Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»
==========

УДК 579.67

Двухфазный рост бактерий при использовании растительного масла в качестве единственного субстрата

Овсянкина С.В., Хижняк С.В., Аболенцева П.А., Олейникова Е.Н.

Красноярский государственный аграрный университет

Аннотация

Изучен рост четырёх выделенных из образцов растительного масла штаммов бактерий (Мр-2 Bacillus pumilus, Мр-4 Bacillus atrophaeus, Мр-6 Sphingomonas aurantiaca и Мр-7 Microbacterium oxydans) в растительном масле при +7 °С. Объектом для сравнения использовали ранее выделенный почвенный штамм Mn5 Rhodococcus erythropolis, способный использовать растительное масло в качестве единственного субстрата. Все штаммы продемонстрировали способность к росту в растительном масле с минимальным временем генерации от 3,5 час (штамм Мр-2 Bacillus pumilus) до 14,9 час (штамм Мр-4 Bacillus atropheus). В большинстве случаев кривые численности бактерий имели два пика, то есть соответствовали двухфазному росту. Предложены две модели, объясняющие наблюдаемые кривые роста.

Ключевые слова: РАСТИТЕЛЬНОЕ МАСЛО, BACILLUS PUMILUS, BACILLUS ATROPHAEUS, SPHINGOMONAS AURANTIACA, MICROBACTERIUM OXYDANS, RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS, ДВУХФАЗНЫЙ РОСТ, КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

Введение

В настоящее время производство растительных масел в мире составляет более 200 млн тонн в год с тенденцией к постоянному увеличению. Россия с ежегодным производством 6,5 млн тонн входит в десятку крупнейших мировых производителей растительного масла [1-3].

Одной из важных проблем в производстве, хранении и доставке растительного масла потребителям является микробная контаминация, источниками которой могут быть

окружающая среда, сырьё, оборудование и персонал. В случае непатогенных микроорганизмов ключевой характеристикой потенциальных контаминантов, определяющей их опасность с точки зрения порчи продукции, является способность этих микроорганизмов к размножению в растительном масле.

Цель настоящей работы состояла в изучении способности сапротрофных бактерий, выделенных из образцов растительного масла, к использованию растительного масла в качестве единственного субстрата, а также в изучении динамики их численности при культивировании в растительном масле.

Материалы и методы

Объектами исследования служили 4 штамма бактерий, выделенные из образцов растительного масла, идентифицированные методом MALDI TOF масс-спектрометрии и продемонстрировавшие способность к использованию растительного масла в качестве субстрата для роста: штамм Мр-2 *Bacillus pumilus* (рис. 1), штамм Мр-4 *Bacillus atrophaeus* (рис. 2), штамм Мр-6 *Sphingomonas aurantiaca* (рис. 3) и штамм Мр-7 *Microbacterium oxydans* (рис. 4).

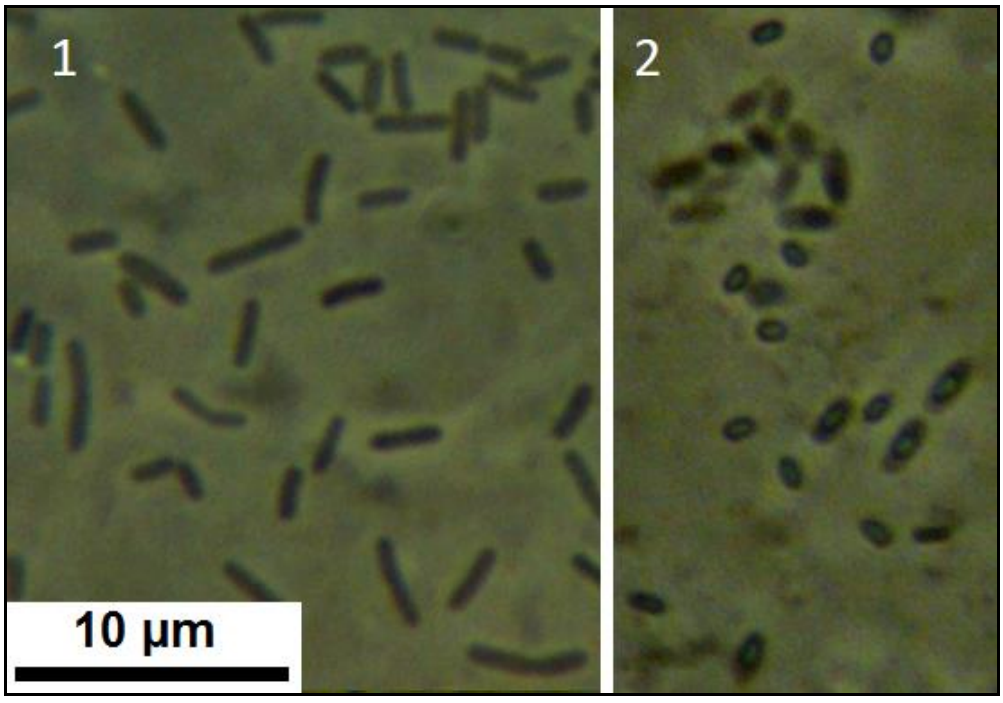

Рис. 1. Штамм Мр-2 Bacillus pumilus: 1 – вегетативные клетки, 2 – спорулирующая культура; длина масштабной полоски 10 мкм

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»

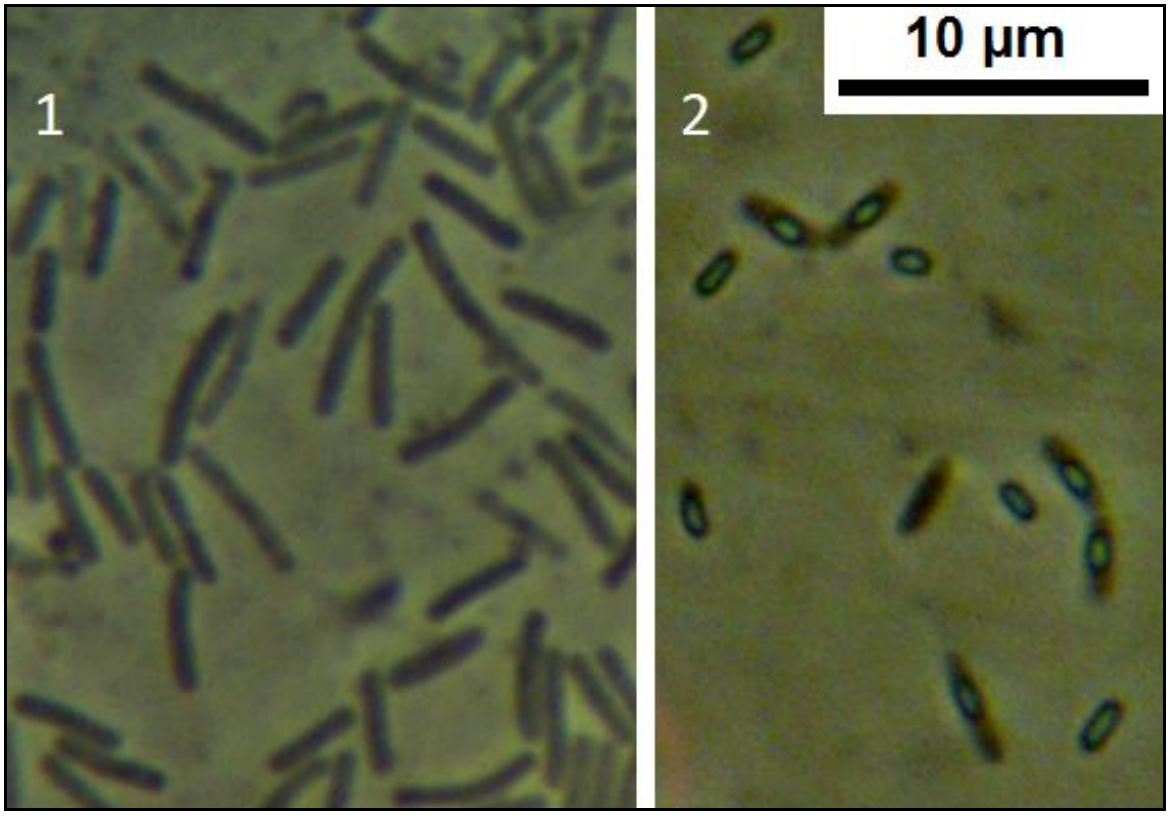

Рис. 2. Штамм Мр-4 Bacillus atrophaeus: 1 – вегетативные клетки, 2 – спорулирующая культура; длина масштабной полоски 10 мкм

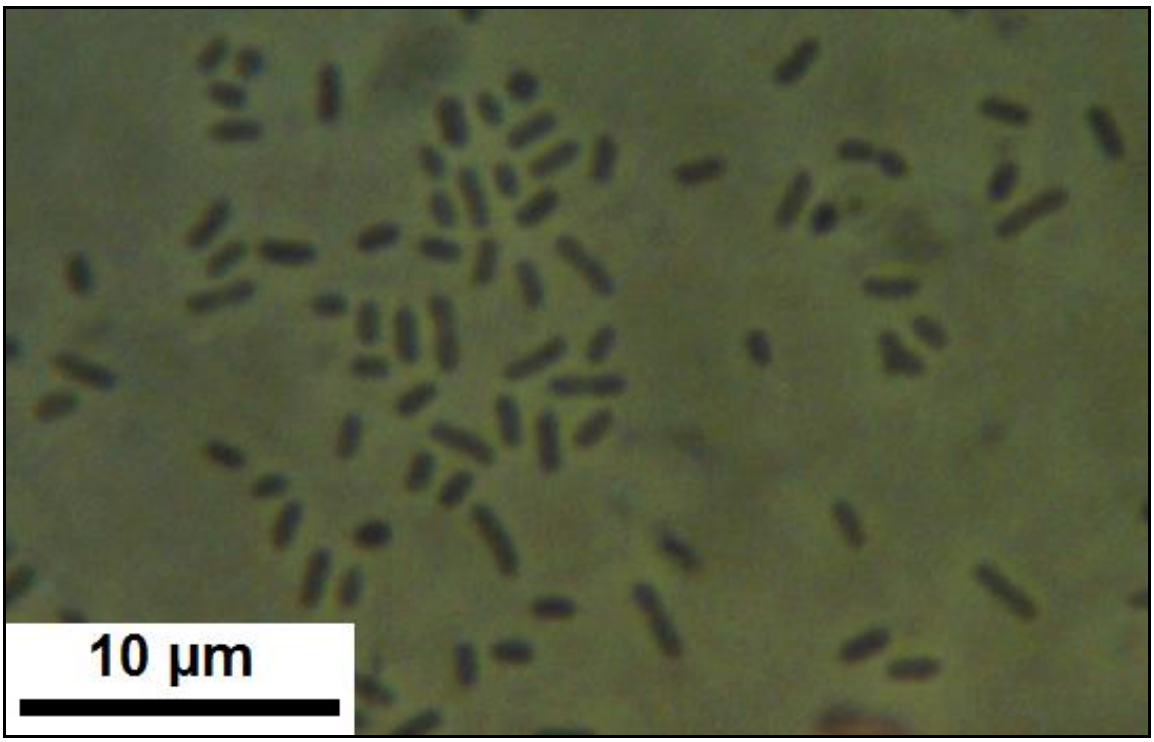

Рис. 3. Штамм Мр-6 Sphingomonas aurantiaca; длина масштабной полоски 10 мкм

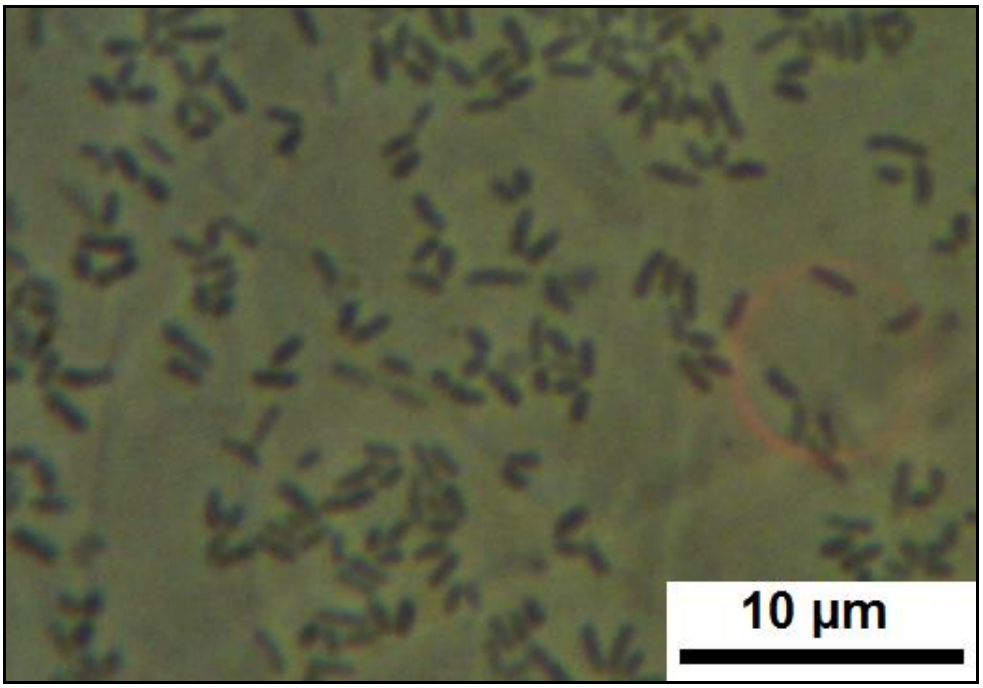

Рис. 4. Штамм Мр-7 Microbacterium oxydans; длина масштабной полоски 10 мкм

В качестве объекта для сравнения использовали штамм Мп5 *Rhodococcus erythropolis* (рис. 5), выделенный авторами из почвы и также продемонстрировавший способность к росту в растительном масле [4].

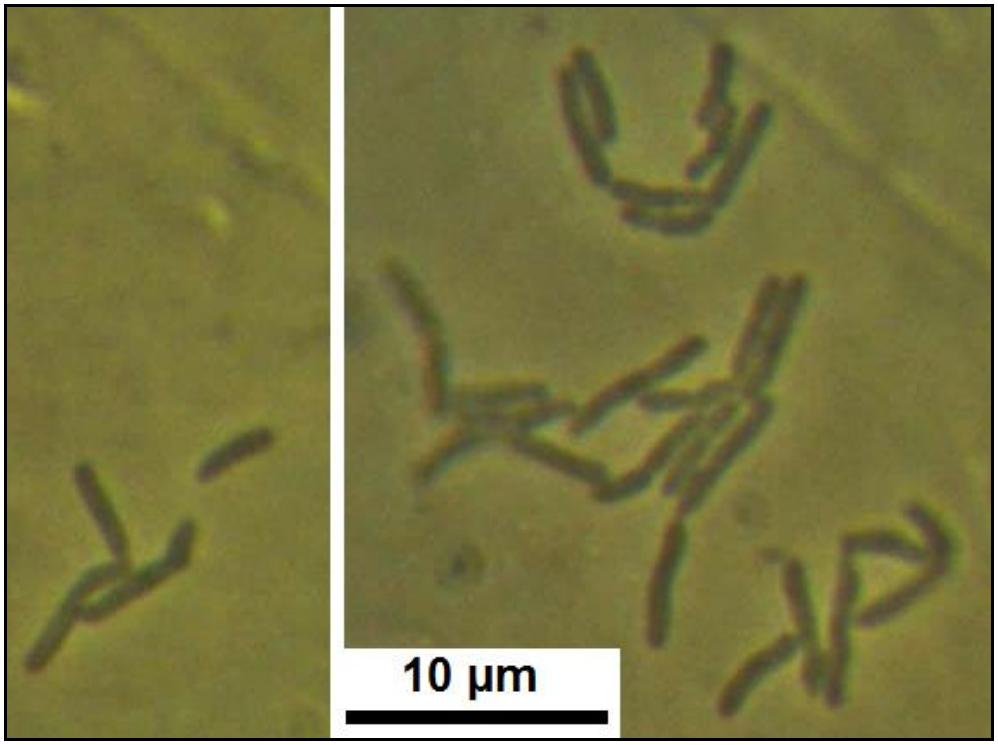

Рис. 5. Штамм Мп5 Rhodococcus erythropolis; длина масштабной полоски 10 мкм

Растительное масло инокулировали изучаемыми штаммами, методом высева определяли стартовую численность бактерий, после чего инкубировали при +7 °С, определяя численность бактерий также методом высева после 24, 72 и 94 час инкубирования. Анализ математических моделей роста бактерий в растительном масле проводили с помощью авторской программы на языке VBA.

Результаты исследований

Все изучаемые штаммы проявили способность к росту в растительном масле с минимальным временем генерации от 3,5 час (штамм Мр-2 *B. pumilus*) до 14,9 час (штамм Мр-4 B. *atropheus*) (рис. 6).

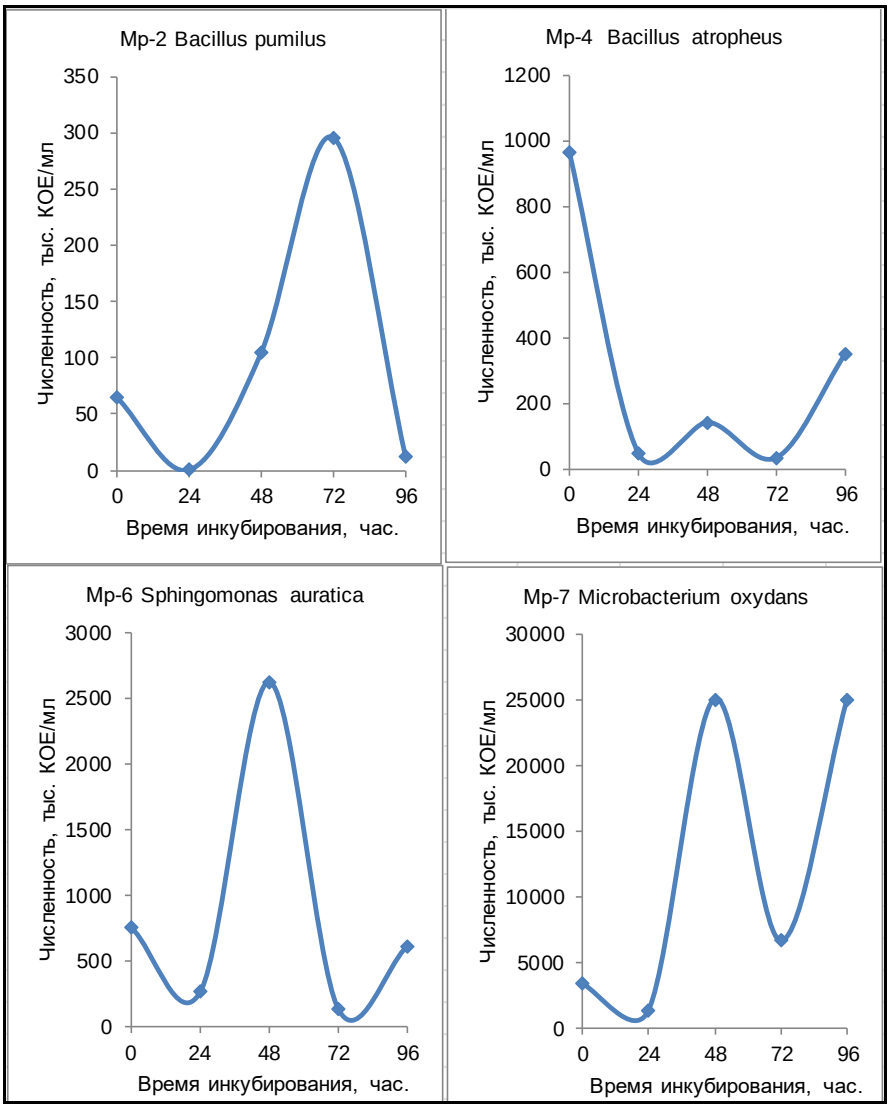

Рис. 6. Динамика роста изучаемых штаммов в растительном масле при температуре инкубирования +7 °С

Как видно из представленных графиков, в трёх случаях из четырёх наблюдался ярко выраженный двухфазный рост, когда после пика численности наблюдался спад, вслед за которым начинался новый рост численности исследуемого штамма. Аналогичный двухфазный рост ранее отмечен нами и при изучении роста, выделенного из почвы R. erythropolis при использовании растительного масла в качестве единственного субстрата [4] (рис. 7).

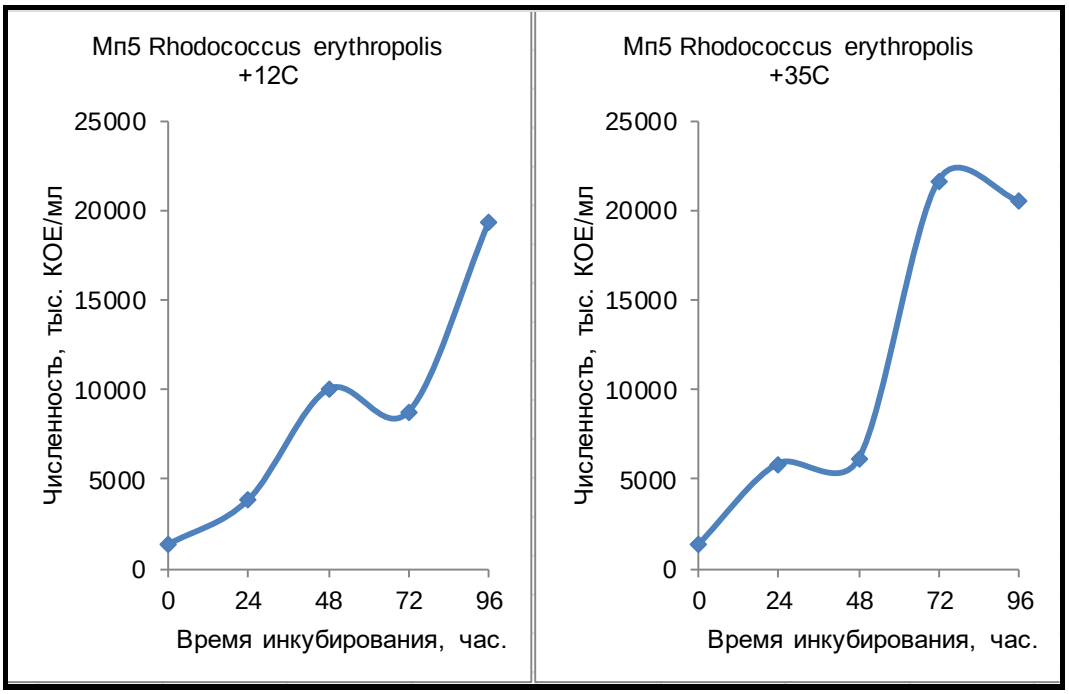

Рис. 7. Двухфазный рост R. erythropolis в растительном масле (по [4])

Для объяснения наблюдаемого эффекта нами предложено две модели. Согласно первой модели, при использовании растительного масла в качестве единственного субстрата наблюдается диауксия. В первой фазе бактерии используют более доступный компонент (S1) согласно классической системе уравнений (1):

$$\frac{dX}{d\tau} = \mu(S_1)X - \varepsilon X$$

$$\frac{dS_1}{d\tau} = -a_1\mu(S_1)X \qquad (1)$$

$$\mu(S_1) = \mu_{max1}\frac{S_1}{Ks_1 + S_1}$$

где X – численность бактерий, S1 – концентрация более доступного компонента субстрата, μ(S1) – удельная скорость роста бактерий, ε – удельная скорость гибели бактерий, a1 – расход компонента S1 на единицу прироста численности бактерий, μmax1 – максимальная удельная скорость роста на компоненте субстрата S1, Ks1 – концентрации компонента субстрата S1, при которой скорость роста равна половине максимальной, τ – время.

После снижения концентрации компонента S1 ниже критического уровня S1min популяция бактерий переключается на использование менее доступного компонента S2, после чего рост популяции начинает подчиняться системе уравнений (2):

$$\frac{dX}{d\tau} = \mu(S_2)X - \varepsilon X$$
$$\frac{dS_2}{d\tau} = -a_2\mu(S_2)X \qquad (2)$$
$$\mu(S_2) = \mu_{max2}\frac{S_2}{Ks_2 + S_2}$$

где X – численность бактерий, S2 – концентрация менее доступного компонента субстрата, μ(S2) – удельная скорость роста бактерий, ε – удельная скорость гибели бактерий, a2 – расход компонента S2 на единицу прироста численности бактерий, μmax2 – максимальная удельная скорость роста на компоненте субстрата S2, Ks2 – концентрации компонента субстрата S2, при которой скорость роста равна половине максимальной, τ – время.

Компьютерный анализ данной модели показывает, что она порождает весь набор кривых, наблюдаемых в эксперименте (рис. 8).

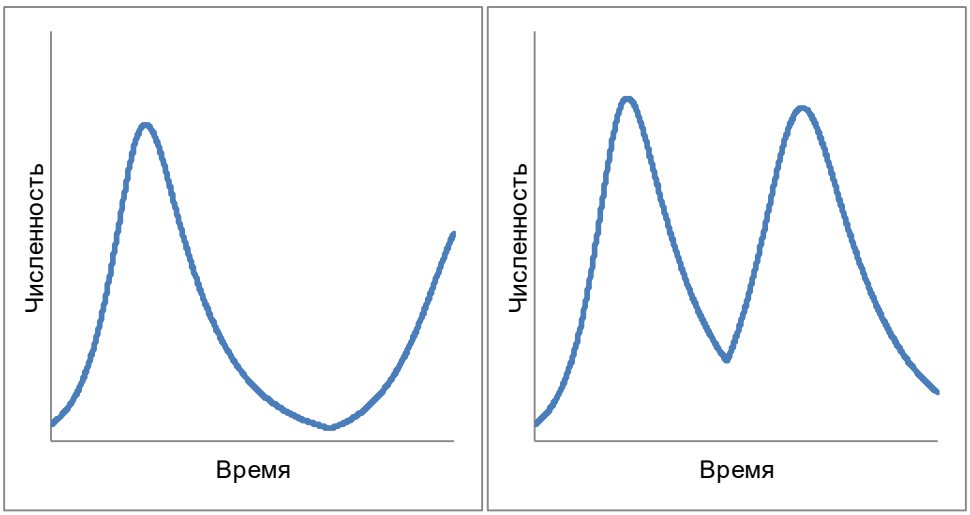

Рис. 8. Примеры кривых, порождаемых моделью диауксии при разных комбинациях параметров

Введение в модель лаг-фазы, связанной с адаптацией микробной популяции к новому субстрату, позволяет объяснить наблюдаемое на рис. 6 первоначальное падение численности бактерий в растительном масле в первые сутки после инокуляции (рис. 9).

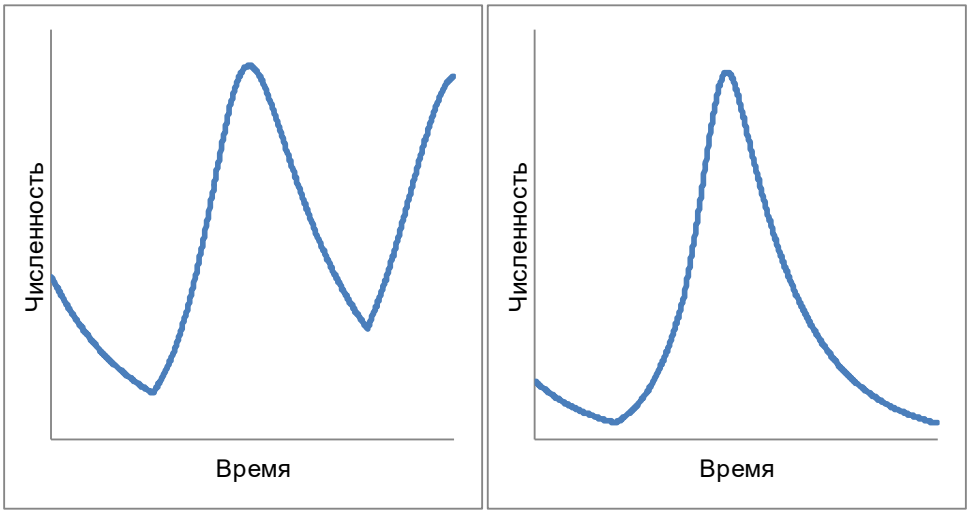

Рис. 9. Примеры начального падения численности бактерий при добавлении лаг-фазы в модель диауксии

Альтернативная модель в качестве объяснения двухфазного роста изучаемых штаммов в растительном масле предполагает механизм неполного окисления. Во время первой фазы происходит рост за счёт окисления субстрата S1 до промежуточного продукта S2 согласно системе уравнений (3):

$$\begin{aligned} \frac{dX}{d\tau} &= \mu(S_1)X - \varepsilon X \\ \frac{dS_1}{d\tau} &= -a_1\mu(S_1)X \\ \frac{dS_2}{d\tau} &= b\mu(S_1)X \\ \mu(S_1) &= \mu_{\max 1}\frac{S_1}{Ks_1 + S_1} \end{aligned} \qquad (3)$$

где X – численность бактерий, S1 – концентрация субстрата, S2 – концентрация промежуточного продукта, μ(S1) – удельная скорость роста бактерий, ε – удельная скорость гибели бактерий, a – расход субстрата S1 на единицу прироста численности бактерий, μmax1 – максимальная удельная скорость роста на субстрате S2, Ks1 – концентрации компонента субстрата S1, при которой скорость роста равна половине максимальной, τ – время.

После снижения концентрации субстрата S1 ниже критического уровня S1min популяция бактерий переключается на использование промежуточного продукта S2, после чего рост популяции начинает подчиняться системе уравнений (4), эквивалентной системе (2):

$$\frac{dX}{d\tau} = \mu(S_2)X - \varepsilon X$$

$$\frac{dS_2}{d\tau} = -a_2\mu(S_2)X \qquad (4)$$

$$\mu(S_2) = \mu_{\max 2}\frac{S_2}{Ks_2 + S_2}$$

где X – численность бактерий, S2 – концентрация менее доступного компонента субстрата, μ(S2) – удельная скорость роста бактерий, ε – удельная скорость гибели бактерий, a2 – расход компонента S2 на единицу прироста численности бактерий, μmax2 – максимальная удельная скорость роста на компоненте субстрата S2, Ks2 – концентрации компонента субстрата S2, при которой скорость роста равна половине максимальной, τ – время.

Несмотря на принципиальные отличия механизмов двухфазного роста в вышеупомянутых моделях, вторая модель фактически отличается от первой лишь источником S2. В первой модели S2 изначально присутствует в растительном масле, во второй модели S2 образуется входе роста культуры благодаря неполному окислению первоначального субстрата. В этой связи вторая модель при компьютерном анализе порождает кривые, аналогичные первой модели. Единственное различие касается лишь динамики концентрации субстрата S2 (рис. 10).

Обе модели представляются правдоподобными с биологической точки зрения. Явление диауксии хорошо известно и широко распространено в микробных популяциях [5]. Неполное окисление встречается как у бактерий, так и у грибов, хотя у обеих этих групп неполное окисление ассоциируется с образованием органических кислот, преимущественно при росте на углеводах и их производных, в первую очередь – таких, как одноатомные и многоатомные спирты [6-8].

При этом у бактерий неполные окисления характерны для достаточно специализированной группы сем. Acetobacteriaceae, представители которой, в отличии от грибов, не утилизируют продукты неполного окисления.

С учётом перечисленного модель диауксии в качестве объяснения двухфазного роста бактерий в растительном масле представляется нам более адекватной, чем модель

неполного окисления с получением промежуточного продукта и его последующим использованием.

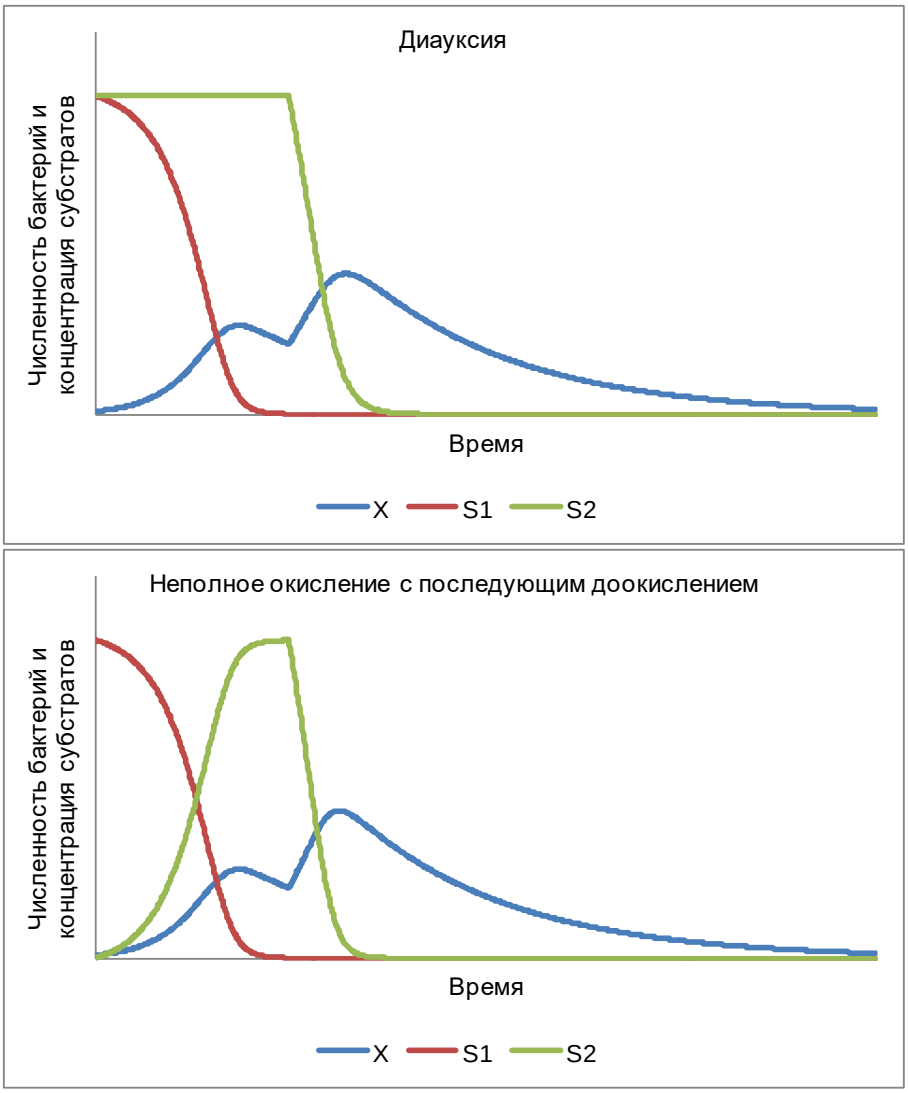

Рис. 10. Пример динамики концентрации субстрата S_2 в модели диауксии и в модели неполного окисления с последующим доокислением промежуточного продукта

Вне зависимости от конкретных механизмов, лежащих в основе двухфазного роста бактерий в растительном масле, следует отметить, что максимальная численность бактерий на пике роста в растительном масле в зависимости от штамма составляла 10^5-10^7 КОЕ/мл, что является достаточно низким показателем для столь высокоэнергетического субстрата, как жир. Мы полагаем, что это связано с несбалансированностью растительного масла как субстрата для роста микроорганизмов – в первую очередь, с нехваткой источников азота и фосфора.

Выводы

1. Для бактерий, проявивших способность к использованию растительного масла в качестве единственного субстрата, характерен двухфазный рост.

2. Наблюдаемая в экспериментах динамика численности бактерий в растительном масле может быть одинаково успешно описана двумя моделями – моделью диауксии и моделью неполного окисления субстрата с последующей утилизацией получившегося продукта. Исходя из общебиологических соображений, модель диауксии представляется предпочтительной.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства сельского хозяйства Российской Федерации в рамках тематического плана-задания № 77 "Изучение потенциальных контаминантов в пищевой масложировой продукции".

Список использованных источников:

1. Parcell J., Kojima Y., Roach A., Cain W. Global Edible Vegetable Oil Market Trends // Biomedical Journal of Scientific & Technical Research. – 2018. – vol. 2. – issue 1, 2282-2291.

2. OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030 // OECD/FAO - 2021. - URL: https://www.fao.org/3/cb5332en/Oilseeds.pdf

3. Global vegetable oil production set to hit another record high // Oils & Fats International. - 2022. - URL: https://www.ofimagazine.com/news/global-vegetable-oil-production-set-to-hit-another-record-high

4. Овсянкина С.В., Хижняк С.В., Аболенцева П.А., Олейникова Е.Н. Почвенные бактерии - потенциальные контаминанты растительных масел [Электрон. ресурс] // АгроЭкоИнфо: Электронный научно-производственный журнал. – 2022. – № 6. – Режим доступа: http://agroecoinfo.ru/STATYI/2022/6/st_640.pdf.; DOI: https://doi.org/10.51419/202126640.

5. Solopova A., van Gestel J., Weissing F.J., Bachmann H., Teusink B., Kok J., Kuipers O.P. Bet-hedging during bacterial diauxic shift // Proc Natl Acad Sci USA. – 2014. – 111 (20). – P. 7427-7432.

6. Dolfing J. The microbial logic behind the prevalence of incomplete oxidation of organic compounds by acetogenic bacteria in methanogenic environments // Microb. Ecol. - 2011 – 41. – P. 83–89; – Режим доступа: https://doi.org/10.1007/s002480000076

7. Deppenmeier U., Ehrenreich A. Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of Gluconobacter oxydans // J Mol Microbiol. Biotechnol. – 2009. – 16 (1-2). - P. 69–80; DOI: 10.1159/000142895.

8. Karaffa L., Engineering B., Science F. Production of Organic Acids by Fungi // Encyclopedia of Mycology. – 2021.– Vol. 2. – P. 406-419.

Цитирование:

Овсянкина С.В., Хижняк С.В., Аболенцева П.А., Олейникова Е.Н. Двухфазный рост бактерий при использовании растительного масла в качестве единственного субстрата [Электрон. ресурс] // АгроЭкоИнфо: Электронный научно-производственный журнал. – 2023. – № 1. – Режим доступа: http://agroecoinfo.ru/STATYI/2023/1/st_120.pdf.
DOI: https://doi.org/10.51419/202131120.