

Kombinované postupy inaktivace bakteriálních spor

V. VINTER,
Mikrobiologický ústav ČSAV

Spory bakterií představují svou resistencí a schopností dlouhodobé existence ve stavu kryptobiosy závažné nebezpečí v materiálech zpracovávaných zejména v potravinářském průmyslu. Základní výzkum resistance spor bakterií se tím tedy vzdáleně promítá i do problematiky současné i budoucí výživy lidstva. Nutnost standardisovat sterilizační postupy na nejodolnější formy, spory rodu *Clostridium* a *Bacillus*, zdůraznila význam studia mechanismu jednotlivých typů resistance spor. Současně bylo nutno vystopovat jak jsou jednotlivé mechanismy resistance spor integrovány, jak spolu souvisí navzájem a zda je též možno porušením jednoho protekčního mechanismu ovlivnit i ochranný mechanismus vůči jinému inaktivačnímu zásahu. Jednoduché inaktivační postupy, na př. vysoká teplota, ozáření atd., jsou drastické. Výsledky základního výzkumu resistance bakteriálních spor se však nutně musí dříve nebo později objevit ve svém konečném cíli, to jest v praktickém postupu inaktivace spor v komplexních materiálech: potravinách, farmaceutických přípravcích, zdravotnickému zboží atd. Drastický inaktivační zásah není, na př. v potravinářské technologii, v mnoha případech účelný a žádoucí. Praxe vyžaduje tedy zpětně od základního výzkumu podrobnější údaje o vhodné sekvenci méně drastických inaktivačních zásahů, které by se úplně, nebo alespoň do značné míry vyrovnaly jednoduché inaktivaci. Zvlášť žádoucí je studium všech zásahů vedoucích k podstatné sensitizaci spor vůči jinému typu inaktivace, kdy tedy nedochází jen k sečtení účinku.

Nejvíce je zatím známo o kombinovaných inaktivačních postupech, kde druhým inaktivačním zásahem je zvýšená teplota. Zmíním se jen o několika případech, včetně těch, které jsme sami zjistili v naší laboratoři v Mikrobiologickém ústavu ČSAV. Zatím co na příklad v kombinovaném následném procesu: 1. zahřátí → ozáření [U. V. nebo inonizující], se účinky jen sečítají, při opačném postupu: 2. irradiace → zahřátí, dochází k více nebo méně výrazné senzitivaci. Tento jev je společný sporám bacilů i klostridií. Díky tomu, že jsou již známy údaje o hlavních složkách thermoprotekčního mechanismu spor, pyridin-2,6-dikarboxylové [dipikolinové (DPA)] kyselině a vápníku, mohli jsme v práci naší laboratoře hlouběji analyzovat závislost radio- i thermoinaktivace na obsahu těchto složek ve sporách. Vhodným modelem k těmto studiím byl

Bacillus cereus (NCIB 8122) u něhož je možno dávkováním iontů vápníku ve sporulačním mediu připravit jak vysoce thermoresistentní klidové spory (bohaté na Ca^{++} a DPA), tak relativně thermosensitivní spory s nízkým obsahem vápníku a dipikolinové kyseliny. Radioresistence obou typů spor byla prakticky stejná. Pokud šlo o thermoresistenci těchto spor, zjistili jsme nejen rozdíly v konečném sklonu inaktivační křivky, ale vysoce resistentní spory plně satureované vápníkem i dipikolinovou kyselinou vykazovaly i delší počáteční lag v inaktivaci. Tento druhý jev, determinovaný hladinou t. zv. labilně vázaného vápníku ve sporách, jsme označili jako „adicionální“ thermoprotekční mechanismus. V materiálech, kde můžeme předpokládat přítomnost podobných spor s vysokým obsahem vápníku, je nutno počítat s přítomností větší nebo menší frakce spor, u kterých konečný logaritmický typ usmrcování buněk bude následovat až po skončení počáteční prodlevy thermoinaktivace.

Předchozí X-ozáření (200 Krad) obou typů těchto spor vedlo k senzitivizaci spor vůči následné thermoinaktivaci, při čemž také počáteční rameno dvoufázové inaktivační křivky se u spor s „adicionálním“ mechanismem zkracovalo v závislosti na dávce ozáření. Ionizující záření tedy porušilo celkový thermoprotekční mechanismus, bez specifického vlivu na některý z obou mechanismů dílčích (1, 2). Na druhé straně úplná eliminace „adicionálního“ thermoprotekčního mechanismu ve sporách, vyvolaná různými způsoby již při sporogenezi, neovlivňuje radioresistenci spor (2, 3, 4). Lze uzavřít, že thermoprotekční mechanismus ve sporách lze narušit v širokém rozmezí, aniž by byla ovlivněna radioresistence spor. Jedním z mechanismů ovlivnění thermoprotekce je právě ozáření, při čemž senzitivizace spor je zde zřejmě výsledkem zvýšené lability vápníku ve spoře. Jeho extraktibilita při nízkém pH nebo chelatoformními látkami je vyšší (2). Ve sporové periférii, fungující jako iontoměnič, může být ostatně hladina labilního vápníku modifikována v širokém rozmezí. Titrací spor do t. zv. „H-forem“ je možno hladinu vápníku redukovat, při čemž dojde k porušení „adicionálního“ thermoprotekčního mechanismu, k dočasnému narušení klíčivosti spor i ke změnám permeability buněčného povrchu pro vápník (2, 5). Snížení thermoresistence kyselou extrakcí labilní frakce vápníku je příkladem velmi jednoduché senzitivizace spor (6).

Několik stručných údajů, které jsem z naší předchozí práce uvedl, naznačují, že vzájemné ovlivnění jednotlivých protekčních mechanismů ve sporách je možno přesněji charakterizovat.

Pokračováním našeho studia aplikace kombinovaných inaktivačních zásahů na klidové spory s dobře definovanými vlastnostmi je naše spolupráce s Výskumným ústavom potravinárskym v Bratislavě. Cílem první etapy je studium krátko- i dlouhodobého působení nízkých teplot (v rozmezí od 0 °C do 10 °C) na předem ozářené spory *Bacillus cereus*. Různé fáze výzkumu budou prováděny v Mikrobiologickém ústavu ČSAV v Praze, některé ve Výskumnom ústavu potravinárskom v Bratislavě. V přípravné fázi se spolupráce omezila na řadu vzájemných konzultací a v zaučování některých pracovníků bratislavského pracoviště v příslušných metodikách. Pracovníci byli během pobytu na Mikrobiologickém ústavu ČSAV v Praze seznámeni s inaktivačními technikami, charakterizací inaktivačních křivek u spor různých vlastností a celkově se základní problematikou diferenciacie vegetativních buněk ve sporangium a sporu, klíčení spor a postgerminálního vývoje. Prvé orientační ozařování bylo provedeno na radiobiologickém oddělení Ústavu experimentální botaniky na

^{60}Co ozařovači Gammacell 220 (Atomic Energy Ltd., Canada). Pracovníci kolektivů pražského MBÚ ČSAV a bratislavského Výskumného ústavu potravinářského se v témže ústavu seznámili ještě s dalšími možnostmi ozařování, na příklad pomocí ^{60}Co -ozařovače GUT-400 (SSSR), Průmyslového roentgenového přístroje 200 kV (Chirana Chotutice) a v Ústavu experimentální genetiky a biologie ČSAV s roentgenovým ozařovačem Multivolt 250 kV (Siemens) a ozařovačem Mikrometa (Chirana) adaptovaným pro lampu AEG-50-T (Machlett).

V současné době, po dokončení dosimetrie Gamma-ozařovače umístěného v Potravinářském ústavu v Bratislavě, definují pracovníci tohoto ústavu radioinaktivační křivku spor *Bacillus cereus* (NCIB 8122). Výzkum je zatím omezen na spory plně saturované vápníkem a DPA, později budou jako model použity i jiné typy spor. V první etapě budeme u ozářených spor (200–300 Krad) uchovávaných v chladu sledovat přežívání, klíčitelnost, možnost retardace klíčení, ovlivnění prvních syntetických aktivit spor v postgerminančním období, rychlost růstu, atd. Pracovníci oddělení obecné mikrobiologie MBÚ ČSAV navazují na tuto problematiku sledováním změn citlivosti spor vyklíčených a spor v různých stadiích postgerminačního vývoje vůči kvalitativně i kvantitativně odlišným mediím.

Zařazení studia primárních a dalších syntetických aktivit spor bezprostředně po vyklíčení, a to jak v živném tak neživném mediu, má jistý význam. Je důležité nejen u spor intaktních, ale i u spor jakýmkoliv způsobem atakovaných. Subletální zásahy nejenže inhibují germinaci nebo postgerminační vývoj, ale naopak mohou oba procesy stimulovat. Aktivační vliv tepelného šoku na dormantní spory je znám desítky let a není nutno o něm více mluvit. V souvislosti s naší společnou problematikou irradiační nás však musí zajímat i podobný jev někdy pozorovaný po subletální irradiaci. Údajů o tom je v literatuře dost. Vzhledem k tomu, že ve své příští práci chceme sledovat vliv nízkých teplot po předchozí irradiaci, vyberu k ilustraci základnosti tohoto kombinovaného procesu jen některé příklady. Není rozhodující, že v nich figurují zástupci anaerobního rodu *Clostridium*. Je totiž známo, že procesy aktivace, inaktivace, klíčení i mechanismy resistance jsou u klostridií i bacilů velmi podobné. Novější přehledné práce o resistenci spor vůbec (7) a o problematice výskytu a inaktivace spor v potravinách (8) to plně potvrzují.

Spory *Clostridium botulinum* typ F ozářené subletální dávkou (0,2 Mrad) a později kultivované při 10 °C v živném mediu sice vyklíčí, ale nedochází k postgerminačnímu vývoji (9). Tytéž spory inkubované při 30 °C nejen dají vznik vegetativní buňce, ale následný růst je rychlejší než u neozařených. V tomto případě (30 °C) byl růst stimulován eliminací lytického faktoru v kultuře. Zvýšená růstová rychlost nebo vyšší produkce toxinu byla po nízkodávkovém ozáření pozorována i u jiných klostridií (10, 11). Tentýž jev lze pozorovat při ještě nižší dávce ozáření (0,1 Mrad) i během následné kultivace při 10 °C (9). Význam volby vhodné dávky při subletálním ozáření je nesporný. Pokud pro zjednodušení vyloučíme vliv nepřímých účinků ionizujícího záření, můžeme za hlavní narušení buňky považovat zlomy v molekule DNK. Není vyloučeno, že odlišná reakce u spor ozářených na 200 krad při následné inkubaci v různých teplotách může být způsobena ovlivněním „repair“ mechanismů, kterými se hojí poškozená DNK.

V pokusech, které jsem z literatury uvedl výše, šlo však po ozáření vlastně jen o redukci, i když podstatnou, inokulovaného materiálu. Resultující růst se

mohl uskutečnit z přeživších spor. Radiační D-hodnota (dávka nutná k inaktivaci 90 % populace) pro spory bacilů a klostridií je v rozmezí 100–300 krad. Za jednu z běžných detekcí spor „přežívajících“ irradiaci (i jiný inaktivační faktor) je pokládána tvorba celé nové populace, t. j. kolonie. Jde však o to, zda i při neschopnosti postgerminačního vývoje nebo dělení, irreversibilní nebo reversibilní, nejsou schopny spory vykazovat nežádoucí syntetické aktivity. Je známo, že na př. „letálně“ ozářené (1,25 Mrad) spory *Clostridium botulinum* klíčí normálně jako neozářené a navíc vykazují velmi rozsáhlou enzymatickou aktivitu [12].

Residuální metabolický potenciál „mrtvých“ spor může mít i nebezpečnější charakter. Ani použití vyšších dávek gamma-irradiace (3,8 Mrad) nezabránilo sporám *Clostridium botulinum* vyklíčit a syntetizovat nové proteiny, mezi nimi botulotoxin [13]. V obou z uvedených příkladů nedošlo k postgerminačnímu vývoji spor; v obou byla detekována schopnost nové proteosynthesy. Tím méně mohly být samozřejmě poškozeny preexistující enzymy, které přežívají i sterilizační dávku gamma-irradiace na př. 4,5 Mrad [14].

Téměř ve všech těchto případech následovala po irradaci kultivace za teploty umožňující klíčení, postgerminanční vývoj i dělení buněk. Cílem naší spolupráce s kolektivem bratislavského Potravinářského ústavu je však kombinované působení subletální irradiace a následného krátko- i dlouhodobého vlivu teploty suboptimální nebo zcela nevhodné pro výše uvedené procesy. Působení chladového intervalu je tedy nutno sledovat [po ozáření spor v neživném mediu] jak v neživném, tak plně živném, nebo živinami limitovaném mediu. Při vlastní detekci přežívání má být na jedné straně použita klasická plotnová metoda počítání buněk schopných vytvořit kolonii, a to po přenesení na pevné, plnohodnotné medium. Pokud jde o výživu, dostupnost kyslíku a teplotu znamená tento postup t. zv. „shift-up“ zásah, s velmi opožděnou a neúplnou detekcí biologické aktivity buněk. Na druhé straně je nutno u některých případů (podtrženo) našeho společného výzkumu:

CHLAD „SHIFT-UP“

A subletální irradiace → **1 živné medium** → I. detekce

B subletální irradiace → 2 neživné medium → **II. detekce**

charakterizovat též 1. heterogenitu buněk, 2. stupeň syntetických aktivit, 3. konverzi: spora → naklíčená spora, 4. schopnost postgerminačního vývoje, 5. rychlost růstu, 6. preferenciální růst některé mutanty atd.

Do jisté míry na dva z těchto úseků (1/I a 2/II) nepřímo navazuje jeden úsek výzkumu laboratoře obecné mikrobiologie Mikrobiologického ústavu ČSAV. Sledujeme životaschopnost, obnovení syntetických aktivit po „shift-up“-postupu u buněk pozdržených v různém stadiu postgerminačního vývoje, a to po kratším nebo dlouhodobém uchovávání v neživném mediu. Zábava syntetických aktivit buněk v postgerminačním období je v našich pokusech indukována limitací živin, nikoliv zatím chladem. V tomto případě lze však připustit jistou analogii.

Klíčení bakteriálních spor je nesyntetický proces, při kterém participují pouze preexistující sporové enzymy, buď degradační, nebo zpracovávající primární germinační inductory. Teprve při postgerminačním vývoji dochází k de-represi řady vegetativních enzymů. I za podmínek, kdy k tomuto druhému stupni konverse spory ve vegetativní buňku nemůže dojít, mohou zůstat vyklíčené spory poměrně dlouhou dobu životaschopné a, pokud jde o některé

biologické a biochemické vlastnosti, tvoří zvláštní mezistupeň mezi kryptobiotickou formou, sporou, a hypermetabolickou buňkou, t. j. bobtnající a elongovanou sporou. Jejich schopnost rychle obnovit syntetické aktivity se však snižuje a současně se zvyšuje heterogenita buněk vůči následnému přidání živného substrátu („shift-up“).

Tím spíše lze očekávat retardaci naklíčených buněk předtím ozářených a navíc uchovávaných po různou dobu při nízké teplotě. Biologická odpověď ozářených spor bakterií při následné kultivaci v živném mediu je dána jak podmínkami, za kterých byly ozařovány, tak podmínkami při detekční kultivaci. Na příklad významnou roli v radioinaktivaci spor bacilů hraje pH media při ozařování. Současně ozáření zvyšuje pH-sensitivitu přeživších spor (15). Můžeme předpovědět, že kombinace ozáření a zamezení syntetických aktivit chladem může vést k dalšímu zpomalení nebo opoždění postgerminačního vývoje spor po detekčním „shift-up“-postupu.

V tomto velmi stručném a často zjednodušeném nástinu některých problémů týkajících se kombinovaných inaktivačních zásahů vůbec, nebo speciálně sekvence: ozáření → působení chladu, jsem podal jen několik příkladů a úvah poněkud osvětlujících úkol, který chceme ve spolupráci s Výzkumným ústavem potravinářským v Bratislavě řešit. V jednotlivostech je vlastní plán práce přesně rozpracován, s přihlédnutím ke všem theoretickým podkladům, které jsou ze základního výzkumu spor k dispozici. Nepodceňujeme skutečnost, že od kombinovaných inaktivačních zásahů, uskutečněných v čistých suspensích dobře definovaných spor, k praktické inaktivaci spor v komplexních materiálech, bude dlouhá cesta a mnoho potíží. Dobrým zvládnutím jednotlivých problémů však budeme moci později seriosněji a již zacíleně přistoupit k řešení složitější problematiky.

S o u h r n

V stručném nástinu problematiky výzkumu kombinované inaktivace bakteriálních spor je uvedeno několik příkladů o tom, že jednotlivé protekční mechanismy ve sporách jsou navzájem independentní. Nicméně jsou možnosti sensitizace spor jedním inaktivačním zásahem vůči zásahu jinému. Hlavním smyslem těchto kombinovaných inaktivací je použití méně drastických sterilizačních procesů. Z úvah o irradiaci „inaktivovaných“ sporách, které sice nejsou schopny vytvořit novou populaci, ale mohou při klíčení i částečném postgerminačním vývoji vykazovat nežádoucí syntetické aktivity, vyplývá důležitý úkol. Je nutno sledovat i syntetické aktivity u subletálně ozářených spor při následné kultivaci v živném mediu. V článku byl podán i krátký přehled o dosavadní spolupráci Mikrobiologického ústavu ČSAV s Výzkumným ústavem potravinářským Slovenské Poľnohospodárske akademie v Bratislavě i o některých perspektivách tohoto společného výzkumu.

L I T E R A T U R A

1. Vinter V. a Věchet B., Fol. microbiol. 9: 352, 1964.
2. Vinter V. Publikace International Atomic Energy Agency, FAO, No 653207, PL-151, Vídeň 1965.
3. Vinter V. a Věchet B., Fol. microbiol. 9: 238, 1964.
4. Weisová H., Vinter V., a Stárka J. Fol. microbiol. 11 : 387, 1966.

5. Vinter V., Šťastná J. a Čáslavská J. V knize „Spores IV“ (ed. L. L. Campbell, American Society for Microbiology, str. 289, 1969.
6. Alderton G. a Snell N., Science 163 : 1212, 1969.
7. Roberts T. A. a Hitchins A. D. V knize „The Bacterial Spore“, (ed. G. W. Gould a A. Hurst), Academic Press, str. 611, 1969.
8. Ingram M., v téže knize str. 549, 1969.
9. Williams—Walls N. J., Appl. Microbiol. 17 : 128, 1969.
10. Eklund M. W. a Poysky F., U. S. Atomic Energy Commission Report, Conf. 670945, Isotopes-Industrial Technology (TID-4500), str. 46, 1967.
11. Maunder D. J., Segner W. P., Schmidt C. F., Boltz J. K., stejný pramen, str. 54, 1967.
12. Costilow R. N., J. Bacteriol. 84 : 1268, 1962.
13. Kempe L. L. a Graikoski J. T., Appl. Microbiol. 10 : 31, 1962.
14. Fernandez E., Tang T. a Grecz N., J. gen. Microbiol. 56 : 15, 1969.
15. Farkas J., Kiss I. a Andrassy E., Symposium on Radiosterilization of Medical Products, SM-92/28, Budapest, 1967.

Комбинированные методы инактивизации бактериальных спор

Выводы

Статья в краткости трактует проблематику исследования комбинированной инактивизации бактериальных спор и приводит несколько примеров касающихся отдельных протекционных механизмов, которые в спорах взаимонезависимы. Но и так реактивная чувствительность спор одним инактивизационным вмешательством по отношению к другому вмешательству возможна. Главной целью данных комбинированных инактивизаций является применение менее крутых стерилизационных процессов. Из рассуждений об иррадиации «инактивизированных» спор, которые правда не способны создать новое потомство но могут при прорастании и частичном постгерминационном развитии проявлять нежелательные синтетические действия, вытекает важная задача. Необходимо следить также за синтетическими действиями сублетально облученных спор во время последовательной культивации в питательной среде.

Статья приводит также краткий обзор сотрудничества между Микробиологическим институтом Чехословацкой Академии Наук и Научно-исследовательским институтом пищевой промышленности Словацкой Сельскохозяйственной Академии Наук и некоторые перспективы этого общего исследования.

Combined Processes of Bacterial Spore Inactivation

Summary

In short outline of the research problems of bacterial spore combined inactivation some examples showing the independence of individual protective mechanism in spores are included. Nevertheless there are some possibilities of spore sensitization by one inactivating intervention against other intervention. The main sense of these combined inactivations is the use of less drastic sterilization processes.

From the considerations of radiation of „inactivated“ spore which cannot create a new population but can by germination and partial postgerminal evolution show undesirable synthetic activity, — follows an important task. It is necessary to follow the synthetic activity of sublethal radiated spore by subsequent cultivation in nourishy medium.

A short survey about the hitherto collaboration between the Microbiological Institute of ČSAV—(Czechoslovak Academie of Science) and the Research Food Institute of SPA (Slovak Agriculture Academie) at Bratislava and about perspective of this common research is given.