

УДК 541.18.041.2:661.185

Р. И. Юсупова, А. И. Курмаева, М. В. Потапова,
Е. М. Кулагина, В. П. Барабанов

СУСПЕНЗИЯ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ КАК КОЛЛОИДНАЯ СИСТЕМА

Часть 1. Суспензия микроорганизмов – микрогетерогенная система

Ключевые слова: биосуспензия, микроорганизмы, клетки дрожжей, культуральная жидкость, дисперсная система, агрегативная устойчивость, клеточная поверхность.

Исследованы факторы, влияющие на агрегативную и седиментационную устойчивость суспензии дрожжей: концентрация клеток, природа и рН среды.

Keywords: bio-suspension, microorganism, cells of yeast, cultural liquid, dispersion system, aggregative stability, cell surface.

The factors influencing the aggregative and sedimentation stability of the suspension of yeast: cell concentration, the nature and pH.

Систему, состоящую из клеток микроорганизмов, находящихся в жидкости, можно рассматривать как коллоидную дисперсную систему. Дисперсные системы (дисперсии) это микрогетерогенные образования, в которых одно мелкоизмельченное вещество – дисперсная фаза – равномерно распределено в другой фазе – дисперсионной среде. Клетки микроорганизмов будут являться дисперсной фазой, а дисперсионной средой будет культуральная жидкость, в которой они развиваются. Такую систему можно отнести к суспензиям. Суспензией называют седиментационно-неустойчивые системы с твердой дисперсной фазой и жидкой дисперсионной средой [1]. Клетки микроорганизмов являются специфической дисперсной фазой и в данном случае наиболее приемлем термин «биосуспензия», подчеркивающий биологическую природу коллоидных суспензий, бактерий и дрожжей и др.

Микробная суспензия характеризуется следующими параметрами: дисперсностью, наличием хорошо развитой межфазной поверхности, числом клеток, весом биомассы. Так, у бактериальных суспензий велика удельная поверхность, равная отношению межфазной поверхности к объему дисперсной фазы. Это приводит к интенсивному обмену веществ с окружающей средой и обуславливает высокую степень метаболизма, свойственную микроорганизмам [2,3].

В соответствии с составом и строением биосуспензии можно классифицировать как лиофильные коллоидные системы, однако, при перенесении представлений коллоидной химии небологических систем на биологические системы необходима особая осторожность. Следует учитывать, что это живые системы. Для них, в отличие от лиофобных систем, характерно сильное межмолекулярное взаимодействие вещества дисперсной фазы с дисперсионной средой. Такое взаимодействие приводит к образованию гидратных оболочек из молекул дисперсионной среды вокруг частиц дисперсной фазы.

Клетки микроорганизмов в биосуспензиях могут находиться как в свободно дисперсном состоянии, так и, формируя агрегаты, размеры которых на несколько порядков превышают размеры единичных кле-

ток. В связи с этим биосуспензии характеризуются различной агрегативной и седиментационной устойчивостью. Значительные различия в размерах, электрофоретических характеристиках, подвижности клеток определяют их коллоидно-химические характеристики. Некоторые из них обладают «склонностью» к агрегированию, другие очень устойчивы при относительно одинаковых условиях среды [4].

При изучении биосуспензий всегда возникал и возникает вопрос их агрегативной устойчивости.[4-6]. Рассмотрим влияние различных факторов на агрегативную устойчивость биосуспензий микроорганизмов.

При агрегации клеток определяющими являются их заряд и наличие гидратных оболочек. Эти характеристики, в свою очередь, определяются целым рядом параметров, зависящих как от состава и структуры поверхности, так и от состава и свойств среды.

Обнаружено [7,8], что наличие полисахарида маннана на клеточной поверхности оказывает непосредственное влияние на агрегацию микробных клеток. Этот вывод был подтвержден следующими экспериментами: во-первых, обработкой ферментами с поверхности почти полностью удаляли маннан, что приводило к прекращению агрегации; во-вторых, проводили ингибирование синтеза маннана, например циклогексаимидом, что влияло на способность клеток образовывать агрегаты. В то же время имеются сведения об ингибирующей роли маннана в явлении агрегации. Таким образом, этот вопрос еще нуждается в более тонком исследовании, так как сам маннан в клеточной стенке микробной клетки находится в комплексе с белком, что затрудняет исследование.

Другим полисахаридом, входящим в состав поверхности бактериальных клеток, является глюкан, который, как и маннан, имеет сильно разветвленную структуру и состоит из глюкозных остатков, связанных главным образом β -1,3-глюкозидными связями, наряду с которыми имеются β -1,2 и β -1,6 связи. Роль глюкана в явлении агрегации клеток

также подвергается тщательному изучению. Агрегация микробных клеток вызывается изменением пространственной структуры глюкана. Белок, находящийся на поверхности микробных клеток в виде комплексов с маннаном и глюканом, также рассматривался в связи с агрегативной устойчивостью бактериальных суспензий. Необходимым условием агрегации является низкое содержание полисахаридов по отношению к белковой фракции на поверхности клеток.

По мнению авторов [9], агрегация тесно связана с водным режимом клетки, т.е. состоянием водного слоя, окружающего клетку, а также свободной и связанной внутриклеточной водой. В среде с усвояемыми веществами, проникающими внутрь клетки, внешнее и внутреннее состояние воды нарушается мало. В среде с депрессивными (водоотнимающими) веществами водный режим клетки, ее внешний окружающий слой претерпевают существенные изменения вследствие сольватной ориентации большей части молекул воды вокруг не проходящих в клетки водоотнимающих веществ. К водоотнимающим веществам, как отмечают исследователи, относится этиловый спирт. В таком окружении микробные клетки теряют в первую очередь ориентированную вокруг них гидратную оболочку. В результате этого уменьшается ионная сфера вокруг клеток, и, следовательно, их заряд. Таким образом, создаются условия, при которых силы притяжения начинают преобладать над силами отталкивания, т.е. первая стадия агрегации. На второй стадии этого процесса оболочка клетки под давлением среды уплотняется и утолщается за счет плотной упаковки молекул воды. При сближении клеток своими стенками, состоящими в основном из полисахаридов, богатых гидрофильными группировками, происходит дополнительное уплотнение воды. Под непосредственным влиянием этих группировок молекулы воды ориентируются в более плотные упаковки и становятся менее подвижными, чем в жидкости. Таким образом, под действием депрессивных веществ среды микробные клетки теряют сольватную оболочку при одновременном уплотнении и связывании внутриклеточной воды. Вследствие этого понижается их поверхностный заряд и клетки сближаются и агрегируют.

Благодаря наличию полисахаридов, богатых гидрофильными группами, клетки имеют лиофилизированную поверхность и вокруг них формируются гидратные оболочки, которые наряду с наличием клеточного заряда обеспечивают агрегативную устойчивость биосуспензии.

Экспериментальная часть

В работе использовались дрожжи рода *Saccharomyces cerevisiae*, штамм Y-355. Штамм не патогенен. Для выращивания оптимальными условиями является раствор дрожжевого экстракта с температурой 30°C, содержащий пептон и глюкозу. *Saccharomyces cerevisiae* и некоторые родственные им виды (например, *Saccharomyces uvarum* и *Saccharomyces carlsbergensis*) – вид одноклеточных микроскопических (5–10 микрон в диаметре) грибов из рода сахаромисцев.

При исследовании устойчивости дрожжевых суспензий в модельных системах (в воде, в цитратно-фосфатном буфере, в 0,85% NaCl) проведено сопостав-

ление их состояние с устойчивостью в культуральной жидкости. Для этого по аналогии с дисперсными системами принято контролировать изменение мутности или оптической плотности изучаемой системы [10]. На рисунке 1 представлены кинетические зависимости мутности системы «клетки – культуральная жидкость» при различной концентрации клеток. Для исходной суспензии (кр.1) существенного изменения мутности не происходило в течение ~ четырех часов, т.е. система за это время остается свободnodисперсной и седиментационно-устойчивой. Проведенные микроскопические исследования состояния клеток в системе подтверждали этот вывод. По прошествии четырех часов наступает седиментация клеток. Подобным образом ведут себя и более разбавленные системы (кривые 2, 3). При дальнейшем разбавлении (кривые 4, 5, 6) система становится устойчивой и за время опыта седиментация практически отсутствует.

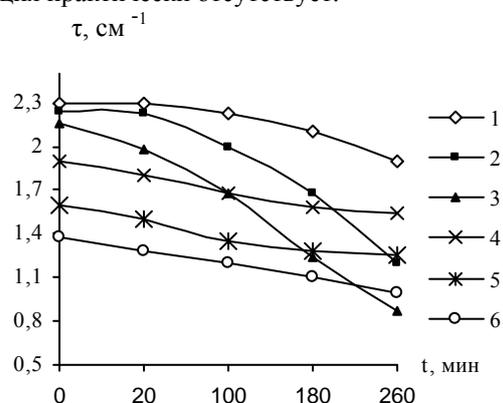


Рис. 1 – Кинетические зависимости мутности системы «клетки – культуральная жидкость» при различных концентрациях клеток: 1 – $4.6 \cdot 10^5$ кл/мл; 2 – $9.2 \cdot 10^4$ кл/мл; 3 – $4.6 \cdot 10^4$ кл/мл; 4 – $2.3 \cdot 10^4$ кл/мл; 5 – $1.15 \cdot 10^4$ кл/мл; 6 – $4.6 \cdot 10^3$ кл/мл

Аналогичный характер кинетических зависимостей изменения мутности получили для систем «клетки – вода» и «клетки – цитратно-фосфатный буфер».

Исследовалось влияние pH на устойчивость систем «клетки – среда». Из рисунка 2 видно, что потеря устойчивости в системе «клетки – культуральная жидкость» наступает при $\text{pH} > 6.0$ (кривая 4). Возрастание оптической плотности (мутности) свидетельствует об агрегации частиц, что позволяет следить за развитием процесса в системе до седиментации частиц. Судя по характеру изменения мутности системы, агрегация протекает в две стадии, разделенные промежуточным индукционным периодом, в течение которого оптическая плотность практически не меняется, т.е. не происходит изменений в размерах агрегатов, образовавшихся на первой стадии. После индукционного периода наступает седиментация клеток. Следует отметить, что при более высоких значениях pH происходит более интенсивная агрегация клеток на первой стадии (кривая 2,3), и индукционный период становится продолжительнее. Индукционный период, в течение которого отсутствуют изменения в состоянии агре-

готов, обусловлен неэлектростатическим фактором агрегативной устойчивости.

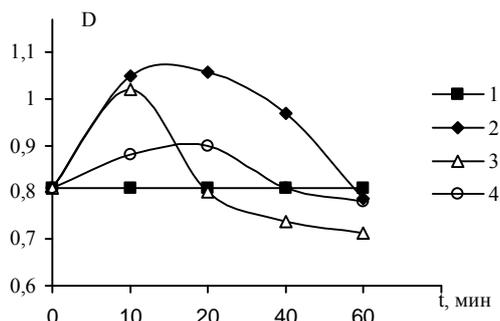


Рис. 2 – Изменение оптической плотности системы «клетки – культуральная жидкость» при различных pH: 1 – 6; 2 – 9.0; 3 – 8.0; 4 – 7.0

Учитывая то обстоятельство, что потеря устойчивости систем «клетки – культуральная жидкость» происходит в щелочном диапазоне pH, можно предположить, что, электрокинетический потенциал клеток, несущий отрицательный заряд, в этой области pH не снижается, так как диссоциация основных аминокислот затруднена, а кислотных карбоксильных групп клеточной поверхности, напротив, облегчена [11]. Это может быть обусловлено следующими обстоятельствами – как было установлено, в щелочной области pH происходит фазовое разделение культуральной жидкости, из которой удалены клетки. Данный процесс объясняется потерей растворимости, т.е. «высаливанием» компонентов белковой природы, а также различных солей (фосфатов, карбонатов). Таким образом, при дестабилизации биосуспензий - первая стадия связана с «высаливанием» нерастворимых компонентов культуральной жидкости при изменении pH в адсорбционных слоях на поверхности клеток, что приводит к снижению электрокинетического потенциала клеток и их агрегации. Индукционный период может быть связан с уплотнением адсорбционных слоев и гидрофобизацией, после чего наступает седиментация.

Для исключения воздействия компонентов культуральной среды на процесс агрегации провели изучение устойчивости системы «клетки – вода».

На рисунке 3 приведены кинетические кривые оптической плотности систем «клетки – вода» во времени при различных значениях pH. Дестабилизация систем происходила в кислой области pH (кривые 3-5). В этой области потенциал клеток снижается благодаря диссоциации аминокислот (нейтрализация), что ведет к потере устойчивости. При этом индукционный период скрытых изменений предшествует началу агрегации. В щелочном диапазоне pH система остается устойчивой (кривые 1,2), что является подтверждением механизма дестабилизации. В других модельных системах (система – 0,85% NaCl; система – буфер цитратно-фосфатный) потеря устойчивости наблюдалась также в кислой области pH и также сопровождалась седиментацией клеток.

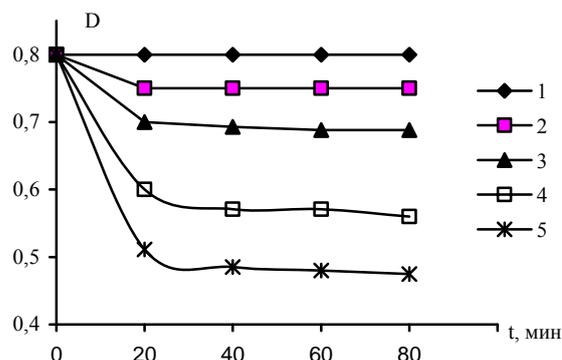


Рис. 3 – Изменение оптической плотности системы «клетки – вода» при различных pH: 1 – 7-9; 2 – 6.0; 3 – 5.0; 4 – 4.0; 5 – 3.0

Установлено влияние состава среды на устойчивость биосуспензий. Показано, что в системе «клетки – культуральная жидкость» при pH > 6.0 происходит разделение клеточных суспензий в две стадии: агрегация (с индукционным периодом) и седиментация.

Литература

1. Сумм, Б.Н. Основы коллоидной химии / Б.Н. Сумм. – М.: Изд. центр «Академия», 2005. – 248 с.
2. Гусев, М.В. Микробиология: Учебник для вузов. - 4-е изд., – М.: Академия, 2007. – 464 с.
3. Бабьева, И.П. Биология дрожжей / И.П. Бабьева, И.Ю. Чернов. М.: МГУ. –1992. – 96 с.
4. Шкоп, Я.Я. Агрегация клеток микроорганизмов в процессе разделения микробных суспензий / Я.Я. Шкоп, Н.В. Фомченко. – М.: ОНТИТЭИ микробиопром, 1981. – 56 с.
5. Кулагина Е.М. Интенсификация фазового разделения в биологической системе под действием ПАВ / Е.М. Кулагина [и др.]. // Вестник Казанского технологического университета. – 2011. – №6. С. 225-228.
6. Юсупова, Р.И. Влияние порядка ввода полимерных агентов – флокулянтов на биосуспезию / Р.И. Юсупова [и др.]. // Вестник Казанского технологического университета. – 2010. – №1. – С. 244-249.
7. Archibald, A.R., Hancock I.C., Harwood C.R. In: Cell wall structure, synthesis, and turnover / A.L. Sonenshein, J.A. Hoch, and R. Losick eds., American Society for Microbiology, Washington, D.C. – 1993. – P. 381 – 410.
8. Selmann, G., Holst, O. In: The Bacterial Cell Wall / Hardcover, eds, Springer-Verlag, New York, Incorporated. 2002.
9. Калюжный, Г.Я. Полисахариды дрожжей. / Г.Я. Калюжный, Г.М. Петрушко // сб. трудов ВНИИ гидролиза растительных материалов. – 1971. - № 21. – С.110 – 127.
10. Курмаева, А.И. Агрегация клеток дрожжевой суспензии под действием полиэлектролитов в различных средах / А.И. Курмаева, Р.И. Юсупова [и др.]. // Коллоидный журнал. – 1991. – Т. 53. – № 5. – С.866-873.
11. Тажибаева, С.М. Поверхностные свойства дрожжевых клеток / С.М. Тажибаева [и др.]. // Коллоидный журнал. – 2003. – Т. 65. – № 1. – С.132-135.