

**УДК 578.81**

**Науменко О.В.**, к.т.н., ст. науковий співробітник (*naumenkoo@list.ru*)  
*Інститут продовольчих ресурсів НААН, м.Київ, Україна*

### **ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ МІЖ ЛАКТОБАКТЕРІЯМИ ТА ФАГОМ**

*Досліджено взаємодію культур молочнокислих бактерій із вірулентними фагами, виділеними за умов виробництва ферментованої молочної продукції. Показано, що характер впливу бактеріофагів на лактобактерії залежить від фаготипів культур та біологічних властивостей самих фагів. Інфікування чутливих культур бактеріофагом призводило до лізису клітин – вміст життєздатних бактерій зменшився після 6 год культивування у 4,2-14,5 тис. разів порівняно до вихідного вмісту. Титр фага навпаки після 6 год кокультивування зріс у 3,8-15,8 тис. разів залежно від культури. Активна кислотність (рН) змінилась неістотно, коагуляції молока не відбулось навіть після 24 год від початку ферментації.. Встановлено, що ефективність репродукції фагів залежить від складу поживного середовища для культивування гомологічної до нього культури. Так, у молоці титр фага був більшим, ніж у гідролізованому бульйоні на 9,9-13,6%. Застосування багатокомпонентних заквасок, що включають фагостійкі штами і/або чутливі до фагів, але з різними фаготипами – це один із способів гарантування проходження успішної ферментації.*

**Ключові слова:** бактеріофаги, вірулентність, молочнокислі бактерії, ферментація, кислотність, репродукція, резистентність, лізогенія, ротація.

**УДК 578.81**

**Науменко О.В.**, к.т.н., ст. научный сотрудник (*naumenkoo@list.ru*)  
*Институт продовольственных ресурсов НААН, г.Киев, Украина*

### **ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ЛАКТОБАКТЕРИЯМИ И ФАГОМ**

*Исследовано взаимодействие культур молочнокислых бактерий с вирулентными фагами, выделенными в условиях производства ферментированных молочных продуктов. Показано, что характер влияния бактериофагов на лактобактерии зависит от фаготипов культур и биологических свойств самих фагов. Инфицирование чувствительных культур бактериофагом приводило к лизису клеток - содержание жизнеспособных бактерий уменьшилось после 6 часов культивирования в 4,2-14,5 тыс. раз по сравнению с исходным содержанием. Титр фага наоборот после 6 ч совместного культивирования вырос в 3,8-15,8 тыс. раз в зависимости от культуры. Активная кислотность (рН) изменилась незначительно, коагуляции молока не произошло даже через 24 ч после начала ферментации. Установлено, что эффективность репродукции фагов зависит от состава питательной*

среды для культивирования гомологичной к нему культуры. Так, в молоке титр фага больше, чем в гидролизованном бульоне на 9,9-13,6%. Применение многокомпонентных заквасок, включающих фагостойкие штаммы и/или чувствительные к фагам, но с разными фаготипами - это один из способов обеспечения прохождения успешной ферментации.

**Ключевые слова** бактериофаги, вирулентность, молочнокислые бактерии, ферментация, кислотность, репродукция, резистентность, лизогения, ротация.

**UDC 578.81**

**O. V. Naumenko**, Ph. D., Senior Researcher ([naumenkoo@list.ru](mailto:naumenkoo@list.ru))

*Institute of Food Resources of National Academy of Agrarian Sciences, Kiev, Ukraine*

### **RESEARCH OF INTERACTION BETWEEN LACTOBACTERIA AND PHAGE**

*The research of interaction of lactic acid bacteria cultures and virulent phages isolated under conditions of fermented dairy products manufacturing was conducted. It was shown that the impact of bacteriophages on lactobacteria depends on cultures phage types and biological properties of the phages themselves. Sensitive cultures bacteriophage infection resulted in cell lysis – viable bacteria content decreased after 6 hours cultivation by 4,2 – 14,5 thousand times compared to the original content. Conversely, phage titer after 6 hours of cultivation increased by 3,8 – 15,8 thousand times depending on culture. Active acidity (pH) has been changed insignificantly, milk coagulation did not happen even after 24 hours from the beginning of fermentation. It was defined that phage reproduction efficiency depends on the composition of the nutrient medium for the cultivation of homologous culture. Thus, phage titer in milk was higher than in hydrolysed bouillon by 9,9 – 13,6 %. The use of multi-starters that include phage-resistant and/or phage-sensitive strains but with different phage types – is one way to guarantee a successful fermentation passing.*

**Key words:** bacteriophages, virulence, lactic acid bacteria, fermentation, acidity, reproduction, resistance, lysogenic cycle, rotation.

**Вступ.** Значна різноманітність та широке розповсюдження фагів молочнокислих бактерій у природних екосистемах (звідки вони потрапляють у молоко, а потім і на молокопереробний завод), змушують дослідників проводити ретельний добір культур, що залучаються до складу заквашувальних композицій. Ці культури мають бути стійкими до усіх фагів, виділених за умов виробництва, або хоча б до їх переважної більшості. Найнебезпечнішими для виробництва є літичні вірулентні фаги, які спричинюють лізис бактерій, включених до складу закваски, і за лічені години можуть призвести до повної зупинки ферментації та втрати цільового продукту [1].

Ефективність і стратегія боротьби з фаголізисом значною мірою залежать від рівня наших знань про біологію специфічних бактеріофагів, характер їх

взаємодії з клітинами хазяїна, шляхи розповсюдження фагової інфекції на виробництві [2].

Одним із перспективних заходів запобігання розвитку фагової інфекції і забезпечення стабільності біотехнологічних процесів на виробництві є постійний моніторинг за наявністю бактеріофагів, активних до промислових штамів, з метою подальшої селекції та відбору фагостійких штамів [3]. Отже, рівень фагостійкості слід розглядати як один із головних критеріїв оцінки виробничих штамів.

**Матеріали та методи.** Об'єктами досліджень були бактеріофаги молочнокислих бактерій, виділені на молочних заводах України. Виділення та титрування фагів проводили у агаризованому поживному середовищі на основі гідролізованого молока (ГА), або М17, використовуючи техніку двох шарів із додаванням 10 мМ CaCl<sub>2</sub> [4]; визначення кількості молочнокислих бактерій - за ГОСТ 10444.11-89.

**Результати дослідження.** Було досліджено взаємодію між бактеріями та бактеріофагом у багатокомпонентній системі, що складається з чутливого та стійкого до фага штамів молочнокислих бактерій. Як видно з даних таблиці 1, якщо у таку бактеріальну систему потрапляє бактеріофаг, то подальша їхня взаємодія залежить від властивостей бактерій та типу фага.

*Таблиця 1*

**Зміна активної кислотності, вмісту бактерій та фага у різних бактеріальних системах**

Показник	Система: бактерія(і) з або без фага								
	Час, год	T <sup>-a</sup>	T + f8	T + T <sup>+b</sup>	T + T <sup>+</sup> + f8	M <sup>-b</sup>	M + f8	M + M <sup>+r</sup>	M + M <sup>+</sup> + f8
рН (од.)	1	6,06	6,04	5,86	5,89	5,75	5,78	5,62	5,65
	2	5,90	5,91	5,66	5,68	5,57	5,54	5,44	5,45
	3	5,71	5,87	5,32	5,37	5,48	5,38	5,30	5,23
	4	5,59	5,87	5,06	5,14	5,39	5,39	5,17	5,14
	5	5,49	5,90	4,89	4,96	5,33	5,44	5,09	5,12
	6	5,43	5,93	4,83	4,87	5,28	5,47	5,03	5,10
	24	4,82	5,24	4,49	4,36	4,75	5,52	4,38	4,33
	Коагуляція	24	+	-	+	+	+	-	+
Титр фага, lg БУО <sup>д</sup>	6	-	9,89	-	9,69	-	10,31	-	10,19
Вміст бактерій, lg КУО <sup>е</sup>	6	8,34	4,31	8,19	7,87	8,25	3,77	8,36	8,30

Примітки: <sup>a</sup>T<sup>-</sup> - термофільний штам, чутливий до фага; <sup>b</sup>T<sup>+</sup> - термофільний штам, стійкий до фага; <sup>b</sup>M<sup>-</sup> - мезофільний штам, чутливий до фага; <sup>r</sup>M<sup>+</sup> -

мезофільний штам, стійкий до фага; <sup>d</sup> – початковий титр –  $1,3 \times 10^6$  БУО/см<sup>3</sup>; <sup>e</sup> – початковий вміст –  $8,7 \times 10^7$  КУО/см<sup>3</sup>.

Так, якщо культура чутлива до фага – відбувається її інфікування, що згодом проявляється у призупиненні кислотоутворювальної активності. Активна кислотність (рН) змінюється повільно і неістотно, коагуляції молока не відбувається навіть через 24 год. Титр фага після 6 год культивування зростає у 3,8-15,8 тис. разів (залежно від культури) порівняно до початкового вмісту. Інфікування чутливих культур бактеріофагом призводить до лізису їхніх клітин – вміст життєздатних бактерій зменшується після 6 год у 4,2-14,5 тис. разів порівняно до початкового вмісту.

Зважаючи на отримані результати необхідно зауважити, що мезофільна культура була більш чутливою до фага – титр фага більший на 6,0%, а вміст залишкової мікрофлори менший на 12,5% порівняно до термофільної культури.

Також фагопродукція залежить від складу поживного середовища для культивування гомологічної інфікованої культури. Так, у молоці титр фага більший, ніж у гідролізованому бульйоні на 9,9-13,6%. Це узгоджується із даними Sechaud L. at all. про те, що іони Ca<sup>+2</sup> необхідні для адсорбції та ін'єкції фага у бактеріальну клітину [5].

У разі інфікування бактеріальної системи, що складається з чутливої та стійкої до внесеного фага культур, титр фага зростає за рахунок лізису чутливої культури. Стійка культура забезпечує молочнокисле бродіння – зростає кислотність, вміст бактерій, відбувається зсідання молока. Динаміка показників майже не відрізняється від неінфікованої стійкої культури (див. табл.1).

**Висновки.** Показано, що культури одного виду можуть істотно розрізнятися за чутливістю до фагів – тобто мати різні фаготипи. Отже, застосування багатокомпонентних заквасок – це один із способів гарантування проходження успішної ферментації. Оскільки, якщо відбудеться ураження фагом певного штаму, то інші компоненти закваски (стійкі до цього фагу) будуть продовжувати функціонування і таким чином забезпечать необхідні показники технологічного процесу виробництва того чи іншого молочного продукту.

**Перспективи подальших досліджень.** На основі вивчення лізогенії та спектру літичної дії вірулентних та помірних фагів лактобактерій можна розробляти науково-обґрунтовані схеми ротації виробничих культур з метою боротьби та профілактики випадків фаголізису заквашувальної мікрофлори на виробництві.

#### **Література**

1. Marcy M., Moineau S., Quiberoni A. Bacteriophages and dairy fermentations// Bacteriophage. – 2012. – Vol. 2, № 3. – P. 149-155.
2. 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. – Vol. 60, № 12. – P. 4537-4543.
3. Moineau S., Lévesque C. Control of bacteriophages in industrial fermentation//In Kutter E., Sulakvelidze A. (ed.) Bacteriophages: biology and applications. CRC Press, Boca Raton, Fla. - 2005. - P.286-296.

4. Everson T.C. Control of phage in dairy plant // Bull. IDF. – 1991. – 263. – P.24-28.
5. Sechaud L., Cluzel P.J., Rousseau M., Baumgartner A., Accolas J.P. Bacteriophages of lactobacilli//Biochimie.-1988. – 70, № 3. – P. 401-410.

*Стаття надійшла до редакції 23.03.2015*