

*И.В. Кирик, С.Б. Борунова, С.Л. Василенко, к.б.н., Н.Н. Фурик, к.т.н.  
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь*

## **ИЗУЧЕНИЕ СОХРАННОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ ЛАКТОКОККОВ ПРИ ХРАНЕНИИ ЛИЗАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ НА РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ**

*I. Kirik, S. Borunova, S. Vasylenko, N. Furyk  
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus*

### **THE LACTOCOCCAL BACTERIOPHAGES SURVIVABILITY STUDY IN STORAGE OF LYSATES THAT WERE OBTAINED IN DIFFERENT MEDIA**

*e-mail: inna.kirik.1990@mail.ru, vikalana@tut.by, vasylenko@tut.by, furik\_nn@tut.by*

*В статье проведен анализ сохранности лактококкофагов, относящихся к разным видам (из вида C2 – к разным внутривидовым группам), полученным на шести питательных средах и заложенным на хранение при температуре  $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ . Определены наиболее оптимальные среды для хранения бактериофагов в данных условиях в течение 12 месяцев.*

*The article analyzes the survivability of different lactococcophages species (in species C2 belonging to different intraspecies groups) that were obtained in six nutrient media and were stored at a temperature of  $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ . The most optimal media were determined for storage of bacteriophages in these conditions within 12 months.*

**Ключевые слова:** бактериофаги; молочнокислые бактерии; фаголизис; лизаты; питательные среды; концентрация фагов.

**Keywords:** bacteriophages; the lactic acid bacteria; phage lysis; lysates; nutrition media; phage concentration.

**Введение.** Лактофаги — вирусы бактерий рода *Lactococcus* — представляют собой весьма обширную и достаточно хорошо изученную группу вирулентных и умеренных фагов. Они вызывают неослабевающий интерес исследователей, прежде всего из-за экономических издержек, которые несут предприятия молочной промышленности в результате фаголизиса. Поскольку в производстве ферментированных молочных продуктов на территории Республики Беларусь чаще других используют молочнокислые бактерии, относящиеся к роду *Lactococcus*, то и фаги, вирулентные по отношению к данным бактериям, распространены на молочных комбинатах наиболее широко. По оценкам зарубежных коллег, до 2/3 всех процессов ферментации осуществляется молочнокислыми бактериями *Lactococcus lactis* [1], и именно лактофаги являются причиной большинства неудачных технологических процессов при выработке кисломолочных продуктов, как в нашей стране, так и за ее пределами [2–4].

Бактериофаги молочнокислых бактерий активно применяются производителями заквасок для селекции штаммов бактерий, устойчивых к вирусной инфекции. Для проведения эффективной селекционной работы создаются производственные коллекции бактериофагов. Одной из действенных профилактических мер, призванных ограничить экономические потери от фаголизиса при производстве кисломолочных продуктов, а также снизить риск контаминации готовой продукции патогенной микробиотой, является непрерывный фаговый мониторинг в каждой конкретной географической местности [3, 5].

Результативность фагового мониторинга зависит от эффективности используемых методов обнаружения лактофагов, их дифференциации и идентификации. Эти методы призваны обеспечить систематизацию всего многообразия выделенных фагов для

возможности своевременного выявления новых изолятов и получения по отношению к ним устойчивых штаммов заквасочных бактерий.

РУП «Институт мясо-молочной промышленности» является единственным в Республике Беларусь изготовителем заквасок молочнокислых бактерий. В институте разработаны технологии изготовления различных видов одно- и многоштаммовых, моно- и поливидовых бактериальных заквасок. Для селекции фагоустойчивых штаммов в институте сформирована собственная коллекция бактериофагов молочнокислых бактерий, выделенных в Беларуси на молочных предприятиях с неблагоприятной фаговой ситуацией и из кисломолочной продукции, приобретенной в розничной торговле [6, 7].

При создании подобных депозитариев неизменно ставится вопрос о длительном хранении вирусов. Также важно в процессе выделения и особенно последующего хранения сохранить генетические и физиологические свойства полученных бактериофагов для наиболее достоверного выбора фагоустойчивых молочнокислых бактерий, входящих в состав заквасок. Длительное поддержание вирусов в коллекции необходимо также и для использования их при проведении научно-исследовательских работ.

В настоящее время исследований, касающихся непосредственно изучения максимальной длительности хранения фагов лактококков с поддержанием высокого титра и постоянства свойств, проведено не много. Все предлагаемые способы длительного хранения бактериофагов имеют определенные недостатки. К тому же универсального метода хранения вирусов не существует. Разные лактофаги могут переносить один и тот же способ хранения по-разному [8]. Возможно, это связано с различиями на генетическом уровне (разный вид лактофагов).

Таким образом, актуальной задачей является выбор оптимального способа длительного хранения для разных видов вирусов и изучение влияния различных факторов на увеличение выживаемости и сохранение свойств фагов при хранении выбранным способом.

**Целью исследований** являлось изучение сохранности бактериофагов в жидких лизатах, хранящихся в течение 12 месяцев при температуре  $(4\pm 2)^\circ\text{C}$  на различных средах.

#### **Материалы и методы исследований.**

В работе использовали четыре бактериофага лактококков – л2/1 (вид С2 группа 3), л23/1 (вид С2 группа 1), л40/1 (вид Р335), 16 (вид 936), а также индикаторные культуры лактококков из Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов РУП «Институт мясо-молочной промышленности».

Получение лизатов осуществляли в средах MRS [0], M17 [10], m-MRS [11], ПГС [6], ГО [12], ВОМ-10 [0]. Инкубирование культур осуществляли в термостате при  $30\pm 1^\circ\text{C}$ .

*Получение фаголизата на питательной среде.* В пробирку с  $(1,0\pm 0,01)$  см<sup>3</sup> жидкой питательной среды вносят бактериологической петлей индикаторную культуру и фаголизат, после чего выдерживают в течение  $(25\pm 5)$  мин. Затем  $0,3\text{--}0,5$  см<sup>3</sup> инфицированного бульона вносят в пробирку с 0,6% питательным агаром и засевают в чашки Петри методом агаровых слоев. При получении на чашке Петри сплошной зоны лизиса, в чашку добавляют  $5\text{--}7$  см<sup>3</sup> жидкой питательной среды и тщательно ресуспендируют верхний слой в добавленной среде. Полученный фаголизат очищают от бактериальных клеток и остатков агара путем центрифугирования при 5 тыс. об./мин в течение 30 мин.

#### *Определение количества жизнеспособных фаговых частиц.*

Для количественного определения содержания бактериофагов в полученном фаголизате готовят разведения лизата в стерильном физиологическом растворе.

В чашку Петри вносят  $20\pm 2$  мл расплавленной агаризованной плотной среды ГО и

высушивают в течение 1,5–2 ч. В 5 мл расплавленной 0,6% агаризованной среды ГО, охлажденной до  $47\pm 2^\circ\text{C}$ , вносят  $0,3\text{ см}^3$   $16\pm 2$  ч культуры индикаторного штамма и  $1\text{ см}^3$  исследуемой пробы фаголизата из соответствующего разведения. Содержимое пробирок круговыми движениями перемешивают, выливают на поверхность чашек Петри с нижним слоем застывшей среды и равномерно распределяют по поверхности. После застывания верхнего слоя чашки Петри переворачивают вниз крышками и инкубируют в термостате при  $30\pm 1^\circ\text{C}$  в течение  $16\pm 2$  ч.

Количество фагов в определенном объеме исследуемой пробы определяют по количеству образовавшихся негативных колоний, учитывая используемое разведение.

**Результаты и их обсуждение.** Несмотря на то, что наиболее оптимальным способом сохранения бактериофагов является их лиофильное высушивание, не всегда удобно использовать сухую форму фагов для проведения тестирования культур. Более оптимальным в плане удобства применения является использование жидких или замороженных лизатов, в которых вирусы находятся в высоком титре. В то же время известно что при хранении лизатов в жидкой форме при температуре  $2\text{--}8^\circ\text{C}$  происходит снижение количества вирулентных фагов, что может приводить к искажению результатов по определению фагоустойчивости заквасочных культур и их комбинаций.

Для проведения исследований по изучению сохранности лактофагов выбраны вирусы, относящиеся к разным видам, а из вида С2 – к разным внутривидовым группам [7]:

- вид Р335 – фаг л40/1;
- вид 936 – фаг 16;
- вид С2 группа 1 – фаг л23/1;
- вид С2 группа 3 – фаг л2/1.

Как было показано ранее, установлены факторы, оказывающие наиболее значительное влияние на сохранность бактериофагов: питательная среда, на которой получен лизат бактериофага, концентрация фагов в суспензии, скорость замораживания (медленная или быстрая заморозка); температура хранения фаголизатов; наличие или отсутствие протекторных веществ; состояние замораживаемого объекта: свободное или адсорбированное на стенках бактериальной клетки [14].

Для выполнения данного исследования использовали шесть питательных сред для получения лизатов: MRS, mod-MRS, ПГС, М-17, ГО, ВОМ-10. При получении лизатов на среде ВОМ-10 применяли метод совместного культивирования фага и индикаторной культуры с последующим отделением белка и получением готовых лизатов. На остальных средах накопление вирусов осуществляли с использованием метода агаровых слоев. Получено по 25 мл фаголизата каждого фага на шести исследуемых питательных средах (всего – 24 фаголизата), количество вирусных частиц в которых составило от  $4,45\times 10^7$  БОЕ/мл для фага л40/1, полученного на среде М17, до  $7,95\times 10^9$  БОЕ/мл для фага л2/1, полученного на среде ПГС (рисунки 1–6).

Все полученные лизаты разлили по 0,5 мл в стерильные пробирки типа «Эппендорф» и поместили на хранение в условиях холодильника при температуре  $(4\pm 2)^\circ\text{C}$  для последующего определения выживаемости фагов и сохранения ими вирулентных свойств.

Анализ выживаемости лактофагов и сохранения ими вирулентных свойств у лизатов, полученных на шести питательных средах, проводили через 6 и 12 месяцев хранения при температуре  $(4\pm 2)^\circ\text{C}$  (рисунки 1–6).

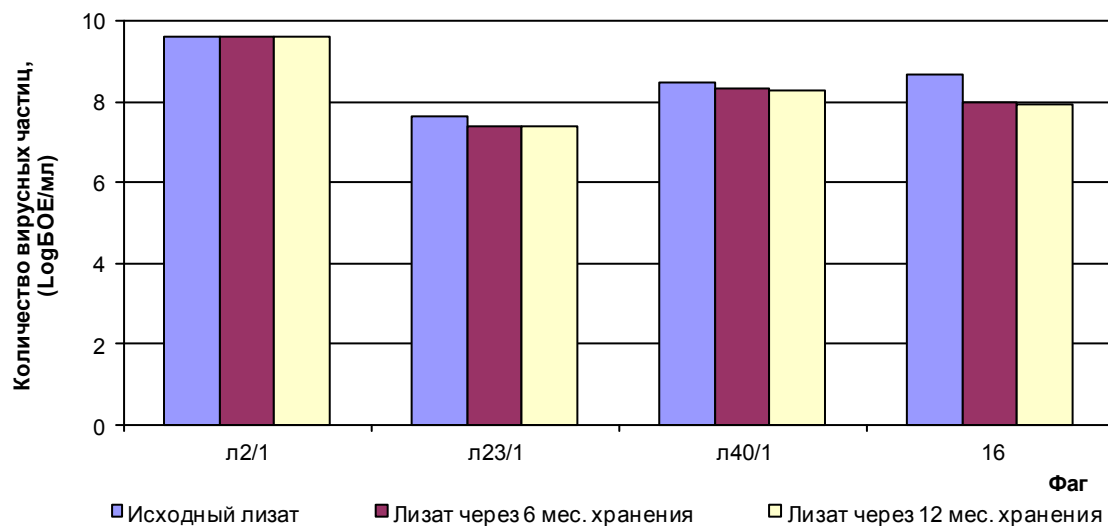


Рисунок 1 – Изменение количества вирусных частиц в лизатах, полученных на среде MRS, при хранении при температуре  $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ , LogBOE/мл

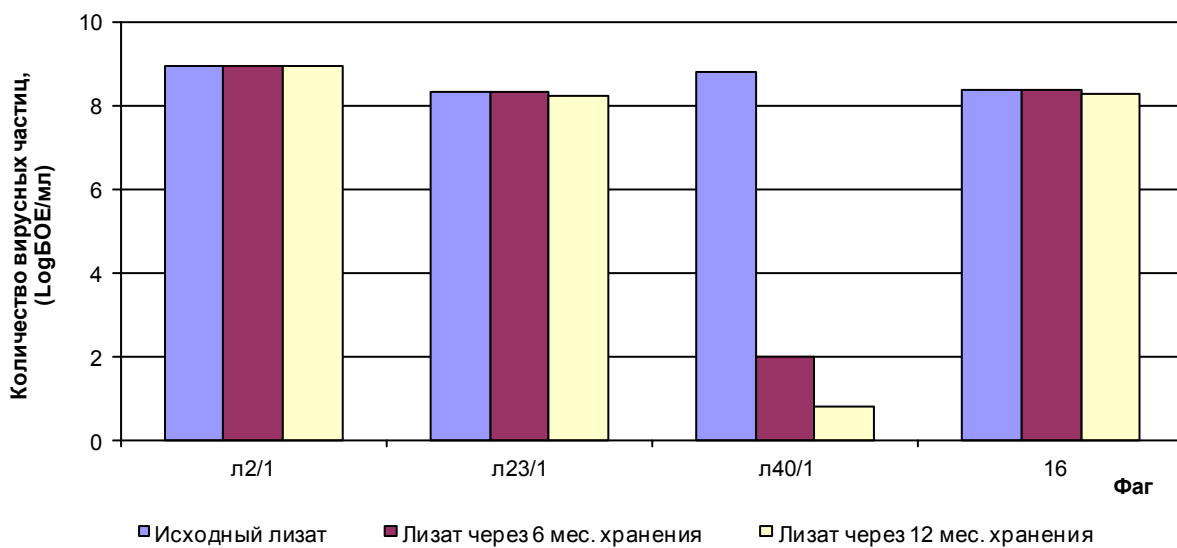


Рисунок 2 – Изменение количества вирусных частиц в лизатах, полученных на среде m-MRS, при хранении при температуре  $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ , LogBOE/мл

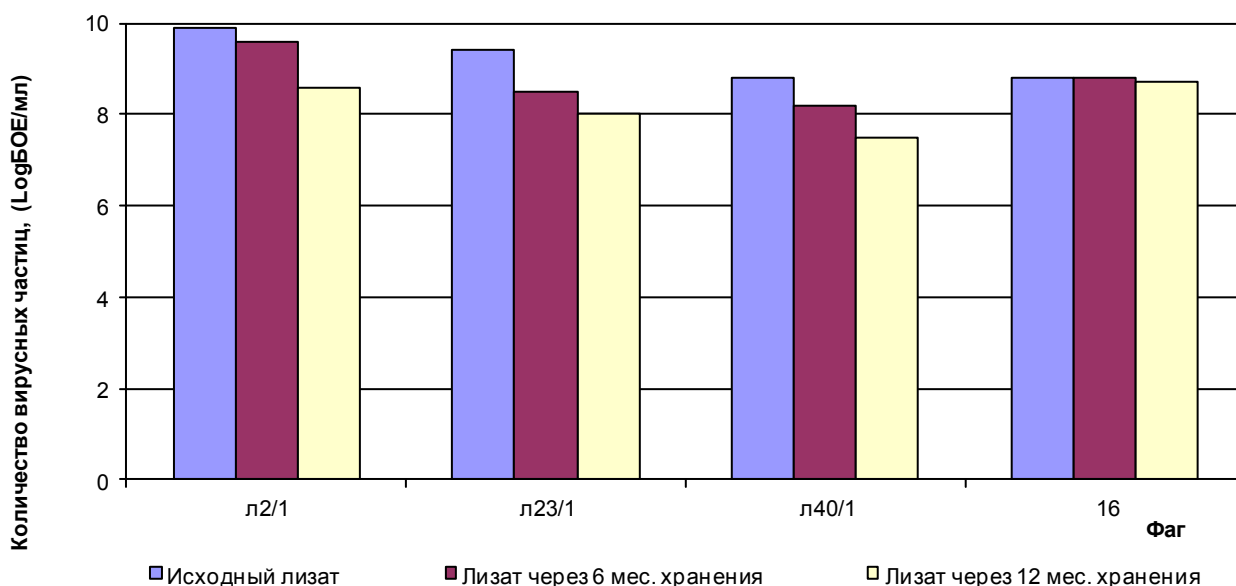


Рисунок 3 – Изменение количества вирусных частиц в лизатах, полученных на среде ПГС, при хранении при температуре  $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ , LogBOE/мл

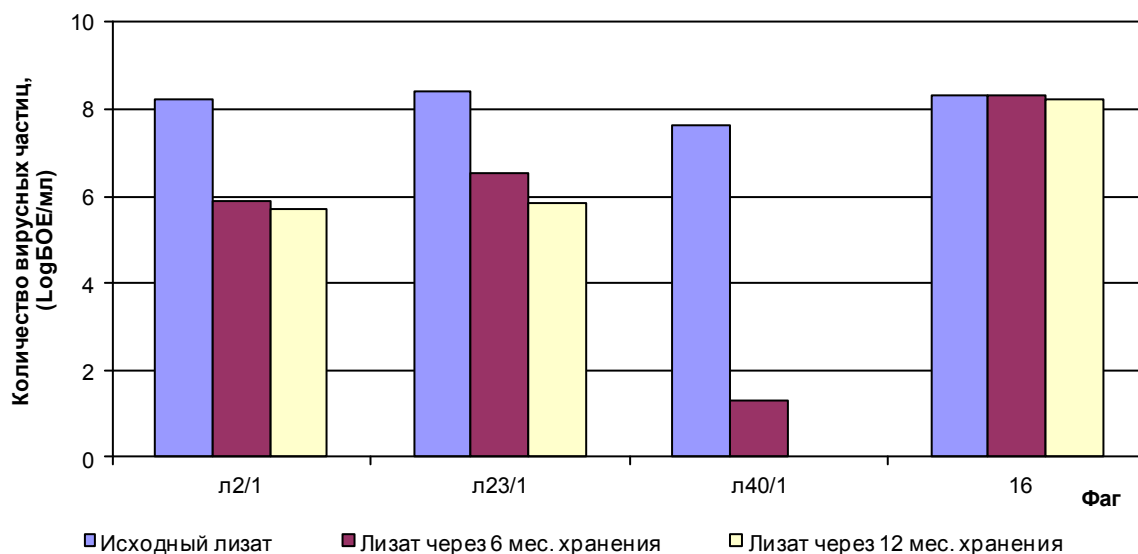


Рисунок 4 – Изменение количества вирусных частиц в лизатах, полученных на среде M17, при хранении при температуре  $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ , LogBOE/мл

Как видно на рисунках 1–6, для получения лизатов лактококкофагов и последующего хранения при температуре  $(4\pm 2)^\circ\text{C}$  наиболее оптимальными являются среды MRS и ГО – именно на этих средах не произошло значительного снижения количества вирусных частиц в лизате – максимально количество вирусных частиц снизилось в 6 раз и в 16 для фага 16, соответственно, при хранении на средах MRS и ГО. Что касается остальных сред, то при их использовании количество вирусных частиц через 12 месяцев хранения снижается для некоторых фагов практически в 20–24 раза (при хранении на среде ПГС) или более раз (на среде BOM-10). На среде m-MRS три лизата бактериофагов полностью сохранили то количество вирусных частиц, которое

было заложено на хранение изначально, в то же время для бактериофага л40/1 регистрировали практически полную гибель. Аналогичную картину наблюдали и при использовании для накопления вирусов среды М17 – хранение фага л40/1 в ней привело к его полной гибели.

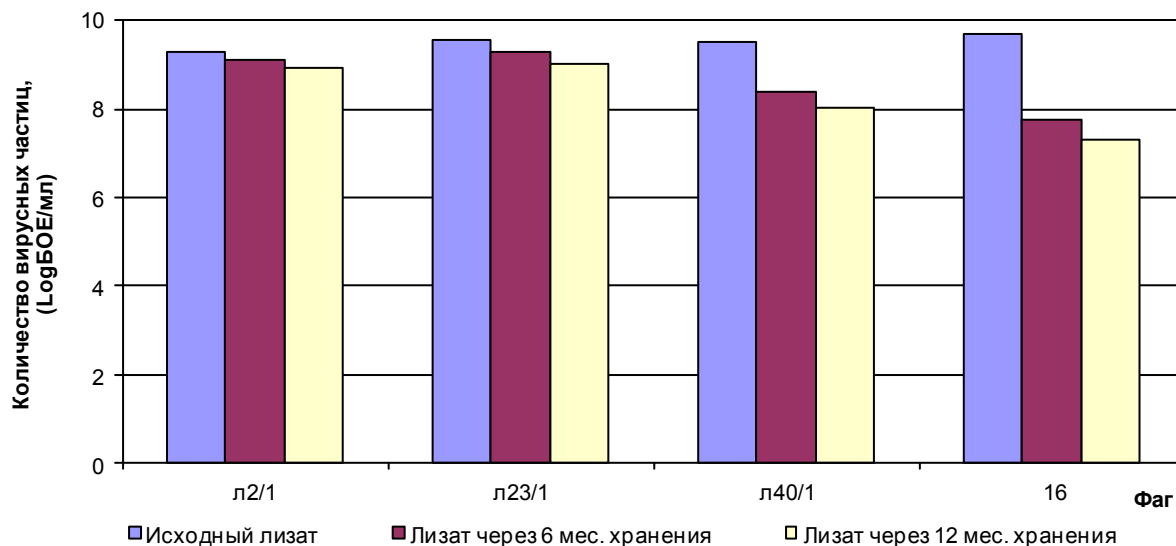


Рисунок 5 – Изменение количества вирусных частиц в лизатах, полученных на среде BOM-10, при хранении при температуре  $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ , LogBOE/мл

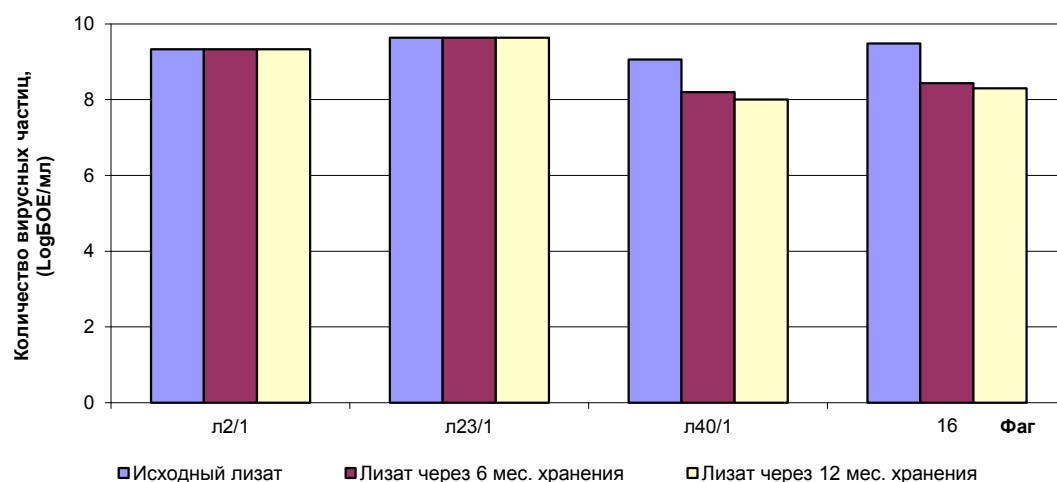


Рисунок 6 – Изменение количества вирусных частиц в лизатах, полученных на среде ГО, при хранении при температуре  $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ , LogBOE/мл

Таким образом, для получения лизатов бактериофагов с целью обеспечения длительного хранения без значительной потери их выживаемости возможно использовать среды MRS и ГО. При использовании сред ПГС и BOM-10 – может происходить снижение вирусных частиц практически в 20 (на среде ПГС) – 200 (на среде BOM-10) раз. Использование сред m-MRS и M17 для хранения вирусных частиц в активном состоянии нецелесообразно, так как эти среды подходят не для всех групп фагов.

**Заключение.** Исследование по изучению сохранности лактофагов, относящихся к разным видам, а из вида С2 – к разным внутривидовым группам, хранящимся при температуре  $(4\pm 2)^\circ\text{C}$  на шести питательных средах в течении 12 месяцев показало, что для длительного хранения при температуре  $(4\pm 2)^\circ\text{C}$  наиболее оптимальными являются среды MRS и ГО – именно на этих средах не произошло значительного снижения количества вирусных частиц в лизате – максимально количество вирусных частиц снизилось в 6 раз и в 16 для фага 16, соответственно, при хранении на средах MRS и ГО. Что касается остальных сред, то при их использовании количество вирусных частиц через 12 месяцев хранения снижается для некоторых фагов практически в 20–24 раза (при хранении на среде ПГС) или более, чем в 200 раз (на среде BOM-10). На среде m-MRS три лизата бактериофагов полностью сохранили то количество вирусных частиц, которое было заложено на хранение изначально, в то же время для бактериофага л40/1 регистрировали практически полную гибель. Аналогичную картину наблюдали и при использовании для накопления вирусов среды M17 – хранение фага л40/1 в ней привело к его полной гибели.

Следовательно, для получения лизатов бактериофагов с целью обеспечения длительного хранения без значительной потери их выживаемости, возможно использовать среды MRS и ГО. При использовании сред ПГС и BOM-10 – может происходить снижение вирусных частиц в 20 (на среде ПГС) – 200 (на среде BOM-10) раз. Использование сред m-MRS и M17 для хранения вирусных частиц в активном состоянии нецелесообразно, так как эти среды подходят не для всех групп фагов.

#### Список использованных источников

1. Brussow, H. Phages of dairy bacteria / H. Brussow // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2001. – Vol. 55. – P. 283–303.
2. Sanlibaba, P. Classification of virulent lactococcal bacteriophages based on protein composition and restriction endonuclease analysis / P. Sanlibaba, M. Akcelik // *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* – 2005. – P. 865–871.
3. Szczepanska, A.K. Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in Polish dairy environment / A.K. Szczepanska, M.S. Hejnowicz, P. Kolakowski, J. Bardowski // *J. Acta Biochim. Pol.* – 2007. – P. 151–158.
4. Moineau, S. Control of bacteriophages in industrial fermentation / S. Moineau, C. Levesque // In: *Bacteriophages: biology and applications.* – CRC Press, Boca Raton, Fla. – 2005. – P. 286–296.
5. Moineau, S. Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the United States / S. Moineau et al. // *J. Dairy Sci.* – 1996. – Vol. 79. – P. 2104.
6. Фурик, Н.Н. Биологические свойства бактериофагов молочнокислых бактерий / Н.Н. Фурик, Е.М. Кононович, Н.В.Образцова // *Матер. междунауч. конф. «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии».* – 2008. – Раков, Беларусь. – Т. 1. – С. 45–48.  
Furik, N.N. Biologicheskie svoystva bakteriofagov molochnokislykh bakterij [Biological properties of lactic acid bacteria bacteriophages] / N.N.Furik, E.M. Kononovich, N.V.Obrazcova // *Mater. mezhd. nauch. konf. «Sovremennoe sostojanie i perspektivy razvitija mikrobiologii i biotehnologii».* – 2008. – Rakov, Belarus'. – T. 1. – S. 45–48.
7. Казак, А.Н. Изучение распространенности бактериофагов в ферментированных молочных продуктах / А.Н. Казак, С.Л. Василенко, Н.Н. Фурик // *Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья: сб. научн. тр. 2013. Вып. 8 / РУП «Институт мяско-молочной промышленности»; редкол.: А.В. Мелешеня [и др.] – Минск, РУП «Институт мяско-молочной промышленности», 2014. С. 117–129*  
Kazak, A.N. Izuchenie rasprostranennosti bakteriofagov v fermentirovannykh molochnykh produktah [Investigation of bacteriophage prevalence in fermented milk products] / A.N. Kazak, S.L. Vasylenko, N.N. Furik // *Aktual'nye voprosy pererabotki mjasnogo i molochnogo syr'ja. Vyp. 5. RUP «Institut mjaso-molochnoj promyshlennosti»; redkol.: A.V. Meleshchenja [i dr.] – Minsk, RUP «Institut mjaso-molochnoj promyshlennosti», 2014. – S. 117–129.*
8. Jarvis, A.W. Species and type phages of lactococcal bacteriophages / A.W. Jarvis. et al. // *Intervirology.* – 1991. – Vol. 32. – P. 2.
9. De Man, J.C. A medium for the cultivation of lactobacilli / J.C. De Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe // *J. Appl. Bacteriol.* – 1960. – Vol. 23. – P. 130–135.
10. Teuber, M. The Genus *Lactococcus*. / M. Teuber, A. Geis // In: *The Prokaryotes.* – Dworkin M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.-H.; Stackebrandt, E. (Eds.), 3d ed., Springer-Verlag, New York, NY. – 2006. – P. 205–224.
11. Hammes, W.P. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium* / W.P. Hammes, N. Weiss, W.

Holzappel // In: *The Prokaryotes*. – Balows A., Troper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H. (Eds.), 2nd ed., Springer-Verlag, New York, NY. – 1992. – P. 1535–1594.

12. Банникова, Л.А. Микробиологические основы молочного производства: Справочник / Л.А. Банникова, Н.С. Королева, В.Ф. Семенихина. – М.: Агропромиздат, 1987 – 400 с.

Bannikova, L.A. Mikrobiologicheskie osnovy molochnogo pro-izvodstva: Spravochnik. [Microbiological basis of dairy industry: Reference book] / L.A. Bannikova, N.S. Koroleva, V.F. Semenihi-na. – М.: Агропромиздат, 1987 – 400 s.

13. Акбулатова, М.М. Солеустойчивость лактобацилл – основа использования штаммов в бактериальных концентратах для производства сыров / М.М. Акбулатова, С.Л. Василенко, Н.Н. Фурик // Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья. Вып. 5. РУП «Институт мясо-молочной промышленности»; редкол.: А.В. Мелешеня [и др.] – Минск, РУП «Институт мясо-молочной промышленности», 2011. – С. 108–119.

Akbulatova, M.M. Soleustojchivost' laktobacill – osnova ispol'zovanija shtammov v bakterial'nyh koncentratah dlja proizvodstva syrov [Salt tolerance of lactobacilli is the base for strains using in bacterial starter cultures for cheese production] / M.M. Akbulatova, S.L. Vasilenko, N.N. Furik // Aktual'nye voprosy pererabotki mjasnogo i molochnogo syr'ja. Vyp. 5. RUP «Institut mjaso-molochnoj promyshlennosti»; redkol.: A.V. Meleshchenja [i dr.] – Minsk, RUP «Institut mjaso-molochnoj promyshlennosti», 2011. – S. 108–119.

14. Кирик, И.В. Изучение способов хранения бактериофагов / И.В. Кирик, С.Л. Василенко, Н.Н. Фурик // Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья. Вып. 10. РУП «Институт мясо-молочной промышленности»; редкол.: А.В. Мелешеня [и др.] – Минск, ГУ «ИВЦ Минфина», 2016. – С. 122–132.

Kirik, I.V. Izuchenie sposobov hranenija bakteriofagov / I.V. Kirik, S.L. Vasilenko, N.N. Furik // Aktual'nye voprosy pererabotki mjasnogo i molochnogo syr'ja. Vyp. 10. RUP «Institut mjaso-molochnoj promyshlennosti»; redkol.: A.V. Meleshhenja [i dr.] – Minsk, GU «IVC Minfina», 2016. – S. 122–132.