

Jan Nečásek, Františka Palečková a Antonín Tesař:

Monosporická izolace hub

(Výzkumný ústav antibiotik, Roztoky u Prahy.)

Dokonalá metoda monosporické izolace má vyhovovat několika obecným požadavkům. V prvé řadě musí být co nejméně komplikovaná, aby dovolovala pořízení i rozsáhlejších serií isolátů v krátkém časovém úseku. Dostatečně velký počet stejně starých isolátů je často podmínkou zdaru prováděného pokusu. Kromě toho jednoduchou metodou jest možno svěřiti k provádění laboratornímu pracovníku již po krátké době zapracování. Dalším předpokladem úspěšné použitelnosti jsou nízké náklady, spojené s obstaráním příslušného zařízení, protože jen takový postup je únosný pro většinu interesentů. Přitom však musí být hlavním a stálým požadavkem záruka spolehlivosti jak po stránce monosporické izolace samé, tak aseptičnosti pracovního postupu. Metoda musí zaručovat, že byla izolována skutečně pouze jediná spora, a že získaný monosporický isolát nebude ztracen vlivem znesterilnění, ke kterému došlo během práce. Posledním požadavkem jest pak snaha, aby metoda byla použitelná pro co nejširší výběr druhů.

Metody pro monosporickou izolaci lze rozdělit (Hildebrand 1938, 1950) do tří skupin, t. j. na metody zředovací, metody mikromanipulační a konečně ty metody, které k přenesení vybrané spory používají jiné cesty, než jakou představuje použití mikromanipulátoru. Při jednoduchém postupu zředovacím chybí záruka toho, že narostlé kolonie pocházejí skutečně z jediné spory, neboť se lze snadno přesvědčiti, že ve většině případů jsou v suspensích spory zhusta spojeny ve dvou- až mnohočetných shlucích, které dávají vzniknout koloniím makroskopicky totožným s koloniemi, vyrostlými z jednotlivých spor. Tato nesnáze je prakticky stejná při nátěru spor na plotnu klíčkou. Metody, užívané obvykle pro zakládání jednobuněčných kultur kvasinek (Lindnerova nebo Hansenova) dávají sice záruku monosporického původu isolátu, jsou však značně pracné a nevhodné pro seriovou práci. Použití mikromanipulátoru skýtá sice bezpečnou záruku toho, že založená kultura je skutečně monosporická, přitom však jsou metody této skupiny vesměs časově značně nákladné a vyžadují speciálního návěku jak pro provádění izolace samé, tak pro přípravu příslušných mikronástrojů. Kromě toho mikromanipulátor není dostupný každému pracovníku, který potřebuje zakládat monosporické kultury.

Třetí skupina postupů je tvořena těmi metodami, které se zpravidla snaží spojit jednoduchost metody zředovací se spolehlivostí metod mikromanipulačních. Typickým příkladem takové techniky jest metoda Keittova (1915), která byla jen málo pozměněna Ezekelem (1930) a Sasseem (1929). V Keittově metodě jsou spory naočkovány na povrch agarové půdy na Petriho misce, na obrácené misce jest pak vhodná spora vyhledána pomocí mikroskopu za použití slabého objektivu, umístění vybrané izolované spory dostatečně vzdálené od ostatních je poznamenáno na skle misky inkoustem a poté je příslušná část agaru se sporou ručně vykrojena pomocí očkovací jehly, zakončené šikmo připojeným dutým válečkem, upraveným ze zploštělého konce jehly. Po kontrole vykrojené části agaru se tato část živného media přenesla na novou živnou půdu lancetou. Další modifikací této metody (La Rue 1930) bylo vypuštění označování a usnadnění vykrajování agarového válečku se sporou tím, že se tak děje kuželovitým násadecem našroubovaným na revolver mikroskopu vedle objektivu, kterým se provádí vyhledávání vhodné spory. Přitom však vyjímání části agaru z plotny nutno jako při původním postupu provádět ručně. Výhody metody Keittovy a modifikace La Rueho spojuje další úprava (Lambert 1938), kde vykrajování i vyjímání části agaru se sporou z plotny se děje pomocí kovového dutého válečku, připojeného kovovou tyčinkou k objektivu s dostatečně velkou pracovní vzdáleností,

kterým jest vyhledávána vhodná spora k izolaci. Nevýhodou této techniky jest poměrně značná labilita centrování izolátoru, má-li být dosaženo sousostí izolátoru s objektivem. Má-li být upuštěno od požadavku sousostí, jest nutno používatí velmi slabých objektivů se širokým zorným polem. V poslední úpravě Keittovy metody (G e o r g 1947) jest vykrajování agarových válečků prováděno kuželi, zhotovenými ve vhodné velikosti ze skleněné trubky a přitmelených k objektivu plastelinou. Vykrojená část agaru se z kužele odstraní po jeho sejmutí z objektivu. Popis techniky M e L e a n a (1939) nám dosud není dostupný.

Při všech přednostech těchto technik nelze je však označit za vyhovující. Ve větší nebo menší míře se tu shledáváme buď s nepřilíš zaručenou spolehlivostí anebo s poměrně značnou pracností a komplikovaností.

Při naší práci, kdy jsme byli nuceni zakládati rozsáhlejší serie monosporických isolátů Penicillii, jsme se pokusili upravit dosavadní modifikace této skupiny method tak, aby výsledná metoda odstranila pokud možno zbývající nevýhody, t. j. aby dávala co nejdokonalejší záruku monosporického původu kultur, a aby časové náklady spojené s jejich přípravou byly podstatně nižší než u postupů dosavadních.



Obr. 1. Kuželový násadec pro monosporickou izolaci. (Foto F. A. Lokvenec.)

Popis izolátoru.

Námi zkonstruovaný izolátor (obr. 1) je zhotoven z nerezavějící ocele. Má tvar dutého kužele, který lze válečkovitým zakončením nasunout na objektiv mikroskopu a připevnit šroubkem. Spodní konec kužele vyběhá v trubku, která při izolaci vyřezává váleček tuhé živné půdy se sporou. Spodní konec trubky je od frontální čočky objektivu vzdálen o cca 0,5 mm méně, než kolik činí pracovní vzdálenost objektivu. Vnitřní průměr trubky je volen tak, aby její obvod byl viditelný v zorném poli okuláru. Kuželovitá část izolátoru je profíznuta, takže vznikají proti sobě dva vejčité otvory, které umožňují přenesení vyříznuté části agaru. Vzhledem k tomu, že jsme izolátor určili výhradně pro izolaci mikroskopem MEOPTA B 36 Bi a objektivem MEOPTA č. 3, zvětšujícím 10× (okulár orthoskopický 15×), je vnější průměr izolátoru 22 mm a jeho celková výška 19,7 mm, při čemž trubka jest dlouhá 2,7 mm při vnitřním průměru 1,1 mm. Její vnější

průměr činí 1,7 mm. Vnitřní průměr válečkové části izolátoru jest 16,7 mm a její výška měřena uvnitř 9,0 mm, takže je možno izolátor nasunout na objektiv až ke šroubu, kterým lze z objektivu vyjmout jeho optický systém. Jako další pomocné nástroje potřebujeme k izolaci sondu z ocelového drátu k vysunutí agarového válečku z trubky. Konec sondy jest proto v délce asi 5 mm zahnut v pravém úhlu. K přenášení válečku používáme kovové lancety vhodného tvaru.

Pracovní postup.

Suspensi spor dokonale protřepeme a eventuálně přefiltrujeme pipetou s vatovým uzávěrem. Takto upravenou suspensi ředíme do vhodného stupně a očkujeme na Petriho misky o průměru 10 cm. Vhodnou agarovou půdu, kterou používáme pro očkování suspensí, plníme do Petriho misek tak, aby výška nalité plotny činila cca 2,5 mm. Na plotny nanášíme 0,7—0,8 ml suspense, kterou dokonale roztřepeme po celém povrchu plotny. Naočkované Petriho misky inkubujeme při vhodné teplotě tak dlouho, až spory vyklíčí. Inkubaci před prováděním izolace jednak usnadníme vyhledávání vhodných spor, protože v některých případech nevyklíčené spory unikají pozornosti, jednak zhuspodárníme pracovní postup tím, že izolujeme spory pouze životaschopné.

Izolátor, sondu a lancetu sterilisujeme před prací horkým vzduchem. Oba nástroje odkládáme během práce do 70% alkoholu a opalujeme. Izolátor, který nasuneme po horkovzdušné sterilizaci na objektiv tak, aby jeho otvory byly po levé a pravé straně, snímáme během práce s objektivu v občasných intervalech a sterilisujeme rovněž ponořením do alkoholu a opatrným opálením.

Petriho misku s naklíčenými spory položíme na stůl mikroskopu, osvětlíme zpravidla procházejícím světlem (nízkovoltová bodová lampa), zaostříme, vyhledáme vhodnou sporu a krouživým pohybem misky se přesvědčíme, že okolí vyhlédnutého objektu je prasto jiných spor. Poté snížíme tubus mikroskopu tak, až spodní okraj isolační trubky narazí na dno Petriho misky. Pro uvolnění vyříznuté části agaru posuneme misku ve vodorovném směru a tubus mikroskopu opět zdvihne. Odstraníme a uzavřeme misku se suspensí a sondou vysuneme vyříznutý váleček agaru do komory izolátoru, kde zůstane přichycen na stěně. Se stěny jej sesuneme lancetou a přeneseme na novou Petriho misku, kde jej postavíme na základnu. Pro kontrolu toho, že na horní základně agarového válečku jest lokalizována jediná spora, prohlédneme bez snímání izolátoru ihned takto založenou kulturu v procházejícím světle, přirozeně za předpokladu průsvitnosti agarové půdy. Protože bylo zjištěno, že pro vývoj kolonie je vhodnější pokládati agarový váleček se sporou na bok, jelikož tak dosáhneme rychlejšího a stejnoměrnějšího vývoje kolonie, položíme jej po kontrole na bok. Další kontrolu pak provedeme po vhodné době inkubace, kdy již dojde k dalšímu růstu naklíčené spory. Výhodné pro tento účel jest osvětlení dopadajícím světlem.

Na Petriho misku, určenou pro kultivaci monosporických isolátů, umístujeme buď jeden váleček s izolovanou sporou doprostřed, anebo válečků několik v pravidelných rozestupech. V zásadě se zde řídíme povahou materiálu. Je přirozené, že optimálním způsobem jest umístění jednoho isolátu na jednu Petriho misku (vyrůstající kolonie není ovlivňována koloniemi jinými, není nebezpečí vzájemné kontaminace), musíme však přitom uvážit, že tento postup je materiálově nákladnější a proto zpravidla očkujeme na jednu Petriho misku tři až čtyři isoláty. Odočkování kultur takto monosporicky založených provedeme opět podle povahy materiálu po příslušné době inkubace normálním způsobem na šikmý agar vhodného složení.

Zhodnocení methodiky.

Proti metodám dřívějším spatřujeme hlavní výhodu našeho isolačního způsobu v možnosti poříditi dostatečně rozsáhlé soubory isolátů s minimálními náklady jak technickými, tak také časovými. Zjistili jsme, že založení jednoho sta monosporických kultur tímto způsobem trvá zaevidovanému pracovníku asi tři hodiny. Přirozeným požadavkem jest ovšem naočkování ploten suspensí vhodně ředěnou, aby vyhledávání izolovaných spor nečinilo potíže. Během zakládání asi 1000 monosporických kultur, kde byla spolehlivost metody pečlivě kontrolována, jsme nezjistili ani jeden případ, kdy by byla s izolovanou sporou přenesena spora další. I když nutno s takovým případem při izolaci počítat, ukazují tyto dosavadní výsledky, že spolehlivost metody je značně vysoká. Při izolacích, které jsme prováděli v normální mikrobiologické laboratorii, neupravené jako aseptický prostor, jsme během desetidenní inkubace vyřazovali asi 5 % ploten, znesterilněných houbami nebo bakteriemi. Nesterilnost, jejímž zdrojem byla isolační technika (nedokonalá sterilisace izolátoru během práce), byla pozorována jedenkrát u pěti isolátů, kde kontaminujícím organismem byly *Saccharomycety*. Soudíme tedy, že tato metoda vyhovuje jak co do záruky monosporického původu isolátů, tak co do spolehlivosti aseptického provedení izolace. Splňuje předpoklad nekomplikovanosti a lze ji používat s minimálními náklady. Její použití je přirozeně omezeno na izolaci takových útvarů, které jsou dobře rozlišitelné při celkovém zvětšení asi 200×. Nelze ji tedy použít pro monosporickou nebo jednobuněčnou izolaci bakterií, na druhé straně však má široký rozsah použitelnosti pro spory většiny hub, pro kvasinky, pro jednobuněčné řasy a pro zakládání monosporických kultur Bryophyt a Pteridophyt.

Souhrn.

Byla vypracována metoda pro monosporickou izolaci hub, při které jest používáno jako izolátoru kuželovitého násadce, nasunutého na slabý objektiv. Isolátor jest zkonstruován tak, že vzdálenost trubkovitého zakončení izolátoru od frontální čočky objektivu jest o málo kratší, než pracovní vzdálenost objektivu. Tímto způsobem jest umožněno objektivem s nasazeným izolátorem vyhledat vhodnou sporu na agarové plotně, posunutím tubusu mikroskopu ponořit trubkovité zakončení izolátoru do agaru a poté přenést vyříznutou část půdy se sporou na novou živnou půdu. Vyjmutí agarového válečku z izolátoru se děje jeho vysunutím do komory izolátoru. Tato komora jest opatřena dvěma vejčitými otvory, které umožňují přenesení válečku lancetou.

Pomocí této metody lze získat 100 isolátů asi za tři hodiny, při čemž vzhledem k neustálé mikroskopické kontrole pracovního postupu je dokonalá záruka toho, že založená kultura pochází z jediné spory. Praktické provádění izolace je velmi jednoduché, zařízení lze snadno udržovat sterilní a finanční náklady, spojené s jeho pořízením, jsou minimální. Metodu lze použít pro izolaci spor většiny hub, pro izolaci kvasinek, jednobuněčných řas a pro izolaci spor Bryophyt a Pteridophyt.

Literatura:

- Ezekiel W. N. (1930): Modified procedure with the Keitt single-spore method. *Phytopath.* 20 : 583—586.
- Georg L. K. (1947): A simple rapid method for obtaining monospore cultures of fungi. *Mycologia* 39 : 368—371.
- Hildebrand E. M. (1938): Techniques for the isolation of single microorganismus. *Bot. Rev.* 4 : 627—664.
- Hildebrand E. M. (1950): Techniques for the isolation of single microorganismus II. *Bot. Rev.* 16 : 181—207.
- Keitt G. W. (1915): Simple technique for isolating single-spore strains of certain types of fungi. *Phytopath.* 5 : 266—269.

- L a m b e r t E. B. (1939): A spore isolator combining some of the advantages of the La Rue and Keitt methods. *Phytopath.* 29 : 212—214.
- L a R u e C. D. (1920): Isolating single spores. *Bot. Gaz.* 70 : 319—320.
- M c L e a n R. C. (1939): Isolating fungus spores. *Watson's Micr. Rec.* 46 : 3—4.
- S a s s J. E. (1929): The cytological basis for homothallism and heterothallism in the Agaricaceae. *Amer. J. Bot.* 16 : 663—701.

Я. Нечасек, Ф. Палечкова, А. Тесарж:

Моноспорная изоляция грибов.

Разработан метод моноспорной изоляции грибов, при котором как изолятор применяется конусообразная наставка, надетая на слабый объектив. Изолятор конструирован таким образом, что расстояние от фронтальной линии объектива до трубкообразного окончания изолятора немного меньше, чем рабочее расстояние объектива.

Таким образом, возможно при помощи объектива с изолятором отыскать нужную спору на чашке с агаром, снизив тубус микроскопа погрузить трубкообразное окончатие в агар и перенести вырезанную частицу агара со спорой на новую питательную среду. Агаровый цилиндрик вынимается из трубки изолятора в его камеру. Эта камера снабжена двумя овальными отверстиями, благодаря которым возможно перенесение цилиндрика при помощи ланцета.

Этим методом можно провести 100 изоляций в течение приблизительно 3—4 часов, причем благодаря непрерывному микроскопическому контролю вообще обеспечено, что культура выращена из одной споры. Практическое проведение работы очень простое, оборудование легко удерживается стерильным, а также и расходы на его приобретение минимальны. Метод применим для изоляции спор большинства грибов, для изоляции дрожжей, одноклеточных водорослей и для изоляции спор бриофитов и птеридофитов.

J. Nečásek, F. Palečková u. A. Tesář:

Monosporische Isolierung von Pilzen.

Es wurde eine Methode zur monosporischen Isolierung von Pilzen ausgearbeitet, bei welcher die Isolierung mittels einer auf das Mikroskopobjektiv aufsteckbaren kegelförmigen Vorrichtung durchgeführt wird. Die Isoliervorrichtung ist so konstruiert, dass die Entfernung des unteren Röhrchenendes von der Frontlinse des Objektivs etwas kürzer als der Objektabstand des Objektivs ist. Zur Verwendung gelangt ein Objektiv mit geringer Eigenvergrößerung. Die Isolierung geschieht auf folgende Weise:

Mit dem Objektiv, auf dem die Isoliervorrichtung aufgesetzt ist, wird auf der Oberfläche der Agarplatte eine geeignete keimende Spore aufgesucht, worauf durch Senken des Mikroskoptubus mit dem röhrenförmigen Ende der Vorrichtung ein walzenförmiges Stück Agar ausgestochen und durch Heben des Tubus herausgehoben wird. Das herausgestochene Agarstück wird mit einem passend zugebogenen Drahtstück von unten her aus dem Röhrchen in die kegelförmige Kammer der Isoliervorrichtung hinaufgeschoben und hierauf mittels einer Lanzette auf eine neue Agarplatte übertragen.

Nach dieser Methode ist es möglich, 100 Isolate in drei Stunden herzustellen, wobei infolge der ständigen mikroskopischen Kontrolle des Arbeitsvorganges die vollständige Sicherheit gegeben ist, dass die so angelegten Kulturen tatsächlich von einer einzigen Spore abstammen. Die praktische Durchführung der Methode ist sehr einfach, die Einrichtung ist leicht steril zu halten und der finanzielle Aufwand ihrer Herstellung gering. Die Methode ist zur Isolierung von Sporen der meisten Pilze, zur Isolierung von Hefezellen, von einzelligen Algen und auch zur Sporenisolierung von Bryophyten und Pteridophyten geeignet.