
| 18-1-1 | <i>Dioszegia hungarica</i> | 89,3 |
| 24-1-1 | <i>Eremothecium ashbyi</i> | 23,6 |
| 38-1-1 | <i>Hansenula anomala</i> | 72,6 |
| 64-1-1 | <i>Leucosporidium scottii</i> | 44,7 |
| 33-1-1 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 4,7 |
| 36-2-1 | <i>Nadsonia fulvescens</i> | 41,2 |
| 62-2-4 | <i>Rhodosporidium toruloides</i> | 90,7 |
| 48-87 | <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> | 66,6 |
| 21-4-13 | <i>S. cerevisiae</i> | 95,5 |
| 21-21-16 | <i>S. oviformis</i> | 97,4 |
| 21-21-24 | <i>S. oviformis</i> | 48,8 |
| 44-1-3 | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | 85,4 |
| 44-1-9 | <i>S. pombe /mutant/</i> | 20,2 |
| 26-26-5 | <i>Torulopsis schatzavii</i> | 87,9 |

Z ostatných metód možno spomenúť ešte testy znášania vyšších koncentrácií cukrov, fruktózy, sacharózy, glukózy alebo solí, napr. NaCl. Veľmi dôležité je overovanie špecifických vlastností, ktorými vynikajú kmene právne chránené, produkčné, geneticky zvláštne a p. [5].

Kvasinky neprežívajú rovnako dobre v rôznych úschovných prostrediah. Vyskúšali sme prostredie M1 (sladina bez DMSO) a M2 (sladový extrakt, kvasničný extrakt, peptón, tečacie sérum a DMSO). Rozdiely v prežívaní

boli veľké. Po 75 dňoch prežila *Candida lipolytica* v M1 0,4 % a v M2 až 57 %. *Nadsonia fulvescens* prežila v M1 len 17 % a v M2 88 %. *Saccharomyces cerevisiae* prežila 0,4 % v M1 a 95 % v M2 [2].

Aj jednotlivé kmene prežívajú na rovnakom prostredí rôzne. Tak na M2 po 75 dňoch prežili nad 90 %: *Candida albicans*, *Dioszegia hungarica*, *Rhodosporidium toruloides* a aj α -párovací typ, *Saccharomyces cerevisiae* a *S. oviformis*. Najslabšie prežívali hýfové huby, ako *Eremothecium ashbyi* [6]. Tu však treba priznať, že podľa počtu vyrastených kolónií sa u neho ako nepučiaceho organizmu prežívanie nedá spoľahlivo hodnotiť. Stredný stupeň prežívania majú do 50 % kožkotvorné druhy a niektoré kandidy. Zdá sa, že sa dokáže závislosť medzi množstvom produkovaných extracelulárnych polysacharidov a v kvalite ich ochranného účinku proti teplotným stresom so stupňom prežívania. Zdá sa aj, že pigmenty, ako karotenoidy a melaníny, majú ochranný účinok (tab. 2).

V našich ďalších štúdiach sa zameriame na význam prirodzených polysacharidov pre ochranný účinok proti teplotným stresom.

Literatúra

- [1] GOETZ, A., GOETZ, S.: Biodynamica, **2**, 1938, s. 1—8
- [2] HUBÁLEK, Z., KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Antonie van Leeuwenhoek, **44**, 1978, s. 229—241
- [3] BÁRDOŠ, V., HUBÁLEK, Z.: Českosl. Epidem. Mikrobiol. Immunol. **25**, 1976, s. 348—354
- [4] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A., TOMÁŠEK, K., ONDŘIŠEKOVÁ, M.: Biologická kontrola výroby piva a nealkoholických nápojov. ALFA/SNTL, Bratislava, Praha, 1980
- [5] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A., HUBÁLEK, Z.: Antonie van Leeuwenhoek **49**, v tlači, 1984
- [6] HUBÁLEK, Z., KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Folia Microbiol. **27**, 1982, s. 242—244

Kocková-Kratochvílová, A.: Úschova kvasinek pri ultranízkej teplote. Kvas. prům. **30**, 1984, č. 2, s. 35—37.

Autorka popisuje zkušenosť s úschovou kvasinek při velmi nízké teplotě, realizované kapalným dusíkem, ktorým se dosahuje teplota až $-196,8^{\circ}\text{C}$. Metoda je proti jiným úschovným postupům nákladnejší, má však proti nim obrovskou přednost v tom, že přežívá průměrně 62 někdy až 95 % buněk.

Коцкова-Кратохвилова, А.: Хранение дрожжевых грибков при ультранизкой температуре. Квас. прум. **30**, 1984, № 2, стр. 35—37.

Автор описывает опыт по хранению дрожжевых грибков при весьма низкой температуре, реализованной жидким азотом, при помощи которого достигается температура до $-196,8^{\circ}\text{C}$. По сравнению с другими этот метод хранения более дорог, однако его преимуществом является сохранение в среднем 62—95 % клеток дрожжей.

Kocková-Kratochvílová, A.: A Maintaining of Yeast at Very Low Temperatures. Kvas. prům. **30**, No. 2 p. 35—37.

The article describes experiences with a maintaining of yeast at very low temperatures using liquid nitrogen. This procedure permits to achieve the temperature of $-196,8^{\circ}\text{C}$. Comparing with other methods, this procedure is more expensive but its great advantage is in the relatively high viability of cells (62—95 %).

Kocková-Kratochvílová, A.: Aufbewahrung der Hefen bei ultraniedriger Temperatur. Kvas. prům. **30**, 1984, Nr. 2, S. 35—37.

Die Autorin beschreibt die Erfahrungen mit der Hefenaufbewahrung bei sehr niedrigen Temperaturen, die

durch flüssigen Stickstoff realisiert wurden, wobei Temperaturen bis zu $-196,8^{\circ}\text{C}$ erzielt werden können. Im Vergleich mit anderen Aufbewahrungsverfahren ist die

beschriebene Methode kostspieliger; ihr grosser Vorteil liegt jedoch darin, daß im Durchschnitt 62 bis 95 % Zellen überleben.