

*Е.М. Кононович, Н.Н. Фурик, к.т.н.  
РУП «Институт мясо–молочной промышленности»*

## **СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ХРАНЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

*Исследована жизнеспособность бактериофагов молочнокислых бактерий р. *Lactococcus lactis* при хранении в жидком, замороженном и лиофилизированном виде. Выживаемость вирусных частиц при всех способах хранения видоспецифична. Показано, что выживаемость бактериофагов при хранении в жидком и замороженном виде снижается пропорционально временным рамкам. Выживаемость бактериофагов при хранении в лиофилизированном виде интенсивно снижается в течение первого года хранения, в течение последующих двух лет изменяется в сторону уменьшения незначительно. Выявлено, что наиболее пригодны для лиофилизации и дальнейшего хранения бактериофагов в лиофилизированном виде сложные защитные среды.*

**Введение.** Создание и поддержание коллекций микроорганизмов как способов сохранения биоразнообразия является актуальной экологической проблемой. В настоящее время хранение микроорганизмов в жизнеспособном состоянии осуществляется в коллекциях культур, которые создаются в большинстве микробиологических лабораторий и на биотехнологических производствах и используются как в промышленных, так и в исследовательских целях. Главной задачей консервации микроорганизмов является обеспечение их долгосрочного хранения с поддержанием высокой жизнеспособности и предупреждением мутационных изменений, т.е. в состоянии максимально близком к естественному.

В РУП «Институт мясо-молочной промышленности» поддерживается коллекция промышленных бактериофагов молочнокислых бактерий, выделенных на молокоперерабатывающих предприятиях Беларуси. В ней поддерживается 129 фагов молочнокислых бактерий. Коллекция бактериофагов используется при выделении и идентификации заквасочных культур, при тестировании коллекционных культур и их комбинаций при производстве бактериальных концентратов, для направленной селекции по получению фагоустойчивых штаммов и при проведении научно-исследовательских работ.

Цель работы. Изучить выживаемость бактериофагов лактококков при хранении в жидком, замороженном и лиофилизированном виде.

**Объекты и методы исследования.** Для изучения выживаемости бактериофагов лактококков (*Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* и *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis*) были получены образцы лизатов с титром  $10^9$  БОЕ/см<sup>3</sup> на основе физиологического раствора и на основе питательной среды (жидкого гидролизованного обрата) методом Грациа [2].

Фаголизаты заложены на хранение следующими способами [1]:

– в жидком виде (температуры хранения  $+(4\pm 2)$  °С,  $+(22\pm 2)$  °С);

– в замороженном виде (температура хранения  $-(18\pm 2)$  °С);

– в лиофилизированном виде с различными защитными средами: 14%-ное сухое обезжиренное молоко (СОМ), гидролизованный обрат, сахарозо-желатиновый агар (СЖА), лактозо-желатиновый агар (ЛЖА), СЖА + 10%-ное СОМ в соотношении 1:1, 14%-ное СОМ + 5% инозита, 20%-ное СОМ, 20%-ное СОМ + 5% инозита. В качестве контрольной защитной среды использовали дистиллированную воду. Отпаянные под вакуумом ампулы закладывали на хранение при температуре  $+(4\pm 2)$ °С.

В половину жидких и замороженных фаголизатов добавили по несколько капель хлороформа, чтобы изучить его влияние на выживаемость фагов (хлороформ применяют для предотвращения загрязнения фаголизата бактериальной микрофлорой) [2].

Выживаемость бактериофагов определяли по формуле (1) – отношение числа образовавшихся негативных колоний после определенного времени хранения к исходному числу колоний:

$$W = \frac{\lg N}{\lg N_0} \times 100\%, \quad (1)$$

где  $W$  – выживаемость бактериофагов, %,  $N$  – титр фаговых частиц после определенного времени хранения, БОЕ/ см<sup>3</sup>,  $N_0$  – исходный титр фага, БОЕ/ см<sup>3</sup>.

**Результаты и их обсуждение.** Исследовали выживаемость бактериофагов молочнокислых бактерий в течение 12 месяцев хранения в жидком (табл. 1, рис. 1, 2) и замороженном виде (рис. 3), в течение 3 лет хранения в лиофилизированном виде.

Установлено, что выживаемость бактериофагов молочнокислых бактерий при хранении в жидком виде при температуре  $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$  через два месяца составила 29,9%, а через пять – 0%.

Таблица 1 – Выживаемость бактериофагов молочнокислых бактерий в течение 12 месяцев хранения при  $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$

| Показатель                                     | № фаголизата        |                     |                      |
|--|---------------------|---------------------|----------------------|
|  | 122/10у             | 127/33              | 129/83               |
| Начальный титр фаголизата, БОЕ/см <sup>3</sup> | 2,7·10 <sup>9</sup> | 3,5·10 <sup>9</sup> | 5,72·10 <sup>9</sup> |
| Выживаемость бактериофагов                     |                     |                     |                      |
| через 1 месяц                                  | <u>99,96±0,81</u>   | <u>94,56±0,76</u>   | <u>98,60±0,79</u>    |
|  | 100±0,71            | 94,02±0,73          | 98,71±0,75           |
| через 3 месяца                                 | <u>96,03±0,74</u>   | <u>88,17±0,80</u>   | <u>94,49±0,77</u>    |
|  | 91,21±0,74          | 88,17±0,82          | 95,49±0,79           |
| через 6 месяца                                 | <u>94,88±0,75</u>   | <u>64,27±0,77</u>   | <u>87,75±0,78</u>    |
|  | 90,01±0,76          | 73,43±0,79          | 87,05±0,77           |
| через 12 месяцев                               | <u>88,0±0,69</u>    | <u>50,3±0,67</u>    | <u>67,07±0,70</u>    |
|  | 87,2±0,68           | 53,9±0,69           | 65,5±0,67            |

Примечание: над чертой – выживаемость бактериофагов без добавления хлороформа, под чертой - выживаемость бактериофагов с добавлением хлороформа.

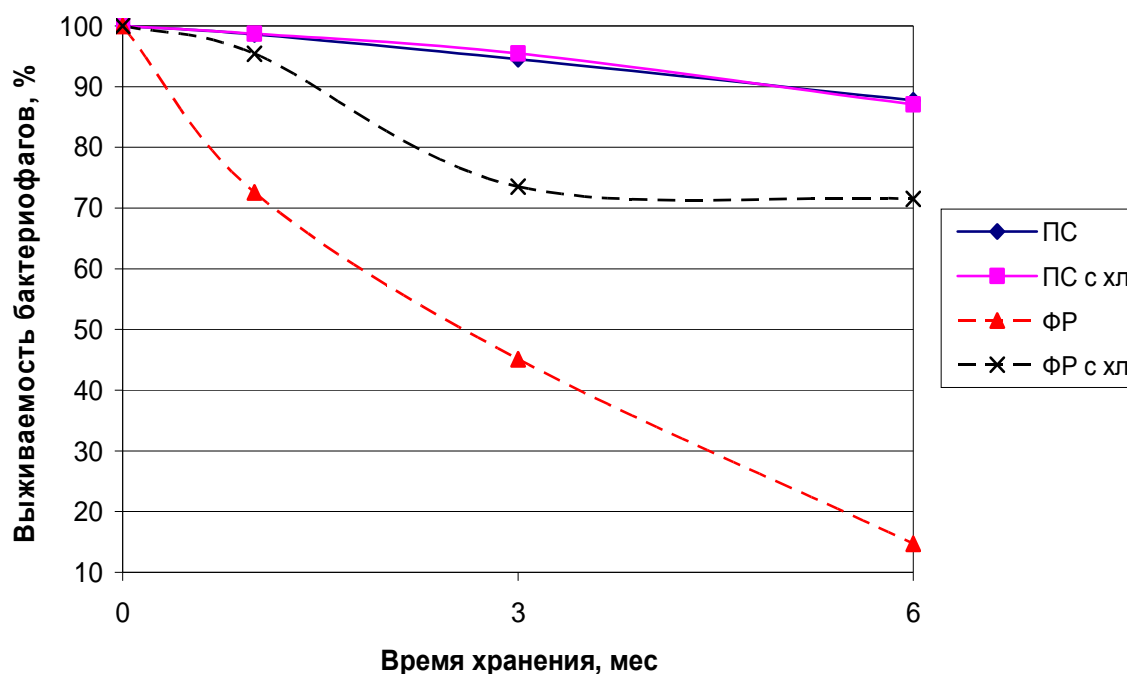


Рисунок 1 – Сравнительная характеристика выживаемости бактериофага № 129, полученного на основе питательной среды (ГО) и физиологического раствора

При хранении в жидком виде титр исследуемых бактериофагов снижался равномерно в течение всего времени хранения. После шести месяцев хранения выживаемость бактериофагов, полученных на основе ГО, составила  $(82,9 \pm 15,3)\%$ , через год –  $(68,5 \pm 18,8)\%$  (табл. 1). Количе-

ство фаговых частиц в контрольных лизатах, полученных с использованием физиологического раствора, снижалось более интенсивно, чем в фаголизатах, приготовленных на основе питательной среды (рис. 1). Через шесть месяцев хранения выживаемость фагов в контрольных лизатах была на 39% ниже, чем в опытных образцах.

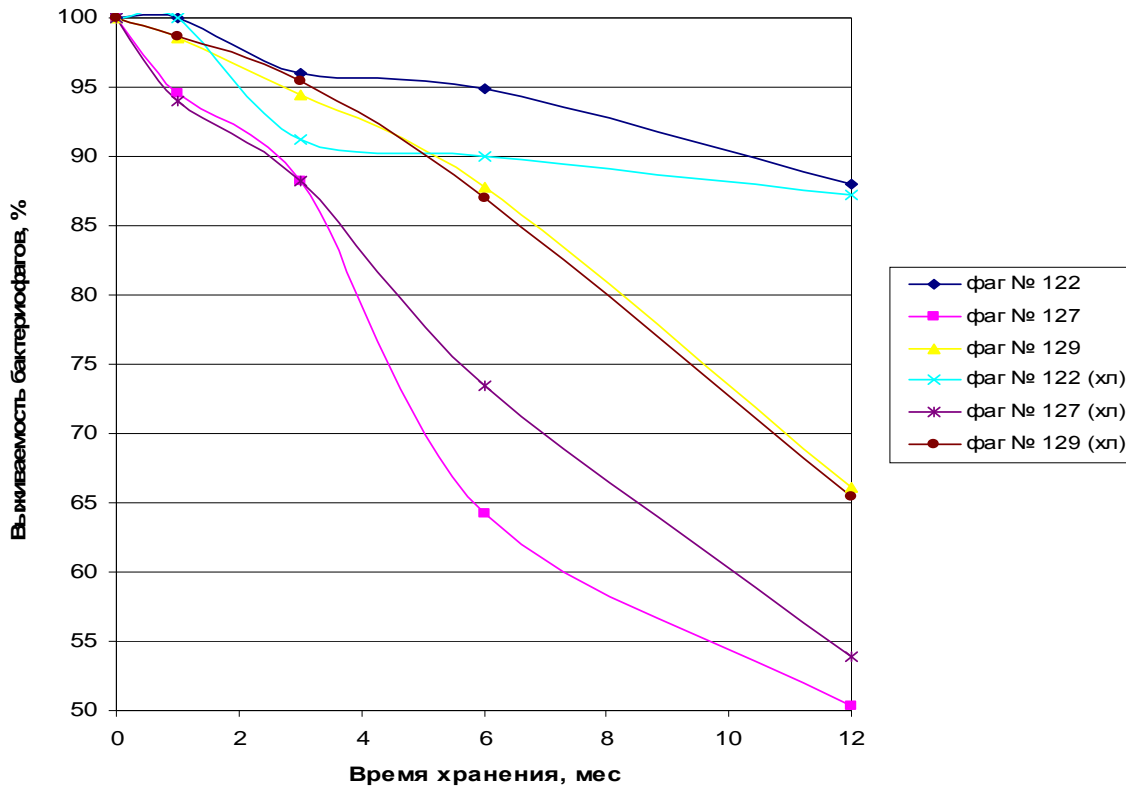


Рисунок 2 – Влияние хлороформа на выживаемость бактериофагов лактококков при хранении в виде лизатов на основе питательной среды в жидком виде при температуре  $+ (4 \pm 2) ^\circ\text{C}$

На рис. 2 видно, что выживаемость бактериофагов в лизатах, полученных на основе питательной среды с добавлением или без хлороформа, практически одинакова, т.е. хлороформ в данном количестве не оказывает влияние на фаговые частицы.

Титр фаговых частиц при хранении в жидком виде зависит от стабильности температурного режима. Выживаемость фага при хранении в течение шести месяцев при температуре  $+(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$  составила 86,8%. В то же время выживаемость того же фага при комбинированном температурном режиме (хранение при  $+(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$  с периодическим кратковременным повышением температуры до  $+(18 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ) составила 64,3%.

Таким образом определено, что при температуре  $(4 \pm 2) \text{ }^{\circ}\text{C}$  лизаты фагов молочнокислых бактерий могут храниться не более 12 месяцев, при использовании комбинированного температурного режима (хранение при  $(4 \pm 2) \text{ }^{\circ}\text{C}$  с периодическим кратковременным повышением температуры до  $(18 \pm 2) \text{ }^{\circ}\text{C}$  – не более 6 месяцев. Более устойчивы в хранении фаголизаты, получаемые с использованием ГО.

Изучено влияние процесса замораживания на выживаемость фаговых частиц.

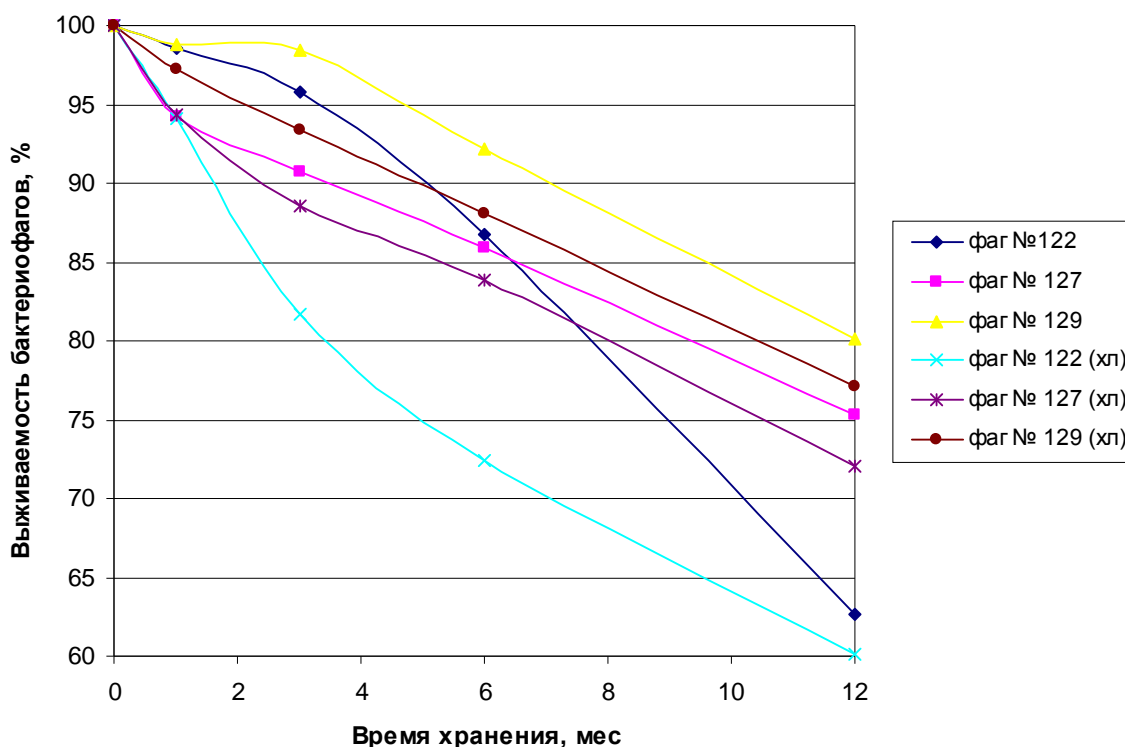


Рисунок 3 – Выживаемость бактериофагов молочнокислых бактерий при хранении в замороженном состоянии при температуре  $-(18 \pm 2) \text{ }^{\circ}\text{C}$

После замораживания титр бактериофагов уменьшился незначительно, выживаемость составила  $(96,2 \pm 2,3)\%$ . При дальнейшем хранении в замороженном виде выживаемость фагов в лизатах, полученных с использованием ГО, через шесть месяцев составила  $(84,8 \pm 9,8)\%$ , а через год –  $(71,2 \pm 10,0)\%$ . Таким образом, количество фаговых частиц в контрольных лизатах, полученных с использованием физиологического раствора, на 14% больше, чем в фаголизатах, приготовленных на ГО.

Показано, что выживаемость фагов, хранящихся при температуре  $-(18 \pm 2) \text{ }^{\circ}\text{C}$  на 5–7% выше, чем при использовании комбинированного

температурного режима (периодическое кратковременное повышение температуры от  $-(18\pm 2)^\circ\text{C}$  до  $+(18\pm 2)^\circ\text{C}$ .

Использование для получения фаголизатов полноценной питательной среды (ГО или др.)

Во время процесса лиофилизации титр бактериофагов молочнокислых бактерий снижается, выживаемость фагов в зависимости от используемых защитных сред составила  $(92,6\pm 6,6)\%$ . Проверка жизнеспособности лиофилизированных бактериофагов, которую проводили через 0,5, 1,5 и 3 лет хранения при температуре  $(+4\pm 2)^\circ\text{C}$  показала, что выживаемость зависела от вида фага и состава защитной среды. Самая высокая степень выживаемости у обоих фагов наблюдается при использовании в качестве защитной среды СЖА. Защитная среда, включающая 14% ОМ + 5% инозита, подходит не для всех фагов. При использовании вместо защитной среды дистиллированной воды (контроль) выживаемость фагов составила  $(66,3\pm 7,2)\%$ , что свидетельствует о эффективности использования защитных сред при лиофилизации бактериофагов.

Таблица 2 – Влияние защитных сред на выживаемость бактериофагов в процессе хранения

| Защитная среда        | Фаг № 122/10у   |                               |                        |                      | Фаг № 127/33  |                               |                        |                      |
|-----------------------|---|-------------------------------|------------------------|----------------------|---|-------------------------------|------------------------|----------------------|
|                       | Титр фаголизата после лиофилизации, БОЕ/см <sup>3</sup> | Выживаемость бактериофагов, % |                        |                      | Титр фаголизата после лиофилизации, БОЕ/см <sup>3</sup> | Выживаемость бактериофагов, % |                        |                      |
|                       |   | после 0,5 года хранения       | после 1,5 лет хранения | после 3 лет хранения |   | после 0,5 года хранения       | после 1,5 лет хранения | после 3 лет хранения |
| 14% ОМ                | $1,78 \cdot 10^7$                                       | 94,2                          | 81,4                   | 72,1                 | $9,0 \cdot 10^7$  | 75,2                          | 66                     | 60,5                 |
| СЖА                   | $3,0 \cdot 10^7$  | 89,8                          | 84,3                   | 80,6                 | $1,084 \cdot 10^8$                                      | 81,1                          | 78,8                   | 77,9                 |
| ЛЖА                   | $6,1 \cdot 10^7$  | 86,7                          | 80                     | 75,2                 | $1,15 \cdot 10^8$                                       | 79,1                          | 77,1                   | 75,9                 |
| СЖА+14% ОМ (1:1)      | $3,5 \cdot 10^7$  | 89,4                          | 80,9                   | 76                   | $9,0 \cdot 10^7$  | 78,9                          | 76,6                   | 74,9                 |
| 14% ОМ + 5% инозита   | $3,51 \cdot 10^7$                                       | 91,6                          | 88,5                   | 86,2                 | $6,31 \cdot 10^7$                                       | 82                            | 67,5                   | 63,4                 |
| Дистиллированная вода | $3,51 \cdot 10^7$                                       | 72,8                          | 66,6                   | 61,8                 | $3,96 \cdot 10^7$                                       | 73,9                          | 63,8                   | 59,1                 |

В течение первых шести месяцев снижение титра лиофилизированных бактериофагов происходило так же, как и при других способах хранения. Выживаемость составила  $(84,8\pm 7,6)\%$ . Однако при дальнейшем хранении снижение количества фаговых частиц в ампулах замедляется, и выживаемость через 1,5 года хранения составила  $(78,1\pm 11,2)\%$ , а через три года –  $(74,3\pm 12,8)\%$ , что свидетельствует о возможности про-

должительного хранения бактериофагов молочнокислых бактерий в лиофильном виде.

**Заключение.** Изучение влияния процесса замораживания и лиофилизации на фаговые частицы показало, что в процессе замораживания выживаемость фагов составляет  $(96,2 \pm 2,3)\%$ , при лиофилизации –  $(92,6 \pm 6,6)\%$ .

Установлено, что при хранении в жидком виде и при замораживании титр бактериофагов снижается равномерно в течение всего времени хранения. При этом количество фаговых частиц в контрольных лизатах, полученных с использованием физиологического раствора, снижается более интенсивно, чем в фаголизатах, приготовленных на основе питательной среды (ГО). Использование хлороформа в количестве 1,5% не оказывает влияние на выживаемость фаговых частиц.

Титр фаговых частиц при хранении в жидком и замороженном виде зависит от стабильности температурного режима: при использовании комбинированного температурного режима выживаемость фаговых частиц уменьшается.

При хранении лиофилизированных фагов уменьшение фаговых частиц происходит интенсивнее в течение первого года хранения, а на второй и третий год количество выживших бактериофагов практически неизменно.

Использование защитных сред повышает количество жизнеспособных фаговых частиц не только в процессе лиофилизации, но и при дальнейшем их хранении.

### Литература

1. Сидякина, Т.М. Консервация генетических ресурсов. Консервация микроорганизмов / Т.М. Сидякина. – Пущино, 1985.– 48 с.
2. Адамс, М. Бактериофаги. / М. Адамс М. – 1961. С. 51–62.
3. Фурик, Н.Н. Влияние состава защитных сред на выживаемость бактериофагов молочнокислых бактерий при лиофилизации / Н.Н. Фурик, Е.М. Кононович, А.Н. Картель // Пищевая промышленность: наука и технология. – 2009. – №3(5). – С. 36–39.

*K. Kononovich, N. Furik*

## **COMPARISON OF METHODS OF STORAGE OF LACTOCOCCAL BACTERIOPHAGES**

### **Summary**

Vitality of bacteriophages of lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* is investigated at storage in liquid, frozen and freeze-drying condition. Survival of virus particles at all ways of storage is species-specific. It was revealed that the survival of bacteriophages at storage in the liquid and frozen condition decreases to proportionally time frameworks. The survival of bacteriophages at storage in freeze-drying condition intensively decreases within the first year of storage, within the next two years changes towards reduction slightly. It is revealed that difficult protective environments are most suitable for freeze-drying process and the further storage of bacteriophages in a dried condition.