

Élesztőtenyészetek sejttömegének összehasonlító meghatározása oxidimetriás titrálással

BALÁZS OTTÓ

Agrártudományi Egyetem, Növényélettani Tanszék, Budapest

Bevezetés

Biológiai és mezőgazdasági vizsgálatokkal kapcsolatban gyakran szükségessé válik mikroorganizmus tenyészetek sejt-tömegének pontos összehasonlítása. Általában valamely külső tényező hatása olymódon figyelhető meg, hogy két mikroorganizmus-tenyészet kezelése csak a vizsgálandó tényezőben különbözik egymástól s a kontrollhoz viszonyított sejtszám-különbség mutatja a hatást. Mennyiségi méréssel kapott viszonyszám a vizsgált hatás mennyiségi értékelésére is használható. Így pl. ezzel a módszerrel lehet értékelni a mitogenetikus sugárzás hatását is (7). Az alábbiakban ismertetésre kerülő módszert az *Escherichia coli* mitogenetikus sugárzásának vizsgálatai során dolgoztuk ki (2, 3, 4), de úgy véljük, hogy minden olyan összehasonlító vizsgálat elvégzésére használható, melynél ugyanazon tápoldaton tenyésztett adott mikroorganizmus-fajta összes sejteinek számát ill. ennek alakulását kell összehasonlítani különböző tenyésztési feltételek mellett. Így pl. bizonyos tenyészet hőfokoptimumának, levegőigényének, sugárérzékenységének a tenyésztő edényzet hatásának stb. tanulmányozására alkalmazható. A módszer különös előnye, hogy költséges műszer nélkül, kémiai laboratóriumi felszereléssel elvégezhető.

Az *E. coli* mitogenetikus sugárzásának vizsgálata közben a sugárhatás mérési hibáinak csökkentése végett vizsgálat alá vettük az irodalomban ismertetett, sejtmennyiség összehasonlító meghatározására alkalmas módszereket (1). A kérdés úgy vetődött fel, hogy a mitogenetikus sugárzás észlelése ill. hatásának mennyiségi értékelése többek között élesztő-tenyészetek sejtszámának összehasonlító mérésével is lehetséges, a hatás mérése tehát különbségmérésre visszavezethető. Gurwitsch eredeti értékelése alapján (1, 7.) Baron által kidolgozott (5) »élesztő-detektor« módszer azon alapul, hogy mikroszkóp segítségével megszámlálják a sugárhatásnak kitett és a kezeletlen kontrol tenyészetek sejtszámát a sarjakkal együtt, s megállapítják, hogy 100 anyasejtre hány sarj jut. Sarjakon Gurwitsch az anyasejt méretének $\frac{1}{3}$ -nál nem nagyobb sejteket érti. A számlálást 10 ill. 20-szoros ismétléssel végzik mind a kezelt, mind a kontrol tenyészetben. A sugárhatás mértékéül a sarjak számának különbsége szolgál, melyet a kontrol tenyészet sarjainak számára vonatkoztatva százalékban fejeznek ki. Ha tehát a kezelt tenyészet sarjainak száma a , a kontrol sarjainak száma b , a sugárhatás %-ban kifejezett értéke (effektus %):

$$E = \frac{a - b}{b} \cdot 100 (\%) \quad 1.$$

Rabinerson és Filippov (9) fenti módszerrel végzett méréseinek jegyzőkönyv-kivonatából kitűnik, hogy a mikroszkópos sejtszámlálás módszerének középérték középhibájában megadott relatív hibája ($\Delta\%$) — igen optimális körülmények mellett — 5–10 relatív % körül ingadozik. Ez a hiba az összehasonlítás %-ban megadott eredményét ($E\%$) — mint látni fogjuk — nagymértékben bizonytalaná teszi.

Hasonló nagyságrendű hibát ad Plotzky és Salkind (8) módosított meghatározása is, ahol a kezelt és kezeletlen tenyészet összes sejtjeinek számát határozzák meg Thoma-Zeiss féle sejtszámláló kamra alkalmazásával. A meghatározások relatív hibáját sem Frank nefelometráción alapuló (6), sem Braines ülepítésen alapuló (7) módszere nem tudta csökkenteni, a középérték középhibájából számolt relatív hiba mindnél 5–10 % közé esik. Bármilyen sejtszámlálási módszert alkalmaznak, a változás %-ban kifejezett értékét mindig az 1. képlet segítségével számoljuk ki, a sejt meghatározások hibái tehát az eredményt nagymértékben befolyásolják.

A százalékban kifejezett sejtszám-változás abszolút hibájának kiszámítása

A százalékban kifejezett sejtszám-változás ($E\%$) abszolút hibája az alkalmazott sejt mennyiség meghatározási módszer hibáiból adódik úgy, hogy az a két sejtszám-meghatározás közben elkövetett mérési hibákból vektoriálisan tevődik össze. A hibaszámolás ismert szabályai szerint (11) a végeredmény abszolút hibája az 1. képlet parciális differenciálhányadosai négyzetének gyökeltartó addíciójából kiszámítható (vektoriális addíció).
E szerint a keresett hiba:

$$\pm dE (\%) = 100 \sqrt{\left(\frac{\partial E}{\partial a} da\right)^2 + \left(\frac{\partial E}{\partial b} db\right)^2} \quad 2.$$

Ebből

$$\pm dE (\%) = \frac{100}{b} \sqrt{(da)^2 + \left(-\frac{a}{b} db\right)^2} \quad 3.$$

A képletekben $\pm dE (\%)$: az összehasonlítás százalékban kifejezett értékének abszolút hibája. a ; a kezelt (besugárzott) tenyészet sejtszáma. b : a kezeletlen (kontrol) tenyészet sejtszáma. da ill. db ; a sejtszám meghatározásoknál elkövetett hiba.

da és db meghatározása a mérési adatokból közismert (11)

$$dx = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{n \cdot (n-1)}} \quad 4.$$

képlet alapján történik, ahol dx ; a középérték középhibája, d ; a mérések középértékétől (M) való eltérés. n ; az ismétlések száma.

A középérték közepes hibáját relatív százalékban ($\Delta\%$) megkapjuk a

$$\Delta\% = \frac{dx}{M} 100 \quad 5.$$

összefüggésből, ahol M ; a középérték $\left(M = \frac{\sum x}{n}; x \text{ a mérési adatok számértéke}\right)$

Ezek alapján a 3. összefüggés a következő formára hozható:

$$\pm dE (\%) = \pm \frac{a}{b} \sqrt{(\Delta_a \%)^2 + (\Delta_b \%)^2} \quad (\%) \quad 3b.$$

Ha tehát az előbb említett sejtszámlálási módszerek relatív hibáját igen optimálisan mindössze 5 %-nak tekintjük, a hatás nagyságát kifejező %-érték abszolút hibája a következőképpen alakul:

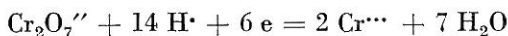
$$\pm dE (\%) = \pm \frac{a}{b} \sqrt{5^2 + 5^2} = \pm 7 \frac{a}{b}$$

az 1. képlet alapján $\frac{a}{b}$ értéke definíciószerűen ≥ 1 , ez azt jelenti, hogy a %-ban megadott sugárhatás értékében elkövetett hiba 0%-os hatás esetében, tehát egyformán kezelt tenyészeteknél legalább $\pm 7\% \left(\frac{a}{b} = 1\right)$, s minél nagyobb a hatás %-ban kifejezett értéke, az eredmény hibája annál jelentősebb. Látható tehát, hogy ezzel a módszerrel kb. 10 %-nál kisebb sejtszámváltozás értékelése nem reális.

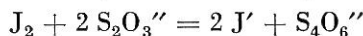
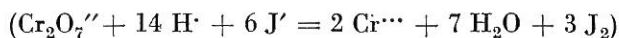
A sejt-tömeg-titrálás módszertani alapjai

A fenti megfontolások alapján látható, hogy valamely élettani hatás sejt-mennyiség-összehasonlításon, tehát lényegében különbségmérésen alapuló értékelése kellő biztonsággal csak abban az esetben lehetséges, ha a számítás alapjául szolgáló sejt-meghatározási módszer hibája lényegesen kisebb, mint a várható legkisebb különbség. Ezért az *E. coli* mitogenetikus sugárzásának tanulmányozásakor az élesztősejtek mennyiségének összehasonlítását azok oxidimetriás titrálása segítségével oldottuk meg. Ezzel az eljárással nem a sejtek számát kívántuk meghatározni, hanem célunk kizárólag a tenyészetekben lévő sejtek össztömegének összehasonlítása volt az oxidálószer mennyiségében kifejezett viszonyszám segítségével. E viszonyszám pontossága azonban — megállapításunk szerint — az ismert sejt-mennyiség-meghatározásokat felülmúlja. A középérték relatív hibája kisebb, mint 1%, s így a hatás pontosabb mérését teszi lehetővé. Ezzel a módszerrel a %-ban kifejezett hatás hibája maximálisan $\pm 2\%$, a módszer tehát igen kis eltérés kimutatását és mérését biztosítja (A 3b. képlet gyökjel alatti értéke maximálisan $\pm 1,5$ szemben más módszerek ± 7 értékével).

A titrálás azon alapul, hogy a tápoldattól teljesen megtisztított, savanyú közegben szuszpendált sejtekhez ismert feleslegben káliumbikromát mérőoldatot adunk, s ennek feleslegét — adott oxidációs idő elteltével — jodometriásan visszaitráljuk nátriumtioszulfát segítségével. A meghatározás reakciói tehát: A sejtek oxidálásakor



visszaitrálásnál:



Az élesztő-sejttömeg titrálás módszere

A meghatározás menete a következő: Üledéktől mentes, alkalmas tápláló oldaton tenyésztett és melegítéssel megölt élesztőszuszpenzióból »töményiségek«

szerint 2—5 ml-t centrifugacsőbe mértünk. Ezt percenként 3000 fordulattal 10 percig centrifugáltuk. A centrifugacső aljára keményen összetapadt élesztősejtek fölött lévő tápoldatot kapillárisban végződő pipettával óvatosan leszivattuk oly módon, hogy az eltávolítandó folyadékból csak nagyon kevés maradt a sejtek fölött. Ha az elszívást kellő óvatossággal végezzük, az élesztősejtekből nem vesz el számottevő mennyiség. Ennek ellenőrzésére az eljárást élő sejtekkel is elvégeztük, s lemezöntéssel vizsgáltuk az elszívott tápoldatban lévő sejtek számát. Azt találtuk, hogy ml-ként 25—50 sejt veszteséggel számolhatunk, ez meghatározásunkat nem zavarja.

A tápláló oldat elszívása után a sejteket 5 ml desztillált vízben szuszpenzióba állítottuk és az előbbieken ismertetett módon centrifugálással kétszer átmostuk. A második mosás után elszívott mosóvíz oxidálószer fogyasztása a meghatározás hibahatárán belül esik. Háromszori centrifugálás után a centrifugacsőbe gyakorlatilag tiszta sejttömeg marad.

A centrifugacsőben lévő, a tápoldattól teljesen megtisztított élesztőhöz 1,00 ml 0,001 n káliumbikromát oldatot adagoltunk (célszerűen csapos pipettából), az élesztőt ebben felkevertük és hozzáadtunk 0,2 ml 20 %-os pro analysi tisztaságú kénsavat. Ezután 15 percig szobahőmérsékleten, befedve, sötét helyen tartottuk. 15 perc elteltével hozzátettünk néhány kristályka káliumjodidot, s a kivált jódot 0,001 n nátriumtioszulfáttal megittiráltuk. A végpont jelzésére keményítő indikátort használtunk, mely az alkalmazott, igen híg tioszulfát mérőoldat fél cseppjére is élesen jelzi a titrálás végpontját. Kísérleteinknél olyan töménységű élesztőszuszpenziót használtunk, melyhez 1 ml 0,001 n káliumbikromát oldat adagolása elegendő volt. A vegyszerek esetleges tisztatlansága okozta oxidáló szer fogyás meghatározására vakpróbát alkalmaztunk, s az észlelt bikromát fogyasztás adatát a mérési adatok javítására fordítottuk.

Egy-egy tenyészet élesztő-tömegének meghatározását úgy hajtottuk végre, hogy az erősen felkevert élesztőszuszpenzióból a leírt módon egyidejűleg három azonos mennyiségű mértünk a centrifugacsővekbe, s a tisztítás után mindhárom próbát megittiráltuk. Egy meghatározás tehát három párhuzamos titrálásból áll. A szuszpenzióban lévő élesztősejtek mennyiségét a fogyott 0,001 n oxidálószer ml-einek számával jelöljük.

Az élesztősejtek titrálására igen kevés oxidálószer fogyott, ezért végeztük a meghatározást 0,001 n oldatokkal, mikrobürettából. Az 0,001 n oldatok alkalmazása a meghatározások során nagyobb gondosságot igényel ugyan, de a leolvasás hibáját lényegesen csökkenti. A káliumbikromát mérőoldatot pontosan bemért 0,01 n oldatból, kalibrált mérőedényekkel, hígítással készítettük. A hígított 0,001 n oldatot legfeljebb egy hétig használtuk. Ilyen körülmények között a káliumbikromát faktora még 0,001 n oldatban is állandó, s az oldat faktorát 1,000-nak tekinthetjük. Az élesztő-szuszenziók relatív viszonzszámának meghatározásakor a káliumbikromát faktorának esetleges kis hibája kiküszöbölődik. A meghatározáshoz használt nátriumtioszulfát faktora ellenben másként bírálendő. Ennek faktora igen változó, ezért minden méréssorozat előtt meg kellett határozni. A tioszulfát mérőoldat faktorát 1,00 ml 0,001 n káliumbikromát mérőoldat segítségével, jodometriásan állapítottuk meg.

Példaképen közöljük egy meghatározás jegyzőkönyvét. (lásd 2. táblázat, 4. sz. kísérlet.).

1. Nátriumtioszulfát faktorának megállapítása :

1,00 ml 0,001 n $K_2Cr_2O_7$ + 0,2 ml 20 %-os H_2SO_4 + kristályka KJ. Azonnal titrálva.

Fogyás :	$d \cdot 10^{-3}$	$d^2 \cdot 10^{-6}$
1,091 ml	2	4
1,096 »	3	9
1,092 »	1	1

$M = 1,093$ ml. $dx = \pm 0,0015 \quad \Delta \% = 0,15 \%$
 Faktor : $0,9149 \pm 0,0012$

2. Vakpróba :

1,00 ml 0,001 n $K_2Cr_2O_7$ + 0,2 ml 20 %-os H_2SO_4 · 15 perc állás után + kristályka KJ.

Fogyás:	$d \cdot 10^{-3}$	$d^2 \cdot 10^{-6}$
1,070 ml	2	4
1,078 »	6	36
1,068 »	4	16

$M = 1,072$ ml. $dx = \pm 0,0030 \quad \Delta \% = 0,28 \%$

3. Élesztőtényészet titrálása :

3 ml élesztőtőszuszpenzió (2. tábl. 4 s. sz., »a«) + 1,00 ml 0,001 n $K_2Cr_2O_7$ + 0,2 ml 20 %-os H_2SO_4 . 15 perc állás után + kristályka KJ.

Fogyás :	$d \cdot 10^{-3}$	$d^2 \cdot 10^{-6}$
0,350 ml	1	2
0,342 »	7	49
0,354 »	5	25

$M = 0,349$ ml. $dx = \pm 0,0035 \quad \Delta \% = 1,15 \%$

3 ml. élesztőtőszuszpenzió (2. tábl. 4 s. sz., »b«) + 1,00 ml 0,001 n $K_2Cr_2O_7$ + 0,2 ml 20 %-os H_2SO_4 . 15 perc állás után + kristályka KJ.

Fogyás :	$d \cdot 10^{-3}$	$d^2 \cdot 10^{-6}$
0,353 ml	5	25
0,366 »	8	64
0,355 »	3	9

$M = 0,358$ ml. $dx = \pm 0,0040 \quad \Delta \% = 1,12 \%$

Ezek az értékek a »visszatitráláshoz« fogyott 0,001 n $Na_2S_2O_3$ értékeit jelentik. A ténylegesen fogyott 0,001 n. $K_2Cr_2O_7$ ml-einek számát a következőképen számítjuk ki :

Vakpróbára fogyott $Na_2S_2O_3$	$1,072 \pm 0,003$	$1,072 \pm 0,003$ ml
Élesztőre fogyott $Na_2S_2O_3$	$0,349 \pm 0,004$	$0,358 \pm 0,004$ »
Különbség	$0,723 \pm 0,005$	$0,714 \pm 0,005$ »
$Na_2S_2O_3$ faktorával szorozva	$0,662 \pm 0,004$	$0,653 \pm 0,004$ »

Ezek az értékek 3—3 élesztőtőszuszpenzió oxidálószer fogyasztását jelzik 0,001 n oldat ml-eiben. A %-ban kifejezett különbség (hatás) :

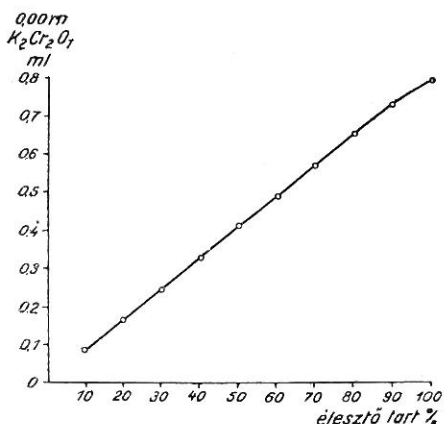
$$E \% = \frac{0,662 - 0,653}{0,653} \cdot 100 = 1,38 \%$$

$$\pm dE (\%) = \frac{100}{0,653} \sqrt{0,004^2 + \left(\frac{0,662}{0,653} \cdot 0,004\right)^2} = \pm 0,86$$

A végeredmény tehát: $E \% = 1,4 \pm 0,9$

Kísérleti rész

Megállapítottuk az oxidálószer mennyisége és a megtitrált sejttömég közötti összefüggést. A kísérletet úgy végeztük, hogy igen tömény élesztőszuszpenzió hígításával különböző ismert töménységű szuszpenziókat állítottunk elő, s ezek oxidálószer fogyasztását mértük. Az eredményeket az 1. ábra tartalmazza. A sejtek oxidálószer fogyasztása az általunk vizsgált élesztőmennyiség esetében tehát a szuszpenziók töménységével, azaz a sejtek számával lineárisan változik. Nagyobb töménységű szuszpenzióknál az összefüggés már nem lineáris. A hígítási sorozat meghatározásánál kapott oxidálószer fogyasztás értékeinek felhasználásával megbecsülhető volt az 1. képlet alapján számított százalék értékben kifejezett különbség ($E \%$) maximális hibája is. Ez a gyakorlatilag fontos értékek esetében 0,5—2,0 % közé esik. A módszer pontosságát igazolja az is, hogy az egymástól 10—10 %-al eltérő hígítások titrálási eredményeiből képzett különbségek értékeinek »szórása« is a középérték középhibáján belül esik, azaz 10 %-os különbség $\pm 1 \%$ ingadozással mérhető.



1. ábra

Az oxidálószer-fogyás változása a titrált élesztőmennyiség függvényében.

széges oxidálószer-fogyás ill. meghatározandó legkisebb élesztőmennyiség, mely mellett a %-ban kifejezett különbség értékeinek maximális hibája még elfogadható. Az 1. táblázat adatait a 3. képlet segítségével számítottuk ki úgy, hogy da ill. db értékeit egyaránt $\pm 0,004$ ml-nek tekintettük.

A számítások alapján tehát méréseinket olyan élesztő-koncentrációval kellett végeznünk, hogy a mérés többi tényezőjének tekintetbevételével az oxidálószer-fogyás maximális legyen. Ez méréseinknél 0,4—0,6 ml 0,001 n oxidálószer fogyasztásnak megfelelő élesztőmennyiség volt.

Sejtmennyiség meghatározáson alapuló élettani összehasonlító megfigyelések csak úgy végezhetőek, hogy az összehasonlítást mindig két vagy több külön-külön tenyésztő, de azonos kezdeti csíraszámot tartalmazó tenyésztőből határozzuk meg. Az élettani összehasonlítás számszerű kifejezése tehát csak akkor lehet jól meghatározott, ha tudjuk azt, hogy a tenyészetek sejtszám-különbsége a tenyész-

tési feltételek általunk vizsgált változásából származik. Ez az elv érvényes a mitogenetikus sugárzás vizsgálatára is. Megvizsgáltuk tehát, hogy azonos kezdeti sejtszámú tenyészetek sejttömege azonos kezelés mellett milyen »szórást« mutat. E célból 5—5 különböző kezdeti sejtszámú tenyészetet készítettünk, és ezekből

I. táblázat

Az elkövethető maximális hiba változása a hatás %-a és a fogyasztott oxidálószer mennyiségének változása szerint

A kontrol oxidálószer fogyasztásának (b) értéke ml-ben	(2) Az elkövetett hiba nagysága, ha a hatás		
	0%	50%	100%
0,080	±7,1 %	±7,9 %	±8,6 %
0,400	±1,41%	±1,58%	±1,73%
0,800	±0,71%	±0,79%	±0,86%

kellő homogenizálás után a lehető leggyorsabban két-két egyforma részt kivettünk. Ilymódon 2—2 egyező kezdeti sejtszámú tenyészetet kaptunk, s ezeket teljesen egyforma tenyésztési feltételek mellett tartottuk. Két óra inkubálás után az időközben megszorodott sejttömeg mennyiségét meghatároztuk. A tenyésztési feltételeket a sugárhatás mérése szerint választottuk, lényegében tehát »indukációs vakpróbát« végeztünk (4). Az eredményeket a 2. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat

Sejttömeg mennyiségének alakulása 2 óra inkubálás után, azonos kezdeti sejtszámú, azonos módon kezelt tenyészetekben

(1) Sor- szám	(2) 0,001 n K ₂ Cr ₂ O ₄ fogyása ml, középérték		(3) A különbség százalékban (a—b)	(4) A titrálás százalékban megadott absz. hibája
	a tenyészet	b tenyészet		
1	0,574 ± 0,005	0,568 ± 0,004	+1,0	±1,0
2	0,432 ± 0,005	0,440 ± 0,005	—1,8	±1,6
3	0,487 ± 0,004	0,488 ± 0,005	0	±1,4
4	0,662 ± 0,004	0,653 ± 0,004	+1,4	±0,9
5	0,885 ± 0,003	0,892 ± 0,004	—0,8	±0,6

A táblázatban a különbség %-ban kifejezett értékeit az 1. sz. képlet, a % abszolút hibáját a 3. sz. képlet segítségével számoltuk ki. A táblázat adataiból látható, hogy 2—2 párhuzamos, egyformán kezelt tenyészet sejtjeinek oxidálószer fogyasztásban mért különbsége 0% körül statisztikusan eloszlott. Az összehasonlító sejttömeg-méréssel kapott, kb 3%-nál nagyobb különbségek tehát csak az eltérő tenyésztési feltételektől származhatnak. 3—4%-os sejttömeg-különbség tehát már kellő biztonsággal mérhető, ha az összehasonlítást a kis hibahatárú sejttömeg-titrálással végezzük. A 2. táblázat adatai egyben kísérletileg megerősítik a 3. sz. képlet alapján kiszámolt 1. sz. táblázat adatait is.

A módszer kidolgozásakor Sándor Tamással végzett vizsgálataink során a folyamat mechanizmusát még nem vizsgáltuk. Újabb eredményei szerint (10) az oxidálószer fogyasztás részben a sejtmembrán adszorpciós rétegé-

ben található organikus anyagok oxidálására, részben pedig adszorpciós folyamatokra vezethető vissza. Ezzel magyarázható az, hogy a sejtek oxidálószer fogyasztása nagyobb sejtmennyiség esetén a lineáristól eltér, ezért analitikai szempontból csak a görbe kezdeti lineáris szakasza használható. A bemért sejtmennyiség és az oxidálószer fogyasztás közötti összefüggés Sándor szerint az $x = a \cdot m^{1/n}$ kifejezéssel írható le, ahol x : oxidálószer fogyása ml, m : a bemért élesztőszuszpenzió mennyisége, a és $1/n$ állandó értékek.

A sejttömeg—titrálás módszere kritikai szempontból

Az ismertetett eljárás előnye az hogy valamely biológiai hatás esetünkben a mitogenetikus sugárzás élesztősejtekre gyakorolt hatása sokkal kisebb fáradsággal és figyelemmel sokkal pontosabban meghatározható, mint a mikroszkópos sejtszámlálás módszerével. A pontosabb végeredmények a hatás módszeres vizsgálatát nagymértékben elősegítik. A mérés pontosságát több párhuzamos meghatározással még fokozni lehetne, ez azonban ilyen természetű méréseknél szükségtelen a »biológiai szórás« nagyobb hibája folytán. A módszer eredményes alkalmazása némi gyakorlatot igényel, ez azonban könnyen elsajátítható.

Hibatényezőként szerepelhetnek:

1. A káliumbikromát készítése. (Hígítás kalibrált edényekkel!)
2. A használt mikrobüretta kalibrációs hibái.
3. az élesztő titrálásra történő előkészítésének hibái. Centrifugálás után az élesztő felett lévő oldat elszívatasakor inkább több folyadékot hagyjunk, nehogy az élesztőből számottevő veszteségünk legyen. Nagyon kell vigyázni arra is, hogy a tápoldat maradványai ne maradjanak az élesztősejtek között, mert ez az eredményeket meghamisítja. Ezért kell üledékmentes tápoldattal dolgozni.

E néhány hibaforrásra ügyelve az eredmények reprodukálhatók. Természetesen a meghatározás csak viszonylagos (relatív) értékeket szolgáltat, abszolút sejtszám-mennyiségre nem következtethetünk. A sejtszám és a fogyasztott oxidálószer mennyisége alapján a legkisebb, titrálással meghatározható élesztőmennyiség kb. $5 \cdot 10^7$ ml-ként. Erjedt, vagy erősen erjedő malátalé (kb. 10^8 sejt/ml) 1—3 ml-e még titrálható 1,0 ml 0,001 n $K_2Cr_2O_7$ -el.

Az ismertetett sejtmennyiség-összehasonlítás módszerével végzett, a mitogenetikus sugárzásra vonatkozó vizsgálatainkat külön közleményben közöljük

Összefoglalás

Hibaszámlálás alapján megállapítottuk, hogy valamely külső hatás, így a mi méréseinknél a mitogenetikus sugárzás élesztőtenyészetek sejtszámára gyakorolt hatása, összehasonlításon alapuló méréssel csak akkor határozható meg kellő biztonsággal ha a sejtmennyiség mérése kis hibával elvégezhető. Az irodalomban ismertetett mikroszkópos és egyéb sejtszámlálási módszerek relatív hibája több, mint 5 %, Ez a hiba, ha a hatást a sejtgyarapodás %-ában fejezzük ki, annak értékében több mint + 7 %-os ingadozást jelent.

Az általunk kidolgozott és ismertetett oxidimetriás titráláson alapuló sejtmennyiség-mérési módszer relatív hibája 1% körül van. A hatás %-ban kifejezett értékében ez mindössze 0,5—2%-os ingadozást (abszolút hibát) eredményez, ami a mitogenetikus sugárhatás módszeres vizsgálatát nagymértékben elősegíti.

Módszerünk azon alapszik, hogy a tápoldattól centrifugálással kimosott nagyobb töménységű élesztő-szuszenzióhoz 1,0 ml 0,001 n $K_2Cr_2O_7$ mérőoldatot

adunk, melynek feleslegét 15 perc oxidációs idő után jodometriásan visszamérjük. A titrált élesztő mennyiségét a fogyott 0,001 n oxidálószer ml-eiben adjuk meg. A sejtek oxidálószer fogyasztása az általunk vizsgált élesztőmennyiség mellett a szuszpenzió töménysége, azaz a sejtek száma szerint lineárisan változik.

Összehasonlítottuk azonos inokulummal beoltott, azonos módon kezelt élesztőtenyészetek csíraszámának alakulását 2 óra inkubálás után (vakpróba). A sejttömegtitrálás módszerének alkalmazásával kapott eredmények 0% körül statisztikusan megoszlának. Külön tenyésztett élesztőtenyészetek eltérő csíraszámára tehát csak valamely külső hatás következtében jön létre. Módszerünkkel 3—4 %-os sejttömeg különbség már kellő biztonsággal mérhető.

Érkezett : 1954. március 12.

Irodalom

1. *Aberhalden* : Handb. d. biolog. Arbeitsmeth. Berlin & Wien, Urban & Schwarzenberg, 1929.
2. *Balázs, O. & Sándor, T.* : A mitogenetikus sugárzásra vonatkozó kísérletek. Budapest, 1947. Kézirat.
3. *Balázs, O.* : A mitogenetikus sugárzás vizsgálata. Doktori értekezés, Budapesti Tud. Egyet. 1950.
4. *Balázs, O.* : Az *Escherichia coli* mitogenetikus sugárzásának vizsgálata új mérési módszerrel Budapest, 1951. (kézirat)
5. *Baron, M.* : Radiobiol. Gen. 3. 906, 1935
6. *Frank, G.* : Biol. Zbl. 52. (1) 1, 1932
7. *Gurwitsch, A.* : Die Mitogenetische Strahlung, J. Springer, Berlin, 1936.
8. *Plotzky, A. & Salkind, S.* : Biol. Zbl. 51. (9) 465, 1931
9. *Rabinerson, A. & Filippov, M.* : Acta Physicochimica USSR. 8 (4) 419, 1938.
10. *Sándor, T.* : Annales de l'Institut Pasteur 78 803, 1950.
11. *Weitbrecht, W.* : Ausgleichungsrechnung nach der Methode der kleinsten Quadrate. Berlin & Leipzig, G. J. Göschen, 1912.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ МАССЫ ДРОЖЖЕВЫХ КУЛЬТУР ОКСИДИМЕТРИЧЕСКИМ ТИТРОВАНИЕМ

О. Балаж

Кафедра физиологии Университета Аграрных Наук, Будапешт

Резюме

На основании расчета ошибок установлено, что какое-нибудь действие, итак в нашем случае действие митогенетической радиации на число клеток дрожжевых культур, измерениями на основании сравнения с достаточной верностью может быть определено лишь в случае, если измерение количества клеток может быть произведено с небольшими ошибками. Изложенные в литературе микроскопический и прочие методы исчисления клеток имеют относительную ошибку свыше 5%. При выражении действия в %-ах размножения клеток, эта ошибка может означать колебание в пределах $\pm 7\%$ от величины процентов размножения.

Разработанный и изложенный автором метод измерения количества клеток, основанный на оксидиметрическом титровании, имеет относительную ошибку около 1%. В величине действия, выраженного в %-ах, это обозначает колебания не более 0,5—2% (абсолютная ошибка), что в значительной мере способствует методическому измерению действия митогенетической радиации.

Метод основан на том, что к большой концентрации у дрожжевой суспензии, вымытой центрифугированием из питательного раствора, добавляется 1,0 мл измерительного раствора 0,001n $K_2Cr_2O_7$, излишек которого после 15 минут оксидации измеряется подометрически. Количество титрованных дрожжей показывается в мл израсходованного 0,001 нормаль-

ного окислительного вещества. Расход окислительного вещества, при исследуемом количестве дрожжей, изменяется линейно по концентрации суспензии или по числу клеток.

В опытах сравнивались изменения числа зародыщей дрожжевых культур привитых той же прививкой и обрабатываемых тем же способом, по истечении 2 часов инкубации (контроль).

Результаты, полученные при применении метода титрования клеточной массы, статистически распределяются вокруг 0%. Следовательно, полученное число зародыщей отдельно разведенных дрожжевых культур, отклоняющееся от этого, может создаться только под действием какого либо внешнего действия. С помощью изложенного метода расхождения по клеточной массе в 3 до 4% измеряются с надлежащей верностью.

Табл. 1.: Изменения максимальной допустимой ошибки, по изменениям %-а действия и количества израсходованного окислительного вещества. (1) Величина (б) контрольного израсходования окислительного вещества в мл. (2) Величина допущенной ошибки, при 0%, 50% и 100% действия.

Табл. 2.: Изменения клеточной массы после 2-часовой инкубации, в культурах, с идентичным исходным числом клеток и идентичной обработки.

(1) №№ пп. (2) расход в мл 0,001n $K_2Cr_2O_7$, среднее двух культур (3) Расхождение в %-ах (а-б). (4) Абсолютная ошибка титрования, выраженная в %-ах.

Comparative Determination of the Cell-Mass of Yeast Cultures by Oxidimetric Titration

O. BALÁZS

Department of Plant Physiology, University of Agricultural Science, Budapest

Summary

By error calculations the author succeeded in establishing that the effect of an external factor (such as mitogenetic radiation in his particular studies) on the cell number of yeast cultures can be reliably determined only if the measurement of cell number can be carried out with a small error. The relative error of microscopic and other methods of counting described in the literature usually exceeds 5 per cent. This means a variation of ± 7 per cent when the effect is expressed as percentage of cell growth.

The relative error of the new method for measuring cell numbers, based upon oxidimetric titration, is about 1 per cent. Expressed in the percentage of effect, this leads to a variation (absolute error) of only 0.5—2.0 per cent. This fact greatly facilitates systematic investigations on the effect of mitogenetic radiation.

The method of the author consists in adding 1.0 ml. of an 0.001 N potassium dichromate solution to the rather concentrated yeast suspension separated from the nutrient solution by centrifuging. The excess of potassium dichromate is determined by iodimetric titration carried out after an oxidation period of 15 minutes. The quantity of titrated yeast is expressed in millilitres of oxidizing solution (0.001 N) consumed. In the concentration range investigated, the quantity of oxidizing agent consumed by the cells showed a linear correlation with the concentration of the suspension, i. e. with the number of cells present.

After 2 hours of incubation the changes in counts of yeast cultures inoculated with identical inocula and treated identically (blanks) were compared. The results obtained with the method of titrating the mass of cells indicated a statistical distribution around 0 per cent. Deviating counts of yeast cultures prepared separately can only be caused by some external factor. The method evolved by the author is suited for measuring differences in cell-mass of the order of 3—4 per cent with an adequate accuracy.

Table 1. Changes in the maximal error, as a function of changes in the percentage of effect and in the quantity of oxidizing agent consumed. (1) Quantity of oxidizing agent consumed by the control, expressed in millilitres (b).

(2) Magnitude of error in case of a 0, 50 or 100 per cent. effect, respectively.

Table 2. Changes in the quantity of cell-mass, after incubation for two hours, in cultures with identical initial cell counts, treated identically. (1) Serial Number. (2) Consumption of 0.001 N potassium dichromate solution, millilitres; averages observed in the two cultures examined. (3) Difference in per cent. (a—b). (4) Absolute error of titration, expressed in per cent.