

УДК 576.851.49

С. П. КЛЫКОВ, Ю. П. ПАДЕРИН, М. М. САДИКОВ, В. П. ЧУПРУНОВ, В. В. ДЕРБЫШЕВ, В. В. ГУСЕВ
Государственный научный центр прикладной микробиологии, Оболенск, Московская область, 142279

Влияние скорости роста культур на выживаемость сальмонелл

Установлена прямо пропорциональная зависимость выживаемости сальмонелл при лиофильном высушивании и в тесте “замораживание—оттаивание” от обратной удельной скорости роста культур, выращиваемых при кислородном лимитировании. Показано, что растущую популяцию можно рассматривать как состоящую из устойчивой и неустойчивой к внешним воздействиям субпопуляций. При этом абсолютная скорость образования устойчивых клеток обратно пропорциональна абсолютной скорости роста биомассы, которая в свою очередь подчиняется экспоненциальному закону.

Несмотря на широкое применение низких температур для получения и хранения биологических препаратов остается серьезная проблема — повреждающее воздействие на биологические объекты различных факторов при замораживании. Ведутся многочисленные исследования с целью подбора новых защитных сред и режимов замораживания. К настоящему времени теоретические представления о механизмах повреждающего действия низких температур в основном сводятся к тому, что основной причиной гибели живой клетки при замораживании является повреждение мембранных структур, которые служат барьером проницаемости [1—4]. По теории “минимального объема” [5] основным повреждающим фактором при замораживании является повышенная концентрация внеклеточных веществ в результате вымораживания воды в лед и связанное с этим сжатие клеток, которое влечет за собой различные деструктивные процессы с утратой жизнеспособности. Есть данные, согласно которым к нарушению мембран приводит изменение фазового состояния липидов при снижении температуры [6]. Согласно другим представлениям повреждающее действие оказывает внутриклеточное ледообразование, зависящее от скорости замораживания [7]. Ни одна из приведенных теорий не объясняет повреждающее действие низких температур всеобъемлюще. В настоящей работе сделаны следующие предположения:

1. При замораживании и высушивании мишенью для разного рода повреждающих воздействий служит клеточная мембрана.

2. Поскольку клеточная суспензия гетерогенна по возрасту отдельных клеток, то она гетерогенна и по их биохимической активности и по барьерной (защитной) функции мембран и обо-

лочек. Клетки, сохранившие жизнеспособность после замораживания и лиофильного высушивания, считаются устойчивыми.

Известно, что механизм отмирания бактериальных клеток при хранении лиофильно высушенных препаратов отличен от упомянутых выше и определяется в основном образованием свободных радикалов с высокой химической активностью, снижающих жизнеспособность клеток.

Цель настоящей работы — изучение характера выживаемости сальмонелл при лиофильном высушивании и в тесте “замораживание—оттаивание” в зависимости от фазы развития популяции.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали культуры *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella dublin*, полученные из коллекции микроорганизмов Всероссийского Государственного научно-технического института ветеринарных препаратов. Содержимое ампул с исходным штаммом высевали на чашки с МПА и инкубировали 20—24 ч при 37° в термостате. Биомассу с чашек переносили в матрасы, содержащие 1 л жидкой питательной среды, приготовленной из панкреатического гидролизата рыбо-костной муки с добавками солей KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , MgSO_4 и инкубировали при 37° в течение 20—24 ч, получая таким образом посевной материал для ферментера, содержащего 5 л среды аналогичного состава.

Выращивание в ферментере проводили при постоянной частоте вращения мешалки в интервале pH 7,0–7,4 и температуре 37°. Начиная с 4-го ч роста производили подпитку концентрированной сбалансированной средой, содержащей все компоненты питания бактерий для исключения

иных видов лимитирования роста культуры, кроме кислородного. Количество подпитки составляло 15—20% от общего объема среды, при этом общее количество аминного азота, ушедшего на процессы выращивания, составляло 260—290 мг%. Массопередача кислорода в культуральную жидкость (КЖ) выбиралась так, чтобы обеспечивался средний расход глюкозы 3,2 г/л ч, и не менялась в течение всего процесса.

Выращенную биомассу и промежуточные пробы КЖ объемом 150—200 мл центрифугировали для осаждения клеток, осадок ресуспендировали в защитной сахарозно-желатозной среде так, что конечная концентрация сахарозы и желатозы составляла соответственно 7,5% и 1,5%. Полученную суспензию помещали во флаконы по 1 мл и лиофильно высушивали. На всех стадиях переработки контролировали число живых клеток. Общую концентрацию клеток сальмонелл определяли по калибровочной зависимости $X(\text{млрд кл/мл}) = 3,5 \text{ OD}_{540} - 2$, а количество живых клеток в культуре находили высевом на плотную питательную среду.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фазу замедленного роста при периодическом культивировании с подпиткой можно представить уравнением

$$X = X_p - (X_p - X_n) \exp[-A(\tau - \tau_n)], \quad (1)$$

где X — общая концентрация биомассы, млрд кл/мл;

X_p — предельная общая концентрация клеток для данного массообмена по кислороду;

X_n — общая концентрация клеток, при которой создается кислородное лимитирование;

τ , τ_n — текущее время и время наступления лимитирования соответственно;

A — удельная скорость замедления роста биомассы, ч^{-1} .

Удельную скорость роста можно получить, дифференцируя (1):

$$dX/d\tau = A(X_p - X_n) \exp[-A(\tau - \tau_n)] = A(X_p - X) \quad (2)$$

$$\mu = (1/X)(dX/d\tau) = A(X_p/X - 1) \quad (3)$$

Параметры A , X_n , X_p , τ_n определяются графически из экспериментально снятой кривой роста биомассы и зависимости (2).

При описанных условиях рост сальмонелл подчиняется уравнению

$$\text{OD}_{540} = 11 - 7 \exp[-0,25(\tau - \tau_n)], \text{ где } \tau_n = 4 \pm 0,5 \text{ ч.}$$

Предположив, что замедление роста популяции в условиях лимитирования по кислороду обусловлено переходом клеток в устойчивую

форму, характеризующуюся повышенной прочностью мембранных структур и не участвующую в росте, мы пришли к выводу, что в этих условиях справедливо уравнение

$$X_{\text{уст}} = BX = (X_n)_{\text{уст}} \exp[A(\tau - \tau_n)], \quad (4)$$

где B — выживаемость бактерий при высушивании или оттаивании,

$X_{\text{уст}}$ — концентрация устойчивой части популяции клеток,

$(X_n)_{\text{уст}}$ — то же при наступлении лимитирования, или $dX_{\text{уст}}/d\tau = A(X_n)_{\text{уст}} \exp[A(\tau - \tau_n)]$. (5)

Нетрудно заметить, что абсолютная скорость роста общей биомассы и ее устойчивой субпопуляции обратно пропорциональны, т.е.

$$(dX_{\text{уст}}/d\tau)(dX/d\tau) = K = A^2(X_n)_{\text{уст}}(X_p - X_n) = A\mu_m(X_n)_{\text{уст}}X_n, \quad (6)$$

где μ_m — максимальное значение μ .

Преобразуя (6) с учетом, что $X_{\text{уст}} = BX$, получим:

$$BX = K/AX_p\mu + K/A^2X_p \quad (7)$$

и выражение для выживаемости

$$B = K(\mu + A)/(AX_p)^2\mu + K(\mu + A)/A^3(X_p)^2. \quad (8)$$

При $\mu \ll A$ (8) принимает вид:

$$B = K/A(X_p)^2\mu + K/(AX_p)^2. \quad (9)$$

Для (7) и (9) подстановкой известных из эксперимента значений $A=0,229 \text{ ч}^{-1}$ (рис.1), $(X_n)_{\text{уст}} = 5 \text{ млрд кл/мл}$, $X_n = 12 \text{ млрд кл/мл}$ и $X_p = 36,5 \text{ млрд кл/мл}$ были получены соотношения:

$$BX = 0,77(1/\mu) + 3,07 \quad (7a)$$

$$\text{и } B = 0,021(1/\mu) + 0,09, \quad (9a)$$

где B — выживаемость в долях единицы, BX — концентрация устойчивых клеток в млрд/мл.

В таблице представлены результаты по выживаемости сальмонелл. Зависимость выживаемости B от обратной удельной скорости роста, усредненная для трех случаев, представляет собой прямую $B = 2,285(1/\mu) + 10,911$ (%). Тот факт, что указанная зависимость для трех различных случаев описывается одной и той же прямой, может быть обусловлен близостью прочностно-механических свойств мембран тестируемых видов бактерий.

Произведение BX представляет собой концентрацию устойчивых клеток, мембраны которых находятся в состоянии покоя и не затронуты процессами деления, что позволяет этой части популяции выдержать экстремальные воздействия на стадиях переработки микробной суспензии. Это произведение экспоненциально зависит от времени, что позволило по зависимости его логарифма от времени определить удельную

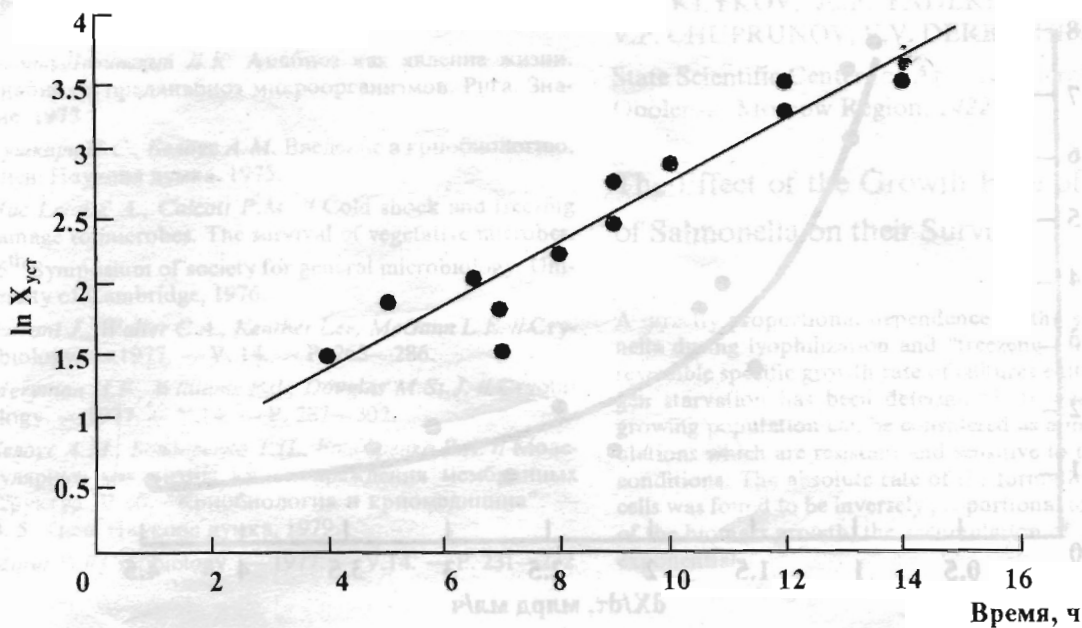


Рис. 1. Определение удельной скорости накопления устойчивых субпопуляций: $A = d \ln X_{уст} / dt = 0,229 \text{ ч}^{-1}$

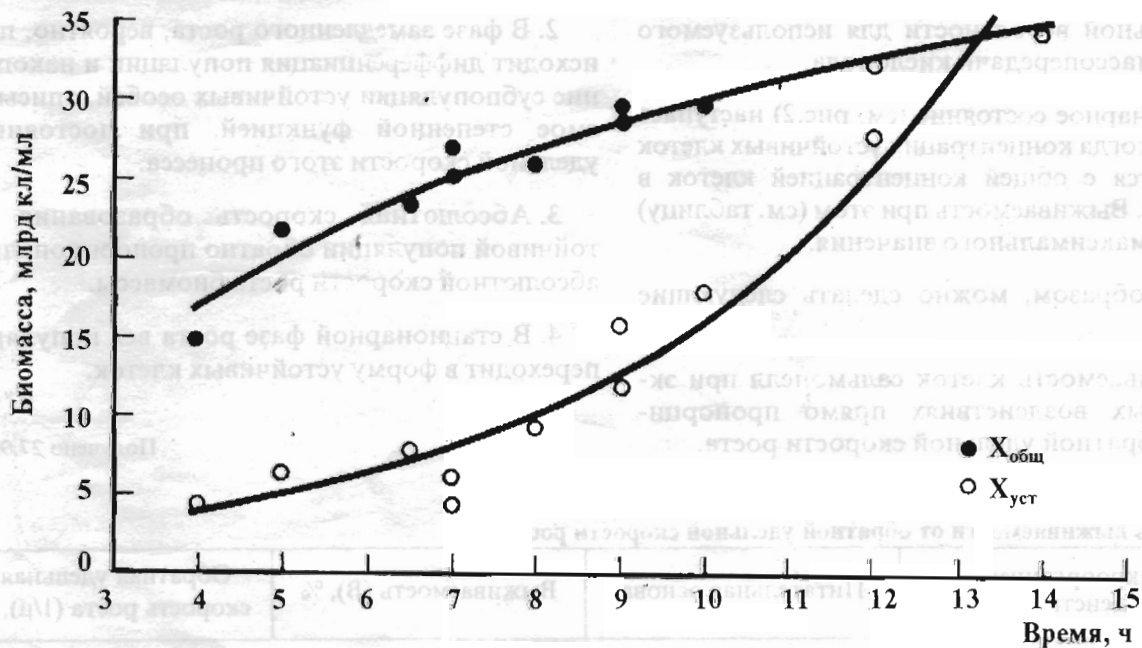


Рис. 2. Динамика накопления общего количества живых клеток $X_{общ}$ и устойчивой субпопуляции $X_{уст}$

скорость образования устойчивых клеток. Удельная скорость роста устойчивых клеток составила для сальмонелл $0,229 \text{ ч}^{-1}$. Значения $X_{уст}$ рассчитывали по уравнению (7), используя данные таблицы; результаты представлены на рис. 2.

Произведение $A X_{уст}$ представляет собой абсолютную скорость прироста устойчивых клеток. На рис.3 представлена зависимость $dX_{уст}/dt$ от абсолютной скорости роста общей биомассы

dX/dt , рассчитанная по результатам, представленным в таблице и на рис. 2, с применением уравнения (2) и (5). Это гиперболическая, то есть обратная зависимость и, следовательно, экспоненциальное уменьшение dX/dt во времени обусловлено экспоненциальным ростом $dX_{уст}/dt$.

Эмпирически установлено, что $(dX_{уст}/dt)(dX/dt) = (5,3 \pm 0,9) 10^{18} \text{ ч}^{-2} \text{ мл}^{-2}$ при 95%-ном уровне

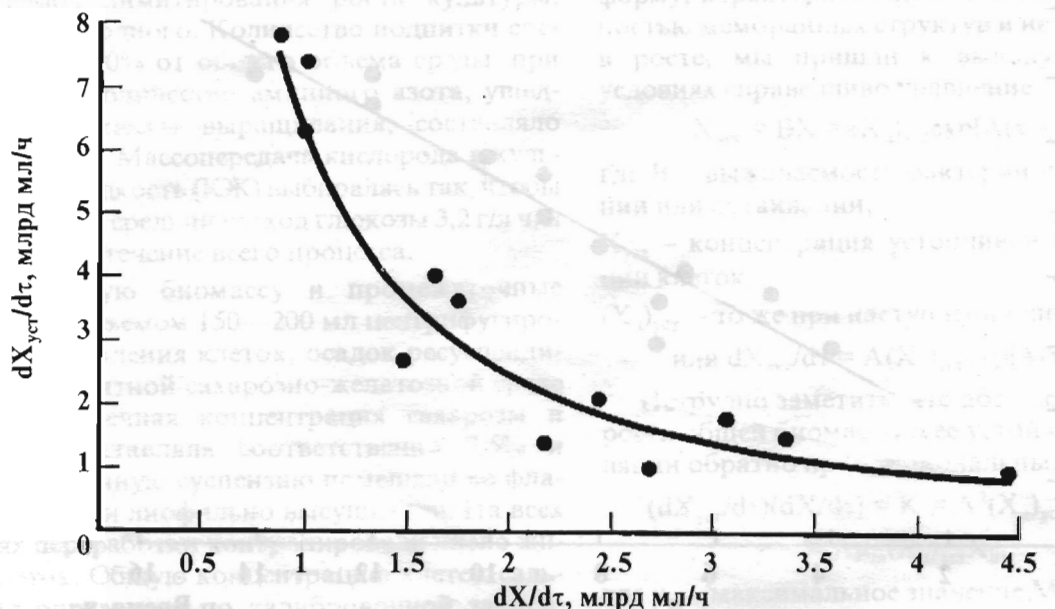


Рис. 3. Абсолютная скорость накопления устойчивой субпопуляции ($dX_{уст}/dt$) в зависимости от абсолютной скорости роста биомассы (dX/dt)

доверительной вероятности для используемого значения массопередачи кислорода.

Стационарное состояние (см. рис.2) наступает в момент, когда концентрация устойчивых клеток сравнивается с общей концентрацией клеток в популяции. Выживаемость при этом (см. таблицу) достигает максимального значения.

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

1. Выживаемость клеток сальмонелл при экстремальных воздействиях прямо пропорциональна обратной удельной скорости роста.

2. В фазе замедленного роста, вероятно, происходит дифференциация популяции и накопление субпопуляции устойчивых особей, описываемое степенной функцией, при постоянной удельной скорости этого процесса.

3. Абсолютная скорость образования устойчивой популяции обратно пропорциональна абсолютной скорости роста биомассы.

4. В стационарной фазе роста вся популяция переходит в форму устойчивых клеток.

Получено 27.09.95

Зависимость выживаемости от обратной удельной скорости роста

Вид микроорганизма, воздействие	Питательная основа	Выживаемость (В), %	Обратная удельная скорость роста ($1/\mu$), ч
<i>Salmonella choleraesuis</i> (замораживание—оттаивание)	Ферментативные гидролизат рыбы	29	3,3
		23	12,5
		40	20,0
		98	40,0
<i>Salmonella dublin</i> (лиофильное высушивание)	Ферментативный гидролизат мяса	34	7,6
		35	10,7
		60	18,0
		100	32,7
<i>Salmonella choleraesuis</i> (лиофильное высушивание)	Ферментативный гидролизат рыбы	30	6,5
		18	9,3
		55	15,1
		85	32,7

ЛИТЕРАТУРА

1. Лозина-Лозинский Л.К. Анабиоз как явление жизни. Анабиоз и преданабиоз микроорганизмов. Рига. Знание, 1973.
2. Пушкарь Н.С., Белоус А.М. Введение в криобиологию, Киев: Наукова думка, 1975.
3. MacLeod P.A., Calcott P.M. // Cold shock and freezing damage to microbes. The survival of vegetative microbes. 26th Symposium of society for general microbiology. University of Cambridge, 1976.
4. Farrant J., Walter C.A., Keather Lee, McGann L.E. // Cryobiology. — 1977. — V. 14. — P. 263—286.
5. Meryman H.F., Williams P.J., Douglas M.St.J. // Cryobiology. — 1977. — V.14. — P. 287—302.
6. Белоус А.М., Бондаренко Т.П., Бондаренко В.А. // Молекулярные механизмы криоповреждения мембранных структур. В сб. "Криобиология и криомедицина". — В. 5. Киев: Наукова думка, 1979.
7. Marur P. // Cryobiology. — 1977. — V.14. — P. 231—272.

S.P. KLYKOV, Ju.P. PADERIN, M.M. SADIKOV,
V.P. CHUPRUNOV, V.V. DERBYSHEV, V.V. GUSEV
State Scientific Center for Applied Microbiology,
Obolensk, Moscow Region, 142279

The Effect of the Growth Rate of the Cultures of Salmonella on their Survival

A directly proportional dependence of the survival of salmonella during lyophilization and "freezing—thawing" test on a reversible specific growth rate of cultures cultivated under oxygen starvation has been determined. It was shown that the growing population can be considered as a mixture of subpopulations which are resistant and sensitive to the environmental conditions. The absolute rate of the formation of the resistant cells was found to be inversely proportional to the absolute rate of the biomass growth, the accumulation of the biomass being exponential.