

Зберігання та переробка продукції

УДК 578.81
© 2012

О.В. Науменко,
кандидат
технічних наук

Н.Ф.Кігель,
доктор
технічних наук

*Інститут продовольчих
ресурсів НААН*

БАКТЕРІОФАГИ STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS: ПОШИРЕННЯ ТА ДЕТЕКЦІЯ

*Виділено видоспецифічні вірулентні бактеріофаги
Streptococcus thermophilus на підприємствах
молочної галузі України. Досліджено реакцію
клітин лактобактерій на фаги S. thermophilus та
створено специфічну моніторингову систему для
їх детекції.*

Останніми роками у вітчизняній молочній промисловості спостерігаються порушення виробничого процесу, спричиненого ураженням бактерій *Streptococcus thermophilus* фагами. Це пов'язано насамперед з широким застосуванням цього виду молочнокислих бактерій під час виробництва практично усіх видів ферментованої молочної продукції та сирів завдяки його високій технологічності (висока молокозсідальна активність, помірною енергією кислотоутворення, здатність до утворення природних загущувачів) та біологічній активності (здатність до деструкції холестерину, імуномодельовальна активність, антагоністична активність щодо умовно-патогенної та патогенної мікробіоти тощо).

Одним із найважливіших етапів запобігання фаголізису заквашувальної мікрофлори на виробництві є оцінка фагової ситуації проведення моніторингу бактеріофагів [6]. Потрібно зауважити, що дослідження фагів *S. thermophilus* в Україні практично не проводились, незважаючи на високий ступінь ризику фагового ураження у біотехнологічних процесах з переробки молочної та м'ясної сировини. Така ситуація пов'язана насамперед з недосконалістю методів виявлення бактеріофагів, які застосовуються нині на підприємствах, і використаням лише мезофільних молочнокислих бактерій як тест-культур. Водночас визначення фагів *S. thermophilus* передбачає застосування специфічних моніторингових бактеріальних тест-систем. Установлення заходів протидії чи знешкодження інгібіторного впливу фагів неможливе без вивчення біологічного відгуку клітин лактобактерій на цей чинник, дослідження природних механізмів захисту бактеріальних клітин, наукового обґрунтування систем детекції та ідентифікації цього типу фагів.

Мета роботи — вивчення реакції клітин лактобактерій на фаги *S. thermophilus* та створення моніторингової системи для їх детекції.

Матеріали та методи. Виділення фагових ізолятів проводили з різних біологічних джерел методом подвійного агару з 10 мМ CaCl₂ згідно з [1]. Чисті лінії фагів отримували послідовними пасажами фагів із морфологічно однотипних негативних колоній. Число проведених пасажів для усіх фагів становило не менше 6. Титр фагів визначали за кількістю негативних колоній у см³, виражали у БУО/см³. Стійкість культур до фагів визначали нанесенням лізатів на чашку Петрі з твердим поживним середовищем та досліджуваною культурою в логарифмічній фазі росту. У досліджах використовували бактеріофаги титру 10⁷ БУО/см³ об'ємом по 0,02 см³. Чутливими вважали ті штами, на зонах яких у місцях нанесення фаголізату виявляли зони лізису. Обробку даних здійснювали за загальноживаними статистичними методиками [2].

Результати досліджень та їх обговорення. *Фаговий моніторинг.* Першим етапом роботи був пошук, виділення та вивчення біологічних властивостей фагів, активних щодо *S. thermophilus*. Для цього проведено фаговий моніторинг продукції ряду молокопереробних і сиробних заводів України. Установлено, що на підприємствах молочної промисловості зі збільшенням асортименту продукції і кількості застосовуваних заквашувальних культур розширився спектр фагів, які здатні згубно впливати на молочнокислі бактерії різних таксономічних груп. Зокрема, збільшилася кількість вад ферментацій, зумовлених нагромадженням на виробництві фагів *S. thermophilus*. Установлено, що 24% від усіх проаналізованих варіантів (71

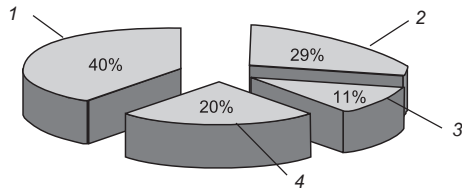


Рис. 1. Об'єкти контамінації — джерела накопичення фагів *S. thermophilus*: 1 — заквашувальні культури; 2 — сири тверді; 3 — обладнання; 4 — кисломолочні продукти

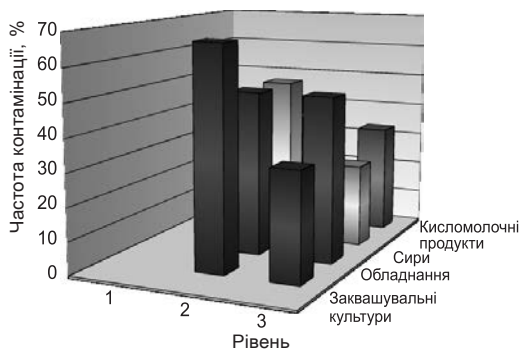


Рис. 2. Рівні фагового забруднення об'єктів моніторингу: 1-й рівень — $1-10^1$ БУО/см³; 2-й рівень — 10^2-10^4 БУО/см³; 3-й рівень — $>10^5$ БУО/см³

зразок) містили фаги, активні щодо *S. thermophilus*. Визначено частоту виявлення цих фагів із різних джерел (рис. 1).

Фаги *S. thermophilus* виявлено зі зразків ферментованих молочних продуктів, сирів, обладнання і найбільшу кількість — із заквашувальних культур, що містили бактерії-хазяїни виду *S. thermophilus*.

Аналіз ступеня забруднення фагами досліджуваних зразків свідчить, що більшість із них містили фаги у титрі від 10^2 до 10^4 БУО/см³ (рис. 2).

Це відповідає 2-му рівню забруднення — середньому (згідно з [3]), коли вже можуть спостерігатися деякі відхилення від нормального перебігу технологічного процесу вироблення того чи іншого продукту, але загалом вдається отримати цільовий продукт. Проте такий рівень фагового забруднення є показником не-

1. Основні властивості фагів *S. thermophilus*

Група фагів	Джерело виділення	Частота виділення, %	Титр, БУО/см ³	Морфологія колоній, діаметр (d), мм
I	Змиви з обладнання; заквашувальні культури	25	$(4,0-5,5)10^6$	Рівний край, без ореолу, d=1,0-2,0
II	Заквашувальні культури; кисломолочні продукти	25	$(1,4-8,3)10^7$	
III	Те саме	50	$(1,0-7,0)10^8$	

задовільного стану виробництва, який у разі ігнорування може призвести до значно більшого накопичення фагів та виникнення серйозніших, інколи незворотних загроз для вироблення певного ферментованого молочного продукту.

З об'єктів моніторингу цілеспрямовано вилучено 12 фагових ізолятів, видоспецифічних до *S. thermophilus*, поширених на виробництві. Досліджено морфологію зон лізису, ростові характеристики та інфекційність фагів. Визначено деякі властивості цих фагів (табл. 1).

Фаги розрізнялися за ефективністю репродукції на гомологічних культурах та утворювали за цією ознакою 3 групи. Половина фагів (50%) характеризувалися високою літичною активністю, максимальний титр — $(1-7)10^8$ БУО/см³.

За даними табл. 1, усі виділені ізоляти утворювали подібні за морфологією негативні колонії — маленькі округлі стерильні зони діаметром 1-2 мм, що узгоджується з даними літератури. Як правило, бляшки *S. thermophilus* є меншими в діаметрі, ніж у фагів лактококів [7].

Отже, дослідження морфології негативних колоній (як первинної ознаки фагів) дало змогу зробити висновок, що ізоляти є гомогенними.

Селекція тест-культур для визначення бактеріофагів *S. thermophilus*. Для того, щоб встановити ефективні умови репродукції відібраних фагів, потрібно насамперед визначити коло гомологічних до них штамів *S. thermophilus*. Для визначення фагочутливості культур у роботі використовували музейні (з колекції ІПР) не виробничі штами *S. thermophilus* та виділені бактеріальні ізоляти з фаговмісних зразків заквашувальних культур — об'єктів фагового моніторингу. За результатами досліджень обраховували індекс фагочутливості культур, що відповідав частці бактеріофагів, які лізують цей штам.

Установлено, що взяті для дослідів штами *S. thermophilus* мали різний ступінь фагочутливості. Так, найчутливішими до фагів були 5% від загальної кількості проаналізованих культур (табл. 2). Група IV характеризувалася найбільшим значенням індексу фагочутливості — 18%.

З одного боку, використання у виробництві штамів, які мають індекс фагочутливості понад 10%, є недоцільним. Ці штами здатні підтримувати репродукцію великої кількості фагів і таким чином можуть призводити до інфікування

2. Скринінг штамів *S. thermophilus* за маркером фагочутливості

Група	Фаги вірулентні, шт.	Штами, % від заг.	Індекс фагочутливості, %
I	—	45	—
II	1	35	2,9
III	4	15	11,8
IV	7	5	17,6

варіації становив 45,5–78%. Серед виділених ізолятів були як дуже фагочутливі, так і фагостійкі культури.

З ізолятів групи № 1 та № 4 було відібрано культури, на яких добре репродукувалися фаги *S. thermophilus* — літична активність не менше 10^8 БУО/см³. Для них було застосовано метод ступінчастого цілеспрямованого відбору та впродовж 5-ти циклів селекції відібрано 5 ізолятів, що характеризувалися найвищою фаго-

3. Популяційна структура штамів — об'єктів селекції

Літична активність гомологічного до культури фага, БУО/см ³	Кількість ізолятів у популяції*				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
10^7 – 10^8	6	5	3	8	1
10^5 – 10^6	4	5	6	3	4
10^3 – 10^4	5	3	8	9	5
10^1 – 10^2	10	5	4	5	12
0	—	7	4	—	3
Коефіцієнт варіації, %	66,3	45,5	60,9	78,0	54,8

* Загальна кількість — 25 ізолятів кожної культури.

виробництва різними бактеріофагами [4]. З другого боку, це свідчить про перспективність цієї групи бактерій щодо пошуку індикаторних культур для визначення фагів. Саме з цих бактерій проводили селекцію індикаторних культур — тест-штамів для визначення фагів. Спочатку було досліджено популяційну структуру фагочутливих штамів з групи IV та обраховано коефіцієнт варіації для цієї ознаки (табл. 3).

Установлено, що культури є дуже гетерогенними за ознакою фагочутливості — коефіцієнт

чутливістю та популяційною стабільністю ($kv < 10\%$). Ці культури ідентифіковано з видом *S. thermophilus* [5].

Отримані наукові дані щодо фагового моніторингу із застосуванням нових тест-культур апробовано та впроваджено у промислових умовах ДДП ІПР (Акт апробації та впровадження від 31.10. 2011 р.). Штам *S. thermophilus* c/1 задепоновано у Національній колекції промислових мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Висновки

Створено колекцію вірулентних фагів, видоспецифічних щодо *S. thermophilus*, досліджено морфологію зон лізису, ростові характеристики та інфекційність фагів.

Проведено спрямовану селекцію штамів лактобактерій за маркером фагочутли-

вості та відібрано 5 індикаторних культур — тест-штамів для визначення фагів *S. thermophilus*.

Установлено ефективність відібраних фагочутливих культур для проведення фагового моніторингу у промислових умовах.

Бібліографія

1. Адамс М. Бактеріофаги. — М.: Мир, 1961. — 527 с.
 2. Васнев С.А. Статистика: Уч. пособ. — М.: МГУП, 2001. — 170 с.
 3. Науменко О.В., Кігель Н.Ф. Вплив фагового забруднення на виробництво та якість кисломолочних продуктів//Вісн. аграр. науки. — 2009. — № 10. — С. 63–67.
 4. Фурик Н.Н., Богданова Л.Л., Сафроненко Л.В. Изучение свойств вирулентных бактериофагов промышленных штаммов лактококков, используемых в сыроделии//Весті НАН Бе-

ларусі. Сер. біол. наук. — 2003. — № 3. — С. 113–116.
 5. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 3rd Edition. — The Firmicutes. — 2009. — V. 3. — 1422 p.
 6. Brüssow H., Fremont M., Bruttin A., Sidoti J., Constable A. Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation//Appl. Environ. Microbiol. — 2003. — 60, № 12. — P. 4537–4543.
 7. Everson T.C. Control of phage in dairy plant//Bull. IDF. — 1991. — № 263. — P. 24–28.