

Vplyv zmien teploty v postgerminačnom štádiu na rast a životaschopnosť buniek *Bacillus cereus*

Z. LEŠKOVÁ

V predchádzajúcich prácach [1, 2] sme zistili, že postgerminačný vývoj buniek *Bacillus cereus* vyššia teplota nenarušuje a že vplyv termálneho šoku sa môže skôr uplatniť v štádiu delenia buniek. Jav zvýšenej rezistencie spór v postgerminačnom období alebo aspoň v jeho ranej fáze oproti niektorým nepriaznivým faktorom prostredia [1—6] stimuluje štúdium otázky, či urýchlenie špecializovaných syntéz zvýšením kultivačnej teploty nezcitliví bunky oproti následnému chladovému šoku. V štádiách postgerminácie bunka prechádza z tzv. „sporálnej“ kontroly regulačných mechanizmov do štádia extenzívnej derepresie väčších oblastí genómu ako odpovede na dané médium. Až v ďalšej etape začne cyklické regulácie, typické pre vegetatívne deliace sa bunky [7, 8]. Tieto jednotlivé etapy v citlivom mechanizme bunkových regulácií môžu byť náhlymi posunmi kultivačnej teploty značne dezorganizované.

V tejto práci sme sledovali, do akej miery môžu zmeny kultivačnej teploty poškodiť populáciu *B. cereus* ireverzibilne alebo aspoň narušiť jej proliferáčnú možnosť.

Materiál a metódy

Použili sme kmeň *Bacillus cereus* NCIB 8122 zo zbierky Mikrobiologického ústavu ČSAV. Uchovával sa na mäsopeptónovom agare v chladničke a preočkovával v štvormesačných intervaloch.

Príprava zásobnej suspenzie spór. Na prípravu inokula, t. j. voľných spór, sme použili bakteopeptónové médium, pre ktoré bol do zásoby pripravený koncentrovaný roztok obsahujúci 17,0 g primárneho fosforečnanu draselného a 15,0 g bakteopeptónu v 1 litri destilovanej vody, pH bolo upravené hydroxidom sodným na 7,2. Roztok sa sterilizoval 30 minút pri 0,12 MPa a potom uchovával v chladničke. Vlastné bakteopeptónové médium sme čerstvo pripravovali nariadením tohto koncentrovaného roztoku v pomere 1 : 4 sterilnou destilovanou vodou a filtráciou cez filtračný papier Schleicher a Schuell č. 589. Do číreho roztoku sme pridali 1 g glukózy, chlorid vápenatý v konečnej kon-

centracii $5 \cdot 10^{-4}$ M a 1 ml koncentrovanej zmesi iónov tohto zloženia: 17,4 g K_2SO_4 , 12,3 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,22 g $MnSO_4 \cdot 7 H_2O$, 2,0 g $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$, 1,44 g $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ v 1 litri destilovanej vody [9, 10]. Opäť sme prekontrolovali pH, živné médium rozdelili do kultivačných baniek a druhýkrát sterilizovali 30 minút pri 0,09 MPa. Potom sme ho zaočkovali zásobnou suspenziou spór aktivovanou tepelným šokom ($65^\circ C/15$ min). Pri kultivácii na reciproke trepačke pri $30^\circ C$ dochádzalo pri začiatkovej koncentrácii inokula 10^8 spór/ml ku skončeniu rastu po 7. hodine kultivácie, k sporulácii okolo 10. hodiny. Nasledujúca lýza sporangii a uvoľnenie spór z buniek prebiehali medzi 24—72. hodinou ďalšej kultivácie. Do baniek sme pridali Tween 80 do konečnej koncentracie 0,01 %, po dvoch hodinách státia sme suspenziu sterilne centrifugovali a trikrát premyli sterilnou destilovanou vodou. Zásobnú suspenziu spór sme uchovávali pri $5^\circ C$ v destilovanej vode. Pred použitím sme nariadenú suspenziu spór aktivovali teplotou $65^\circ C/15$ min. Väčšinou sme inokulovali médiá do konečnej koncentracie $1—2,5 \cdot 10^8$ spór/ml.

Kultivácia baktérií. Kultúry sme inkubovali na recipročných trepačkách v termostatoch a v chladenej komore. Počet kyvov i amplitúda boli pri všetkých trepačkách nastavené rovnako, aby sa dosiahlo maximálne prevzdušnenie kultúry. Vo väčšine prípadov sme kultivovali v 500 ml guľatých bunkách s 50 ml média. V prípadoch, kde sme stanovovali optickú hustotu kultúry, kultivovali sme baktérie v 500 ml bankách s pritavenou kolorimetrickou kyvetou. Inkubáciu v tekutých médiách sme robili pri teplotách 5, 30 a $45^\circ C$, na pevných pôdach pri teplote $30^\circ C$. Zloženie tekutého média: 3 g baktipeptónu, 0,5 g primárneho fosforečnanu draselného, 1 g glukózy a 1 ml koncentrovanej zmesi iónov uvedeného zloženia na 1 liter, konečné pH 7,2.

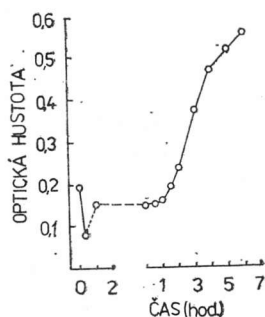
Detekcia buniek prežívajúcich inaktivačné zásahy. Životaschopnosť buniek sme stanovovali na Petriho miskách na pevných pôdach takto: odobraté suspenzie buniek sme riedili v predhriatom M/45 fosfátovom pufré o pH 7,2 s 0,01 % obsahom Tweenu do niekoľkých riedení. Z riedení pripadajúcich do úvahy pre počítanie kolónií sme na povrch agaru pipetovali 0,1 ml suspenzie a rozotreli sklenenou hokejkou. Používali sme buď predsušený buď čerstvý agar, pri ktorom sme dosušovali rozotretú suspenziu v mierne pootvorených miskách v termostatoch pri $37^\circ C$. Po 20 min sme misky uzavreli a inkubovali ďalej pri $30^\circ C$ 24 hodín. Pevné médium na detekciu prežívania buniek: Difco Nutrient Agar, pH 6,8, sterilizácia 20 min pri 0,12 MPa.

Detekcia klíčenia spór a sledovanie postgerminálneho vývoja. Klíčenie a postgerminálny vývoj sme testovali v tekutých médiách Langeho kolorimetrom (NDR) pri 700 nm. Pribeh klíčenia a postgerminálny vývoj sme kontrolovali aj priamym pozorovaním v mikroskope s fázovým kontrastom.

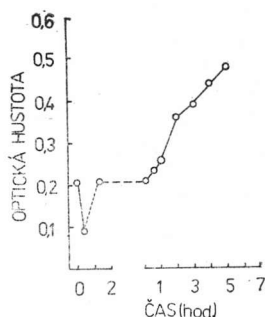
Výsledky a diskusia

V predchádzajúcej práci sme zistili [2], že najvhodnejšou teplotu pre krátkodobé urýchľovanie postgerminálneho vývoja pred chladovým šokom, pri ktorej ešte nedochádza k poškodeniu bunky, je teplota $45^\circ C$. Preto sme v našich pokusoch vývoj kultúry po vyklíčení ($30^\circ C/15$ min) urýchlili na určitý čas zvýšením kultivačnej teploty na $45^\circ C$. Dĺžka kultivácie v chlade pri $5^\circ C$

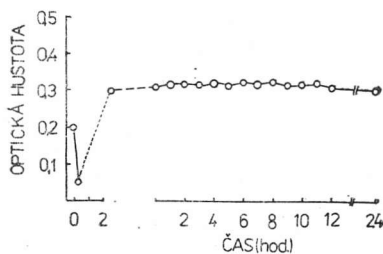
bola 21,5 hodín. Potom sme kultúru opäť priniesli do teploty 30 °C a ďalej kultivovali. Kultúra mala teda možnosť rastu v médiu, do ktorého vyklíčila. Ďalší vývoj sme pozorovali meraním optickej hustoty kultúry a priamym pozorovaním morfológického stavu buniek. Výsledky týchto pokusov uvádzajú obr. 1—3. Ukazujú, že krátkodobé urýchlenie vývoja buniek vyššou teplotou v postgermináčnom období nevedlo k ich zeitliveniu oproti nasledujúcemu chladovému šoku (obr. 1, 2). Pri kultúrach, ktorých vývoj bol zrýchlený až do štádia prvého delenia (obr. 3), bolo už možné pozorovať zastavenie rastu pri konečnej detekčnej kultivácii v rovnakom médiu. Predpokladali sme, že pri pôsobení dlhšieho intervalu zvýšenej kultivačnej teploty došlo k rýchlemu vyčerpaniu živín najmä glukózy z média a že nemožno už pokladať pôvodné kultivačné médium za celkom vhodné na detekciu prežívania buniek v kultúre.



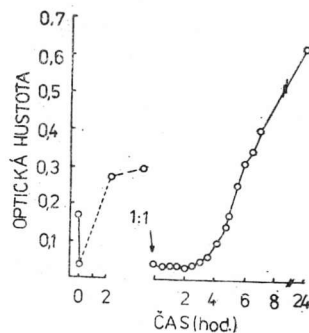
Obr. 1. Vplyv chladového šoku (5 °C, 21,5 hod.) na bunky, ktorých postgerminálny vývoj bol medzi 15. až 60. minútou inkubácie urýchlený vyššou teplotou (45 °C). Interval pri vyššej teplote znázorňujú kratšie čiarky, chladový interval je označený dlhšími čiarkami. Kultiváciu pri teplote 30 °C znázorňuje plná čiara.



Obr. 2. Vplyv chladového šoku (5 °C, 21,5 hod.) na bunky, ktorých postgerminálny vývoj bol medzi 15. až 75. minútou inkubácie urýchlený vyššou teplotou (45 °C). Spôsob označenia teplotných intervalov ako na obr. 1.

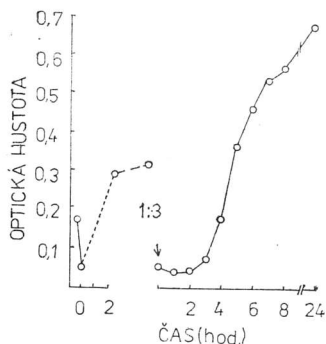


Obr. 3. Vplyv urýchlenia vývoja buniek vyššou teplotou a chladového šoku na schopnosť ďalšieho vývoja kultúry. Spóry vyklíčili pri 30 °C. Medzi 15. a 135. minútou boli kultivované pri 45 °C. Potom boli inkubované 21,5 hod. pri 5 °C a znova prenesené do teploty 30 °C. Spôsob označenia teplotných intervalov ako na obr. 1.

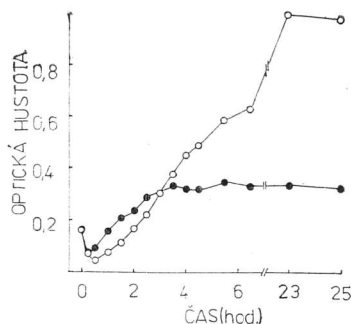


Obr. 4. Vplyv zrýchlenia vývoja buniek vyššou teplotou a chladového šoku na ďalší vývoj kultúry. Zmeny teploty kultivácie: 0. až 15. minúta 30 °C, 15. až 135. minúta 45 °C, ďalej kultivácia pri 5 °C 21,5 hod. Po chladovom šoku sa kultúry riedili čerstvým baktepeptónovým médiom v pomere 1 : 1 a inkubovali ďalej pri 30 °C. Spôsob označenia teplotných intervalov ako na obr. 1.

Preto sme živné médium po chladovom šoku riedili v pomere 1 : 1 alebo 1 : 3 čerstvým bakteopeptónovým médiom. Z výsledkov uvedených na obr. 4 a 5 vidieť, že i pri čiastočnej výmene média za čerstvé došlo asi po dvojhodinovom lagu k začiatku delenia. Potom sme v ďalších pokusoch zvýšili obsah glukózy v médiu na 1 %. Výsledky na obr. 6 ukazujú, že kým pri optimálnej teplote (30 °C) rast kultúry v tomto médiu dosiahol hodnotu optickej hustoty nad



Obr. 5. Uskutočnenie pokusu rovnaké ako pri pokuse na obr. 4. Po chladovom šoku sa však kultúra riedila v pomere 1 : 3 čerstvým bakteopeptónovým médiom.



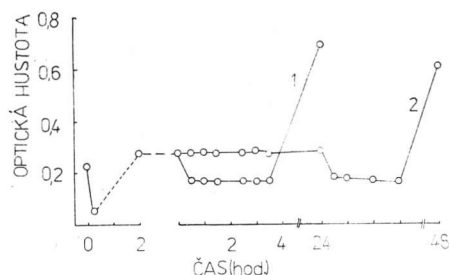
Obr. 6. Rast kultúry v médiu s 1 % obsahom glukózy. ○ rast kultúry pri 30 °C; ● rast kultúry po vyklíčení (30 °C / 15 min) urýchlenný teplotou 45 °C.

1,0, pri kultúre, ktorá bola narušená zmenami teploty, iba okolo 0,3. Táto hodnota optickej hustoty je totožná s hodnotou, ktorú sme namerali za podobných rastových podmienok v médiu s 0,1 % obsahom glukózy.

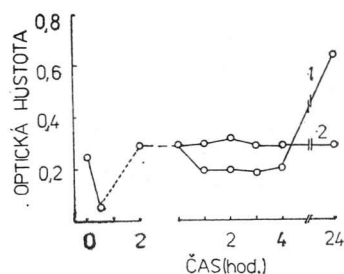
V ďalších pokusoch sme sledovali vplyv octanu sodného [11] v 0,1 M koncentrácii na bunky, ktoré boli vystavené účinku teplotných zmien. Octan sodný sme pridali ku kultúre jednak ihneď po prenesení média z teploty 5 °C do teploty 30 °C, jednak po 24-hodinovej inkubácii pri 30 °C. Výsledky týchto pokusov sú na obr. 7. Ukazujú, že v oboch prípadoch nastal najprv pokles optickej hustoty, bunky stmavli a po dlhšom lagu opäť obnovili svoj rast a vysporulovali. Obdobné výsledky sme dostali aj v tom prípade, keď sme miesto octanu sodného pridali do média roztok 20 % hydroxidu sodného v takom množstve, že sa pôvodne nízke pH média upravilo na pH 7,5 (obr. 8).

Z výsledkov uvedených pokusov je zrejmé, že hlavnou príčinou zastavenia rastu bakteriálnej kultúry pri pomerne nízkej optickej hustote nie je vyčerpanie glukózy z média. Vo všetkých prípadoch, či už išlo o riedenie živného média čerstvým bakteopeptónovým médiom alebo o pridanie 0,1 M octanu sodného, alebo hydroxidu sodného, došlo k zmene koncentrácie vodíkových iónov v médiu. Pôvodne nízke pH sa zvýšilo a kultúra bola opäť schopná obnoviť svoj rast a vysporulovať.

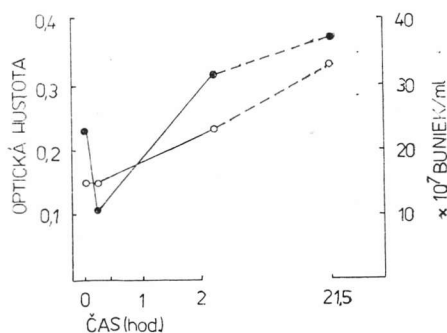
Vzhľadom na to, že sme sa pri použití termálnych šokov stretli s javom zastavenia rastu a vývoja kultúry, pokladali sme za vhodné určiť, ako sa ním ovplyvní životaschopnosť buniek. Platňovou metódou na pevnom médiu sme stanovili počet prežívajúcich buniek po teplotných šokoch. Výsledky sú na obr. 9 a 10. Z nich vidieť, že kým sám chladový šok má na bunky skôr ochranný vplyv, v kombinácii s predchádzajúcim zvýšením kultivačnej teploty na 45 °C



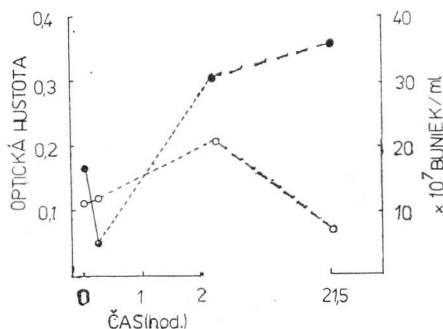
Obr. 7. Vplyv octanu sodného v 0,1 M koncentrácii na ďalší vývoj kultúry po teplotných zásahoch. Spóry vyklíčili pri 30 °C. Medzi 15. až 135. minútou boli kultivované pri 45 °C. Potom boli inkubované 21,5 hod. pri 5 °C a znova prenesené do teploty 30 °C. Octan sodný sa pridal ku kultúre jednak ihneď po prenesení do teploty 30 °C [1], jednak po 24 hod. [2]. Spôsob označenia teplotných intervalov ako na obr. 1.



Obr. 8. Vplyv hydroxidu sodného na ďalší vývoj kultúry po teplotných zásahoch. Usporiadanie pokusu ako na obr. 7.



Obr. 9. Vplyv nízkej teploty (5 °C) na ďalší vývoj kultúry. Kultúra po 135. minútu inkubovaná pri 30 °C, potom kultivovaná pri 5 °C 21,5 hod. ● optická hustota; ○ počet prežívajúcich buniek.



Obr. 10. Vplyv teplotných zmien na ďalší vývoj kultúry. Usporiadanie pokusu ako na obr. 3. ● optická hustota; ○ počet prežívajúcich buniek.

sa podstatne zníži počet prežívajúcich buniek. Pri dnešnom rozvoji mnohých technologických postupov v potravinárskom priemysle, ktoré aspoň sčasti redukujú počet nežiadúcich mikrobiálnych kontaminantov, môže mať tento kombinovaný postup isté perspektívy.

Súhrn

Sledovala sa možnosť znížiť životaschopnosť vyklíčených spór *Bacillus cereus* kombináciou teplotných zásahov, ktoré samy osebe nemajú sterilizačný účinok. Zistilo sa, že po urýchlčení postgerminálneho vývoja kultúry vyššou kultivačnou teplotou (45 °C) nasledujúci chladový šok (teplota 5 °C za 21,5 hod.) zastavuje rast buniek iba vtedy, ak akcelerácia vývoja prebieha až do

prvých delení buniek. Podstatne sa pritom zredukuje počet životaschopných buniek. Hlavnou príčinou zastavenia rastu bakteriálnej kultúry po teplotných šokoch nie je vyčerpanie glukózy z média. Kultúra je schopná obnoviť svoj rast a vysporulovať po znížení koncentrácie vodíkových iónov v médiu.

Literatúra

1. ŠTASTNÁ, J. — VINTER, V. — BABIČKA, J. — LEŠKOVÁ, Z.: Bulletin VÚP, SPA, 12, 1973, č. 2, s. 21.
2. ŠTASTNÁ, J. — VINTER, V. — BABIČKA, J. — LEŠKOVÁ, Z.: Bulletin VÚP, SPA, 13, 1974, č. 4, s. 12.
3. DEMAİN, A. L. — NEWKIRK, J. F.: J. Bacteriol., 79, 1960, s. 783.
4. RIEMAN, H.: J. appl. Bact., 20, 1957, s. 404.
5. VINTER, V.: Fol. microbiol., 10, 1965, s. 288.
6. VINTER, V.: In: L. L. Campbell a H. O. Halvorson (Eds), Spores III, s. 25, Amer. Soc. Microbiol., 1965.
7. TORRIANI, A. — LEVINTHAL, C.: J. Bact., 94, 1967, s. 176.
8. TORRIANI, A. — GARRICK, L. — SILBERSTEIN, Z.: In: L. L. Campbell (Eds), Spores IV, s. 247. Amer. Soc. Microbiol., 1969.
9. VINTER, V.: Fol. microbiol., 2, 1956, s. 216.
10. VINTER, V. — ŠTASTNÁ, J.: Fol. microbiol., 12, 1967, s. 301.
11. MACRAE, R. M. — WILKINSON, J. F.: J. gen. Microbiol., 19, 1958, s. 210.

Лешкова, З.

Влияние температурных изменений в постгерминационный период на рост и жизнеспособность клеток

Выводы

Исследовались возможности понижения жизнеспособности проросших спор *Bacillus cereus* комбинацией температурных вмешательств, не имеющих сами по себе стерилизационного действия. Установлено, что после ускорения постгерминационного развития культуры с помощью более высокой температуры культивации (45 °C) последующий холодный шок (температура 5 °C на протяжении 21,5 Час) прекращает рост клеток лишь в том случае, если акцелерация развития протекает вплоть до первых делений клеток. Существенно при этом настанет понижение количества жизнеспособных клеток. Основной причиной прекращения роста бактериальной культуры после температурных шоков не является расходование глюкозы из среды. Культура способна возобновить свой рост и прорасти после понижения концентрации водородных ионов в среде.

Lešková Z.

The influence of temperature changes in postgerminating phase upon growth and vitality of *Bacillus cereus* cells

Summary

The possibilities to bring down vitality of germinated spores *Bacillus cereus* through combination of temperature interferences, which of one's own have not the sterilization effect, were followed. It was found out, that after acceleration of postgerminating culture evolution through higher cultivating temperature (45 °C) the subsequent cooling shock (temperature 5 °C for 21,5 hours) is stopping growth of cells only then, when acceleration of evolution is passing till to first cells divisions. The amount of vital cells is at the same time essentially reduced. Principal cause of growth stop of bacterial culture after temperature shocks is not glucose exhaustion from medium. The culture is able to restore its growth and sporulate after concentration reducing of hydrogen ions in medium.