

МИКРОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

It has been shown that micro-calorimetry makes it possible to analyse as physiological activities as the total amount of micro-organisms in real media. The time of testing is reduced from 3-5 days in method of micro-organisms culturing in agar media to 1-2 hours in micro-calorimetry.

Физиологическая активность микроорганизмов представляет большой интерес для характеристики микробиологических, биотехнологических процессов, а также для биотестирования качества сельскохозяйственного сырья, пищевых продуктов и состояния окружающей среды [1, 2].

Существующие методы оценки физиологической активности клеток плохо приспособлены для анализа их жизнедеятельности в реальных условиях. Методы культивирования микроорганизмов в питательных средах позволяют лишь косвенно судить о физиологическом состоянии клеток, при этом отличаются высокой трудоемкостью и длительностью. Большинство инструментальных методов анализа не всегда можно использовать для характеристики жизнедеятельности клеток в промышленных средах, отличающихся высокой мутностью, вязкостью, сложным составом.

Более перспективно с точки зрения анализа физиологических состояний клеток применение микрокалориметрии. Это связано с тем, что тепловыделение является универсальным свойством всех живых организмов, оно непосредственно связано с физиологической и биохимической активностью клеток и характеризует их жизнеспособность и эффективность использования энергии.

Целью исследований была разработка микрокалориметрического метода анализа физиологической активности микроорганизмов.

Для проведения экспериментов использовали чистые культуры бактерий и дрожжей, полученные из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ. В качестве питательных сред для культивирования микроорганизмов применяли среды: МПА, Эндо, суело-агар, а также основы искусственных питательных сред Tetr, Ридер, Рана [3, 4] с добавлением в качестве источника углерода казеина, глюкозы, касторового масла. Концентрации субстратов варьировали в интервале 10^{-3} – 10^{-5} М. Суточные культуры микроорганизмов, выращенных в исходных средах, переносили в свежую питательную среду, выдерживали в течение 3–4 ч для перевода клеток в логарифмическую стадию роста.

Микрокалориметрические измерения проводили с помощью микрокалориметра МКМ-Ц в соответствии с [2]. Рабочую и контрольную пробы заправляли по 1 мл в кюветы микрокалориметра МКМ-Ц и регистрировали укороченные термограммы роста микроорганизмов в течение 2 ч. Параллельно с микрокалориметрическими измерениями проводили также культивирование микроорганизмов в исходных средах с отбором проб через 20 мин и высевом десятикратных разведений в агаризованные питательные среды для подсчета числа выросших колоний. Общее количество дрожжевых клеток определяли по ГОСТ 10444.12-88 [5], бактерий – по ГОСТ 9225-84 [6] и биокалориметрическим методом по ГОСТ 27930-88 [7]. Измерения выполняли в трехкратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel.

Физиологическая активность клеток с точки зрения обмена веществ измеряется количеством питательных субстратов, потребляемых единицей микробной биомассы за единицу времени, и выражается зависимостью

$$A = a \cdot m + b, \quad (1)$$

где A – физиологическая активность; a – трофический коэффициент, показывающий затраты питательных веществ на образование единицы биомассы; m – удельная константа скорости размножения клеток; b – коэффициент основного обмена, показывающий расход питательных веществ на поддержание жизнедеятельности единицы биомассы за единицу времени. Активность микроорганизмов может также быть отнесена к одной клетке, если измеряется не биомасса, а численность клеток.

Для определенной культуры микроорганизмов при фиксированных внешних условиях и составе питательной среды коэффициенты a и b постоянны, поэтому физиологическая активность клеток линейно связана с их скоростью размножения и метаболической активностью. При интенсивном росте культуры клеток $a \cdot m \gg b$, и их физиологическая активность определяется только удельной константой скорости размножения микроорганизмов. При слабом росте культуры клеток $a \cdot m \ll b$, и их физиологическая активность зависит от скорости основного метаболического обмена микроорганизмов.

Так как различные процессы жизнедеятельности микроорганизмов сопровождаются выделением тепла, то мерой физиологической активности клеток с энергетической точки зрения может являться скорость их тепловыделения, которая отражает как интенсивность протекающих метаболических процессов, так и скорость размножения микроорганизмов.

В основе микрокалориметрии, как и других косвенных инструментальных методов анализа, лежит зависимость величины регистрируемого сигнала от численности (биомассы) микроорганизмов и физиологической активности клеток в анализируемом объекте. В процессе жизнедеятельности микроорганизмы потребляют питательные вещества и выделяют тепло в окружающую среду. Количество выделенного тепла пропорционально содержанию клеток и их физиологической активности. Зарегистрированное значение теплового потока q будет меньше истинного значения f на величину рассеянной тепловой мощности. Согласно основному динамическому уравнению микрокалориметров типа Тиана – Кальве, связь между истинным и регистрируемым тепловыми потоками описывается формулой

$$f(t) = q(t-\tau) + K \cdot \int q(t-\tau) \cdot dt, \quad (2)$$

где K – постоянная величина, характеризующая скорость теплообмена между ячейкой и термоблоком.

Связь между истинным тепловым потоком и концентрацией клеток (N_0) микроорганизмов описывается выражением

$$f(t) = F \cdot N_0 \cdot \exp(m \cdot t) + B \cdot N_0, \quad (3)$$

где F – среднее значение удельной тепловой активности делящихся клеток; B – среднее значение удельной тепловой активности неделящихся клеток; m – удельная константа скорости размножения клеток.

Учитывая то, что скорость изменения тепловыделения микроорганизмов обычно значительно ниже скорости распространения тепловой энергии к тепломеру, из (2) и (3) следует, что регистрируемый тепловой поток микроорганизмов (дифференциальная термограмма) описывается уравнением (4):

$$q(t) = F \cdot N_0 \cdot m \cdot \exp(m \cdot t) / K + q_0. \quad (4)$$

Интегральная термограмма может быть получена из дифференциальной кривой согласно выражению (5):

$$Q(t) = \int q(t) dt. \quad (5)$$

Формула (4) связывает зарегистрированную прибором тепловую мощность с концентрацией клеток в исследуемом образце, параметрами микрокалориметра и характеристиками физиологической активности клеток.

Логарифмируя (4) и пренебрегая q_0 , можно получить выражение

$$\ln q(t) = \ln(F \cdot N_0 \cdot m/K) + m \cdot t, \quad (6)$$

откуда

$$m = \ln(q_2/q_1) / \Delta t. \quad (7)$$

Из (7) может быть также получено выражение (8):

$$m = \ln(Q_2/Q_1) / \Delta t. \quad (8)$$

В формулах (7) и (8) q_2, q_1 – мощности тепловыделения; Q_2, Q_1 – общее количество выделенного тепла в моменты времени t_2 и t_1 ; $\Delta t = t_2 - t_1$.

Для проверки применимости полученных выражений при определении удельной скорости размножения микроорганизмов были изучены укороченные интегральные термограммы клеток *E. coli* в отдельных питательных средах (рис. 1).

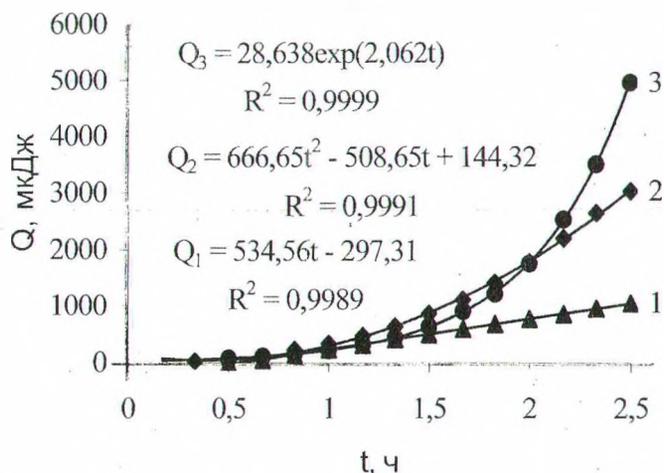


Рис. 1. Укороченные интегральные термограммы клеток *E. coli* при культивировании в питательных средах: 1 – среда Рана с маслом; 2 – среда Ридер с казеином; 3 – среда Эндо. $T = 30^\circ\text{C}$

Как видно из рис. 1, наблюдаются линейная, полиномиальная и экспоненциальная зависимости количества выделенного клетками тепла от времени. В случае линейной зависимости это указывает на то, что скорость тепловыделения постоянна и клетки в данной среде не размножаются, но сохраняют биохимическую активность. В случае полиномиальной и экспоненциальной зависимости наблюдается изменение скорости тепловыделения клеток, которое может быть связано с их размножением. При этом наилучшие условия для размножения клеток отмечаются для среды Эндо, где рост количества выделенного клетками тепла максимален и описывается экспоненциальной зависимостью. Полученные данные указывают на то, что метод микрокалориметрии позволяет быстро подбирать питательные среды для культивирования микроорганизмов.

Для оценки правильности определения ростовой активности клеток результаты микрокалориметрических измерений сравнивали с методами отбора проб при культивировании микроорганизмов и посева разведений в агаризованную питательную среду с последующим расчетом удельной скорости размножения клеток по формуле

$$m = dN/N \cdot dt. \quad (9)$$

Полученные результаты представлены на рис. 2 в логарифмических координатах. Как видно из приведенных данных, наблюдается линейная зависимость изменения логарифма численности клеток и их тепловыделения от времени, а это указывает на то, что клетки находятся в логарифмической стадии роста.

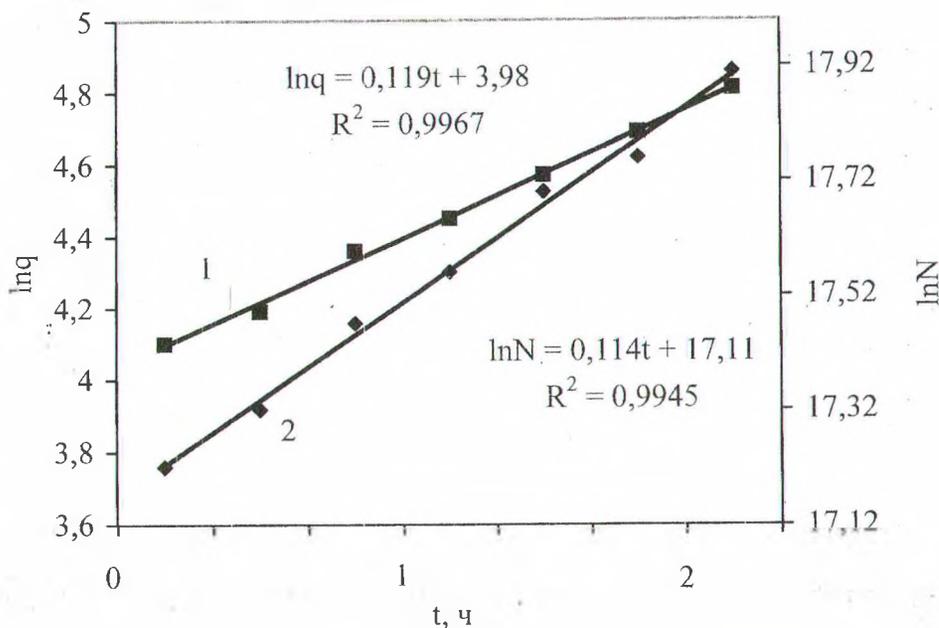


Рис. 2. Анализ удельной скорости размножения микроорганизмов *Lactococcus lactis ssp. lactis* микрокалориметрическим методом (1) и методом посева в питательный агар (2). Основа среды Tetr с добавками казеина. T=30°C

В таблице приведены результаты определения удельной скорости размножения клеток бактерий и дрожжей в отдельных питательных средах по данным микрокалориметрии и метода посева культур в питательный агар.

Таблица

Удельные скорости размножения микроорганизмов на питательных средах. T=30°C

Микроорганизмы	Среды/ Субстраты	Микрокалориметрический метод, $\mu_1, \text{ч}^{-1}$	Метод посева в агар, $\mu_2, \text{ч}^{-1}$
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	Tetr /казеин	0,12±0,02	0,11±0,03
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	Tetr /глюкоза	0,57±0,05	0,50±0,08
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	Tetr /масло	0,19±0,03	0,19±0,04
<i>Sizosaccharomyces pombe</i>	Ридер/глюкоза	0,13±0,02	0,14±0,03
<i>Sizosaccharomyces pombe</i>	Рана/масло	0,09±0,02	0,08±0,02

Как видно из таблицы, результаты измерений хорошо совпадают. Вместе с тем для микрокалориметрического анализа требуется 1–2 ч, тогда как для культивирования микроорганизмов в агаризованных питательных средах на чашках – 3–5 сут.

Таким образом, по термограммам культивируемых клеток можно быстро определять как численность микроорганизмов, так и один из основных кинетических параметров их жизнедеятельности – удельную скорость размножения. При этом значительно сокращается длительность и трудоемкость анализа, а также расход реактивов и вспомогательных материалов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Промышленная микробиология: Учеб. пособие для вузов / З.А. Аркадьева и др. Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Высш. школа, 1989. – 688 с.
2. Игнатенко А.В., Гриц Н.В. Микробиологические, органолептические, визуальные методы контроля качества пищевых товаров. Микрокалориметрия: Лабораторный практикум. – Мн.: БГТУ, 2003. – 114 с.
3. Беясова Н.А., Гриц Н.В. Микробиология. Учебно-методическое пособие. – Мн.: БГТУ, 1999. – 111 с.
4. Солоненко А.А. и др. Практикум по общей микробиологии: Учеб. пособие. – Мн.: Ураджай, 2000. – 280 с.
5. ГОСТ 10444.12-88 Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов.
6. ГОСТ 9225-84. Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа.
7. ГОСТ 27930-88. Молоко и молочные продукты. Биокалориметрический метод определения общего количества бактерий.