

Фагостійкість молочнокислих бактерій

Науменко О.В., Бовкун А.О.

*Досліджено лізогенний стан молочнокислих бактерій методом хлороформної індукції. Проведено скринінг фагостійких, нелізогенних промислових культур молочнокислих бактерій видів *L. lactis ssp. lactis*, *L. lactis ssp. cremoris*, *S. thermophilus*. Відібрано індикаторні тест-культури для визначання бактеріофагів лактобактерій за наступними критеріями: чутливістю до вірулентних промислових лактофагів, здатністю забезпечувати їхню ефективну репродукцію та нелізогенністю.*

Значна різноманітність та широке розповсюдження фагів молочнокислих бактерій у природних екосистемах (звідки вони потрапляють у молоко, а потім і на молокопереробні підприємства) змушують дослідників проводити ретельний добір штамів лактобактерій, що залучаються до складу заквашувальних препаратів. Ці бактерії мають бути стійкими до усіх фагів, виділених за умов промислового виробництва кисломолочної продукції, або хоча б до їх переважної більшості. Найнебезпечнішими є літичні вірулентні фаги, які спричиняють лізис бактерій, залучених до складу закваски, і за лічені години можуть призвести до повної зупинки ферментації та втрати цільового продукту. Рівень фагостійкості розглядають як один із головних критеріїв оцінки виробничих штамів молочнокислих бактерій [1-3].

В той же час джерелами фагової інфекції можуть бути лізогенні бактерії, що містять профаги (це помірні невірулентні бактеріофаги, які не лізують бактеріального хазяїна, а вбудовують свої геноми у його хромосому) . Зовнішні умови (наприклад, рН, температура, концентрація солей та дефіцит поживних елементів) чи ураження клітини можуть індукувати перехід профага до літичного циклу та вивільнення нових фагів [4]. Тому ідеальними для використання у заквашувальних культурах є штами без профагів, але в реальності, більшість культур є лізогенними [5].

Метою роботи був добір промислових штамів лактобактерій за фагорезистентністю та нелізогенністю.

Матеріали та методи.

Об'єктами досліджень були штами молочнокислих бактерій, вірулентні ізоляти фагів молочнокислих бактерій, виділені за умов виробництва, з колекції відділу біотехнології ТІММ.

Лізогенний стан встановлювали двома методами: без індукції (спонтанне вивільнення профагів після нарощування культур у гідролізованому молоці упродовж доби за оптимальної температури) та шляхом обробки 5-6 год бульонних культур хлороформом (1:10) упродовж 30 хв. Підготовані проби центрифугували за 3000 об./хв. упродовж 30 хв. та досліджували надосадкову рідину на наявність фагів методом подвійного агару [6].

Стійкість культур до бактеріофагів визначали шляхом нанесення лізатів фагів на чашку Петрі з твердим поживним середовищем на основі гідролізованого молока та досліджуваною культурою в логарифмічній фазі росту. Чутливими вважали ті штами, на газонах яких у місцях нанесення фаголізату спостерігали зони суцільного лізису або окремі негативні колонії фага.

Фагопродукцію визначали за динамікою лізису культури та збільшенням титру фага. Для цього готували 2 колби із поживним середовищем (гідролізованим бульоном), вносили до кожної колби бульйонну 17-год.-ну культуру у кількості 3 % і культивували за 30° С упродовж 3 год. Після цього до однієї з колб (дослідної) вносили 1% до об'єму середовища фага та інкубували інфіковану та вихідну культури упродовж 24 год. Динаміку вмісту клітин упродовж культивування вихідної та інфікованої культури контролювали шляхом висіву десятикратних розведень у агаризоване середовище із гідролізованого бульону (ГА), а титр фагу встановлювали методом подвійного агару та виражали у бляшкоутворюючих одиницях у см³ (БУО/см³).

Результати досліджень та їх обговорення.

Виявлення лізогенних культур лактобактерій.

Відомо, що лізогенні культури інколи спонтанно вивільняють вірулентні мутанти помірних фагів [7]. У зв'язку з цим були проведені порівняльні дослідження двох методів виявлення лізогенних культур: спонтанної та хлороформної індукції помірних фагів лактобактерій. Як індикаторні використовували культури-хазяїни - *Lactococcus lactis ssp. cremoris* 11 cr - ИК₁-11 cr, *Lactococcus lactis ssp. diacetylactis* dl 15 - ИК₂- dl 15, *Lactococcus lactis ssp. lactis* 16 lact - ИК₃-16 lact, та спеціально селекціоновані тест-культури *Lactococcus lactis ssp. lactis* ИК₄-L₁, ИК₅- L₂, ИК₆- L₃, відібрані за нелізогенністю, чутливістю до широкого кола фагів.

Показано, що тільки одна з досліджених культур *Lactococcus lactis ssp. diacetylactis* dl 15 спонтанно вивільняла профаги, причому вони лізували саму культуру-хазяїна (табл. 1).

Таблиця 1.

Здатність культур молочнокислих бактерій
до спонтанного та індукованого вивільнення фагів

Індикаторні культури	Досліджувані культури					
	Спонтанна індукція			Хлороформна індукція		
	11 cr	dl 15	16 lact	11 cr	dl 15	16 lact
ИК ₁ -11 cr	-	-	-	-	-	-
ИК ₂ - dl 15	-	+	-	-	+	+
ИК ₃ - 16 lact	-	-	-	-	-	-
ИК ₄ -L ₁	-	+	-	+	+	-
ИК ₅ - L ₂	-	+	-	-	+	-
ИК ₆ - L ₃	-	+	-	-	+	+

Отримані данні узгоджуються з результатами Б.В.Тараканова [8], згідно

яких лише 28% із досліджених культур спонтанно вивільняли фаги, які добре репродукувались на культурі-хазяїна.

З метою повнішої оцінки лізогенного стану досліджуваних культур їх обробляли хлороформом. Було показано, що після хлороформної індукції фаги містились у культуральній рідині усіх оброблених штамів (табл. 1). Тобто штамми, які спонтанно не вивільняли фаги, після обробки хлороформом були здатні це зробити. Тому надалі встановлювали наявність лізогенного стану у заквашувальних культурах, що застосовуються у промисловості, саме у такий спосіб.

Було проаналізовано 45 штамів промислових культур молочнокислих бактерій, що входять до складу заквашувальних композицій для сиру кисломолочного, рязанки та сметани. Як тест-культури використовували штамми *L. lactis ssp. lactis* L₄, *L. lactis ssp. cremoris* LK₁ (для лактококофагів), та *S. thermophilus* ST₁ (для термострентококофагів).

Було встановлено, що 16% від загальної кількості проаналізованих культур за такої обробки вивільняли профаги. Аналогічні результати отримано Мьтнік Л.Г. [9], лізогенний стан було встановлено у 20% досліджених штамів лактобактерій після обробки їх хлороформом. Вочевидь, хлороформ сприяє руйнації оболонки клітин і вивільненню профагів. Загалом, для виявлення лізогенних культур застосовують різні види обробки клітин, наприклад: ультрафіолетом або мітоміцином. Ефективність цих агентів для збільшення виходу помірних фагів за даними різних дослідників досить варіативна. Так, за даними Kilic A.O. Et all. [10] після індукції мітоміцином встановлено лізогени у 55% зразків. Lowrie R. повідомляє, що тільки біля 20% з досліджених культур вивільняли профаги за обробки мітоміцином або ультрафіолетом [11].

Встановлення лізогенного стану у молочнокислих бактерій є підставою вважати їх потенційно небезпечними для застосування у біотехнологіях кисломолочних продуктів і сирів. Оскільки заквашувальні композиції, як правило, є багатоконпонентними, тому цілком можливою є велика вірогідність того, що вивільнені фаги лізогенних культур будуть інфікувати ту чи іншу чутливу до них культуру закваски. У результаті буде порушено співвідношення між культурами, або втрачено взагалі якусь чутливу культуру закваски, і, як

наслідок, ферментаційний процес буде мати неконтрольований характер. Тому їх рекомендовано вилучати із ротаційних програм.

Дослідження фагостійкості промислових культур лактобактерій.

Досліджували відношення лактобактерій до вірулентних фагів, виділених у промислових умовах. Літичну активність фагів було підтверджено на індикаторних культурах, на бактеріальному газоні тест-культури у місці нанесення фаголізу утворювались характерні зони лізису, приклад (рис.1). Титр фагів на відповідній тест-культурі становив 10^7 КУО/см³.

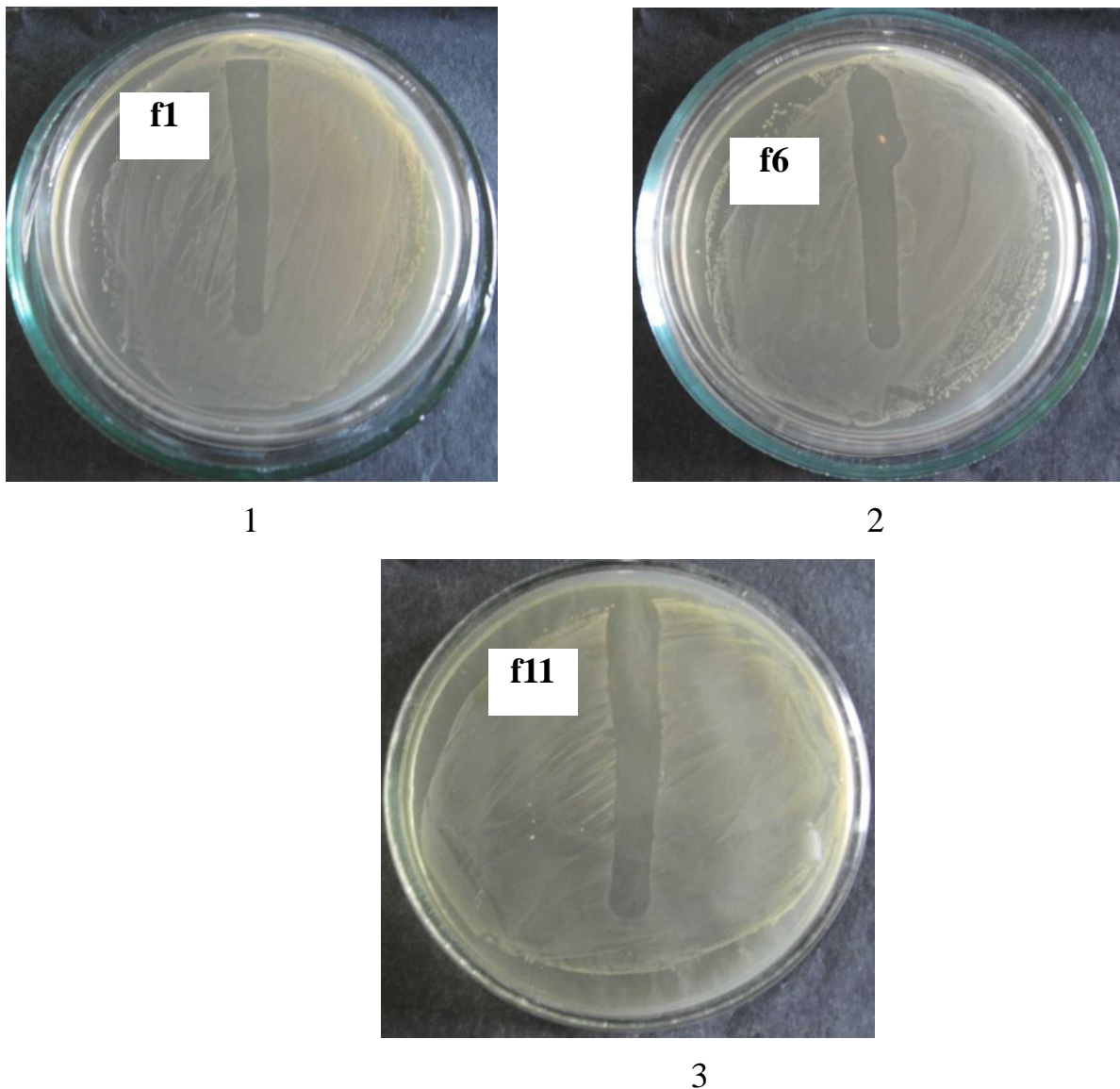


Рис. 1. Літична дія фагів на індикаторні культури:

1 – f1 на *L. lactis ssp. lactis*; 2 – f6 на *L. lactis ssp. cremoris*; 3 - f11 на *S. thermophilus*

Дослідження фагорезистентності промислових культур показало, що нелізогенні культури не завжди є стійкими до фагів. Отже, відбір культур для

промислового використання здійснювали за сукупністю властивостей – фагостійкістю до широкого спектру фагів та нелізогенністю.

На рис. 2 показано розподіл відібраних штамів трьох видів лактобактерій за фагорезистентністю щодо 10 вірулентних промислових ізолятів фагів (1f-16f).

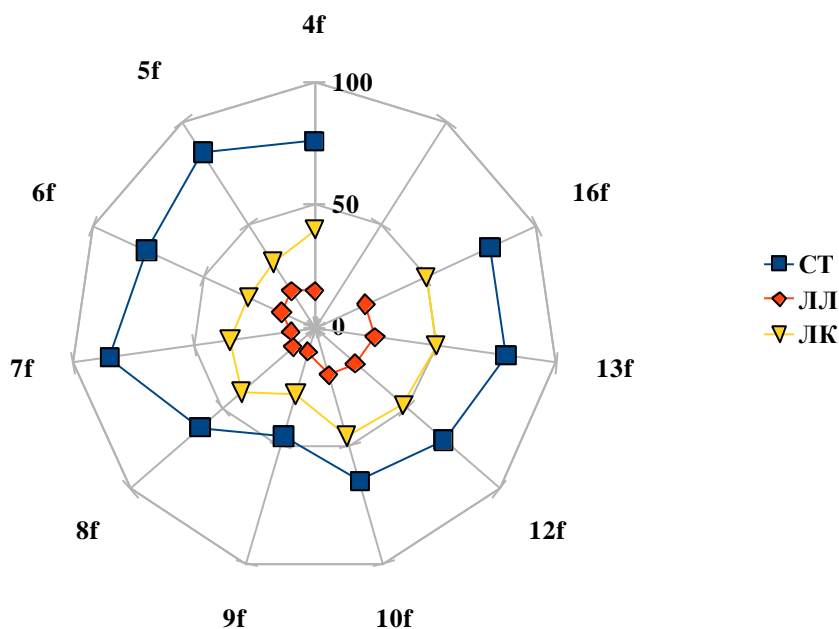


Рис. 2. Кількість фагостійких штамів лактобактерій, %
СТ - *S. thermophilus*; ЛЛ - *L. lactis ssp. lactis*; ЛК - *L. lactis ssp. cremoris*

На підставі отриманих даних, відібрано та запропоновано залучати до складу заквашувальних композицій для сиру кисломолочного, ряжанки та сметани у ротаціях фагостійкі штами молочнокислих бактерій, які не містять індукцибельних профагів.

Фагопродукція тест-культур чутливих до бактеріофагів.

Під час проведення моніторингу культур за фагостійкістю було відібрано індикаторні тест-культури, чутливі до переважної більшості фагових ізолятів, що не містять профагів.

Однією з важливіших характеристик тест-культур є їхня фагопродукція за різних умов інфікування та культивування [12].

Досліджували фагопродукцію культури *L. lactis ssp. lactis* L₄, яку інфікували вірулентним фагом f 8 за динамікою лізису культури та збільшенням титру фага.

Показано, що впродовж перших трьох годин у інфікованій культурі спостерігається навіть розмноження бактерій, хоча і менш інтенсивне порівняно до вихідної культури без фага (рис.3).

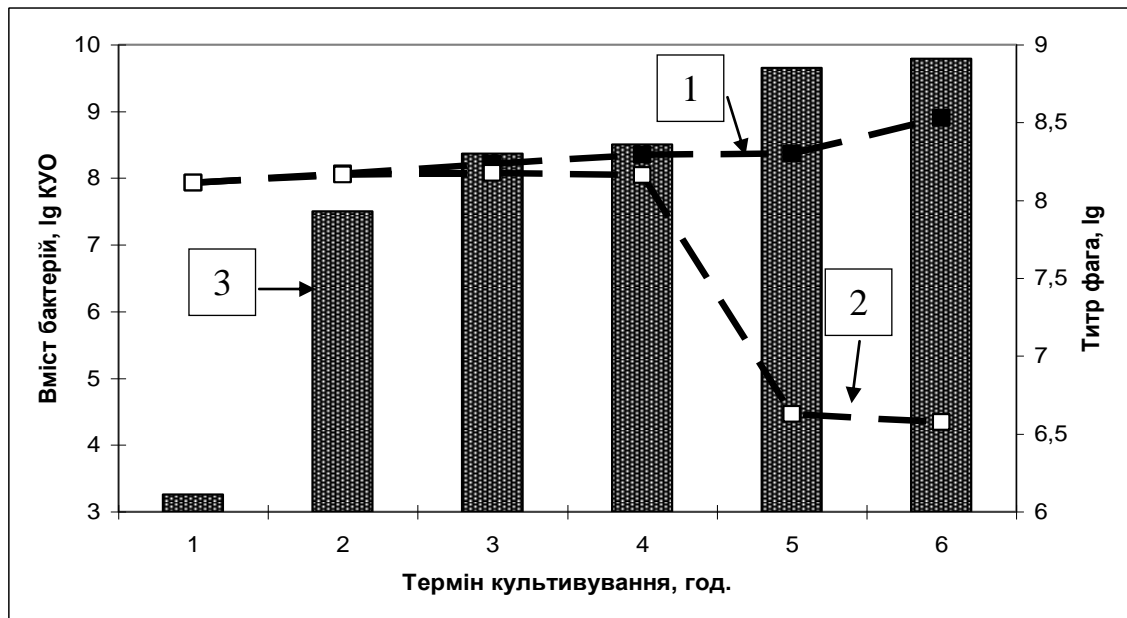


Рис. 3. Динаміка вмісту вихідної та інфікованої культури, та титру фага
1 – вміст вихідної культури; 2 – вміст інфікованої культури; 3 – титр фага

Упродовж наступної 4-ої години культивування ріст клітин припиняється і на 4-6 год після інфікування відбувається інтенсивний лізис клітин. Вміст залишкової мікрофлори на 6 год у 36308 разів менший порівняно до вихідної культури, тобто 51 % клітин на цю годину лізується.

Закономірно, що впродовж культивування інфікованої культури вміст фага f 8 поступово збільшується і на 6 год його титр становив максимальне значення - $8,9 \times 10^8$ НК/ см³.

Аналогічним чином було відібрано ще 4 індикаторні культури виду *L. lactis*, які забезпечували ефективну репродукцію фагів, виділених за умов

виробництва та не містили індуцибельних профагів. Тест-культури для визначання, вилучення бактеріофагів та селекції фагостійких культур молочнокислих бактерій задепонувано у Національній колекції промислових мікроорганізмів ІМВ (Україна).

Отримані дані мають велике практичне значення. Вони показують, що культури одного виду можуть істотно розрізнятись як за чутливістю до фагів, так і за кількістю присутніх в них профагів. Отже, застосування багатокомпонентних заквасок – це один із засобів гарантування проходження ферментації. Оскільки, якщо відбудеться ураження фагом певного мікроорганізму, то інші компоненти закваски (стійкі до цього фагу) продовжують функціонування і забезпечують необхідні показники технологічного процесу виробництва того чи іншого кисломолочного продукту. На основі вивчення лізогенії та спектру літичної дії вірулентних та помірних фагів лактобактерій можна скласти обґрунтовану схему ротації виробничих культур з метою боротьби та профілактики ризику фаголізису.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що до критеріїв селекції молочнокислих бактерій для промислового використання необхідно залучити фагостійкість до широкого спектру фагів та нелізогенність. Опрацьовано метод хлороформної індукції для виявлення лізогенного стану молочнокислих бактерій.
2. Відібрано та запропоновано залучати до складу заквашувальних композицій для сиру кисломолочного, ряжанки та сметани у ротаціях фагостійкі штами молочнокислих бактерій, які не містять індуцибельних профагів.
3. Відібрано 5 штамів виду *L. lactis ssp. lactis*, які відповідають вимогам до тест-культури для визначення і виділення бактеріофагів, а також проведення фагового моніторингу кисломолочної продукції, за наступними критеріями: по-перше, нелізогенністю; по-друге, чутливістю до широкого спектру

бактеріофагів; по-третє, здатністю забезпечувати ефективну репродукцію фагів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- 1- *Daly C, Fitzgerald G.F., Davis R.* Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance//*Antonie van Leeuwenhoek.* - 1996. – 70. – P. 99-110.
- 2- *Moineau S.* Applications of phage resistance in lactic acid bacteria// *Antonie van Leeuwenhoek.*- 1999. - 76. - P. 377-382.
- 3- *Mollet B., Pridmore D., Zwahlen M. C.* Phage-resistant streptococcus // Nestec S.A. (Vevey, CH). Pat.No.: US – 5766904 – надрук. 16.06.1998.
- 4- *Davidson B.E., Powell I.B., Hillier A.J.* Temperate bacteriophages and lysogeny in lactic acid bacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1990. – 87, No. 1. – P. 79-90.
- 5- *Stephen Mc Grath, Gerald F. Fitzgerald, Douwe van Sinderen* Bacteriophages in dairy products: Pros and con// *Biotechnology Journal.* – 2007. – Vol. 2. - № 4. – P. 450 – 455.
- 6- *Адамс М.* Бактериофаги. – М.: Мир. - 1961. – 527 с.
- 7- *Рауменштейн Я.И.* Лизогения и ее биологическое значение// *Успіхи мікробіології.* – 1971. Вып. 7. – С.233-239.
- 8- *Тараканов Б.В.* Лизогения среди культур *Streptococcus bovis*, выделенных из рубца коров и овец// *Микробиология.* - 1974. - т.43, № 2. - С.375-377.
- 9- *Мытник Л.Г., Беспалова И.А., Тихоненко А.С.* Сравнительное изучение умеренных и вирулентных фагов мезофильных молочнокислых стрептококков// *Прикладная биохимия и микробиология.* - 1975., том 9, вып. 6.- С.819-823.
- 10- *Kilic A.O., Pavlova S.I., Wen-Ge Ma, Lin Tao* Analysis of Lactobacillus phages and bacteriocins in american dairy products and characterization of phage isolated from yogurt// *Applied and Environmental Microbiology.*- 1996. - Vol.62, N6. - P. 2111-2116.
- 11- *Lowrie R.J.* Lysogenic strains of group N lactic streptococci// *Applied Microbiology.*- 1974. - Vol. 27, N 1. - P. 210-217.

12- Тараканов Б.В. Биология лизогенных штаммов *Streptococcus bovis* и вирулентных мутантов их умеренных фагов// Микробиология. – 1996. – т.65, № 5. – С. 656-662.