

УДК 574.6

Вариабельность интегральных морфологических и литических свойств фаговых ассоциаций, циркулирующих на сыродельных предприятиях

Н.И. Одегов¹, В.В. Ткаченко¹, Р.В. Дорофеев¹,
А.Н. Иркитова², А.Н. Белов¹

¹ Сибирский научно-исследовательский институт сыроделия (Барнаул, Россия)

² Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

Variability of the Integral Morphological and Lytic Properties of Phage Associations Circulating on the Cheese Enterprises

N.I. Odegov¹, V.V. Tkachenko¹, R.V. Dorofeyev¹,
A.N. Irkitova², A.N. Belov¹

¹ Siberian Research Institute of Cheesemaking (Barnaul, Russia)

² Altai State University (Barnaul, Russia)

Рассматриваются вопросы, касающиеся актуальной проблемы бактериофагии в сыроделии, анонсированы сведения по биологии бактериофагов и методам борьбы с ними. Представлены результаты исследований на фагосодержание проб подсырной сыворотки, отобранных на одном из сыродельных предприятий Алтайского края.

Описаны использованные методы работы с системами «фаг — бактериальный хозяин» и методы получения многоштаммовых фагосодержащих субстратов, не содержащих контаминирующую бактериальную флору и сохраняющих в течение длительного времени нативные свойства локализованных в них фаговых ассоциаций.

Приведены результаты фагоскрининга культур мезофильных лактококков из коллекции ГНУ СибНИИС видов *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* и *Lactococcus lactis subsp. cremoris* по отношению к фаговым ассоциациям, содержащимся в исходных (нативных) сывороточных субстратах и их вариантах, полученных после физико-химических обработок. Определены спектр литического действия и индекс литической активности фаговых ассоциаций по отношению к опытным выборкам коллекционных культур.

Ключевые слова: подсырная сыворотка, заквасочные культуры, лактококки, многоштаммовые фагосодержащие субстраты, фаговые ассоциации, индекс литической активности.

DOI 10.14258/izvasu(2014)3.2-10

Введение. Процесс производства сыра можно рассматривать как систему технологических операций,

In the article the questions concerning an actual phage problem in cheese-making are considered. The information on phages' biology and the methods of struggle against them is announced. The results of cheese-when samples examine on phage content selected from one of the cheese enterprises in Altai Krai are presented.

The article describes applied methods of work with the systems «phage — bacterial host» and methods of reception multistrain phage-containing substrata not containing contaminating bacterial flora and keeping for a long time native properties of phage associations localized in them.

The investigation presents the results of phage-screening cultures of mesophilic *Lactococcus species* from GNU SibNIIS collection *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* and *Lactococcus lactis subsp. cremoris* towards phage associations situated in native whey substrata and their options received after physical and chemical treatments. The range of lytic activity and the lytic activity index of phage associations towards the experimental samples of collection cultures are determined.

Key words: cheese-when, bark starter culture, *Lactococcus*, multistrain phage-containing substrata, phage associations, lytic activity index.

предусматривающих в первую очередь создание оптимальных условий для развития ферментирующей за-

квасочной микрофлоры, обеспечивающей необходимую биотрансформацию компонентов молока.

Особенности сыроделия как микробиологического производства (нестерильное сырье, контакт продукта во время выработки с внешней средой, длительность процесса выработки и созревания сыра и др.) приводят к обсеменению продукта технически вредной микрофлорой и бактериофагами [1; 2].

В настоящее время считается установленным, что наиболее распространенным ингибирующим фактором, приводящим к снижению активности микрофлоры заквасок в сыроделии, является фаголизис ее клеток [3]. Естественно, что больше всего это сказывается на мезофильных лактококках как наиболее представительной части заквасочного микробиоценоза.

Установлено, что период наиболее интенсивной репродукции бактериофага совпадает со стадией наиболее активного развития лактококков и приходится на время выработки и прессования сыра.

Степень фаготолерантности природных микроорганизмов варьирует в довольно широких пределах. В частности, исследования мезофильных лактококков из коллекции Экспериментальной биофабрики НПО «Углич» показали, что среди культур вида *Lactococcus lactis subsp. lactis* (*Lc. lactis*) только 37,3% штаммов обладали более или менее высокой фагоустойчивостью. Для видов *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* (*Lc. diacetylactis*) и *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (*Lc. cremoris*) таких резистентных штаммов было 59,9 и 60,1%, соответственно [4]. Это подтверждает наличие природного соотношения между фагоустойчивыми и фагочувствительными штаммами различных систематических групп микроорганизмов, которое характеризует естественное динамическое равновесие в системе «фаг — бактериальный хозяин», управляемое едиными для всех микроорганизмов законами, сложившимися в результате их эволюции. Причем термин «фагоустойчивый» говорит лишь о более или менее высокой устойчивости данного штамма к специфическим фагам, наиболее распространенным в данный период в той или иной географической зоне и имеющимся в распоряжении исследователя.

Термоинаktivация бактериофагов определяется денатурацией их белка. Применяемые в сыроделии режимы пастеризации молока не обеспечивают гарантированной инаktivации всех бактериофагов молочнокислых бактерий [5; 6].

В основе методов предотвращения фаголизиса заквасочных культур в сыроделии лежат два принципа: полное устранение заражения бактериофагами заквасок и смеси для выработки сыра или обеспечение нормального развития заквасочной микрофлоры в присутствии бактериофагов.

Большинство «противофаговых» мер, используемых в настоящее время, базируются на идее обе-

спечения нормального течения микробиологических процессов при выработке сыра в присутствии бактериофагов [3]. Эти способы основаны на использовании различных факторов, влияющих на цикл воспроизводства фаговых вирионов.

Применяемая в настоящее время система мер борьбы с фаголизисом заквасок в сыроделии основана на ротации заквасочных культур и использовании в их составе штаммов, отобранных по признаку устойчивости к коллекционным фагам, имеющимся у производителей промышленных бактериальных препаратов, а также технологии их «прямого» внесения.

Вместе с тем ограниченная представительность тестовой выборки фагов у производителя бакпрепаратов и постоянно и быстро меняющаяся фаговая ситуация на предприятиях всегда обеспечивают высокую вероятность фаговой уязвимости этих препаратов на конкретных предприятиях, фаговый пул которых либо не представлен в системе тестирования, либо имеет уже измененный спектр литического действия в отношении составляющих препарат штаммов заквасочных культур.

Таким образом, технология борьбы с бактериофагами, принятая в нашей стране, не лишена системных недостатков. В частности, она требует наличия в обороте огромного числа штаммов молочнокислых бактерий (для многштаммовых заквасок). Причем ротация заквасок предполагает постоянное пополнение фонда используемых микроорганизмов и зачастую не позволяет эффективно применять особо ценные штаммы, на селекцию которых подчас затрачивается значительное количество труда и средств. Кроме того, многштаммовость закваски не гарантирует ее неуязвимости в отношении фаголизиса. Наконец, многократное использование оборудования в течение дня способствует обсеменению производства всевозрастающим количеством фагочастиц, что увеличивает вероятность появления высоковирулентных мутантов фагов и расширения спектра их литического действия.

Материалы и методы. Объектами исследований послужили многштаммовые фагосодержащие субстраты (МФС), представляющие собой пробы сыворотки, отобранные перед выпуском зерна из сыродельной ванны, а также их варианты, полученные после физико-химических обработок (фильтрация или термизация). Пробы сыворотки отбирали на одном из сыродельных предприятий Алтайского края от последних в течение дня выработок — субстраты, наиболее полно представляющие фаговый пул предприятия и следовательно содержащие наиболее репрезентативные фаговые ассоциации (ФА).

Для выявления фагов применяли метод двухслойного высева на плотной питательной среде с газом индикаторной культуры.

Для учета возможного наличия в пробах веществ, ингибирующих рост клеток индикаторных культур

или «сверхтерморезистентных» фагов, с целью получения термизованных вариантов нативные субстраты подвергали термической обработке (87+1 °С, 12 мин).

Для обеспечения адекватности получаемых результатов и устранения влияния нативной микрофлоры исследуемых проб на взаимоотношения составляющих тестируемой системы «фаг — бактериальный хозяин» фильтрационным способом (бактериальные мембраны с порами 200 нм) получили «стерильные» (с точки зрения отсутствия бактериальной, но не фаговой контаминации) варианты нативных МФС.

Образцы МФС маркировали в соответствии с содержащимися в них ФА и очередностью отбора как ФА1 (выработка №4 за 24.04.2013), ФА2 (выработка №6 за 24.04.2013) и ФА4 (выработка №5 за 27.05.2013).

Для выявления литической активности по отношению к мезофильным лактококкам нативные МФС ФА1, ФА2 и ФА4 и их термизованные и «стерильные» варианты (всего 9 опытных МФС) тестировали вышеупомянутым методом одновременно на одной чашке Петри с газонем той или иной индикаторной культуры. В качестве индикаторных использовали 142 коллекционные культуры мезофильных лактококков: 76 штаммов *Lc. lactis*, 52 штамма *Lc. diacetylactis* и 14 штаммов *Lc. carmoris* и бактериофаги из коллекции лаборатории микробиологии СибНИИС (каталог «Сибирская коллекция микроорганизмов», 2011 г.).

Исходные субстраты (пробы сыворотки, отобранные на предприятии) в течение всего периода исследований порционно хранили при температуре -23+1 °С. Для целей каждого эксперимента одну порцию дефростировали.

Такой подход обеспечивал, на наш взгляд, наибольшую сохраняемость нативных свойств исследуемых ФА. Причем степень выраженности данной сохраняемости в отношении фаговых корпускул более очевидна по сравнению с бактериальными клетками любой таксономии, поскольку биологические структуры меньшей иерархии сложности априори более толерантны к любым негативным воздействиям окружающей среды. Кроме того, вытекающая из этого вышеотмеченная идентичность тестируемых нативных МФС на протяжении длительного периода предопределяла адекватность результатов исследований. К недостаткам данного метода можно отнести достаточно интенсивный рост нативной микрофлоры образца в точках его нанесения на газон тест-культур, что в ряде случаев несколько затрудняло идентификацию результатов.

Результаты исследования. В экспериментах исследовано 1278 систем «МФС — индикаторная культура».

В 66 случаях в местах нанесения проб на газонах индикаторных культур выявлены негативные зоны

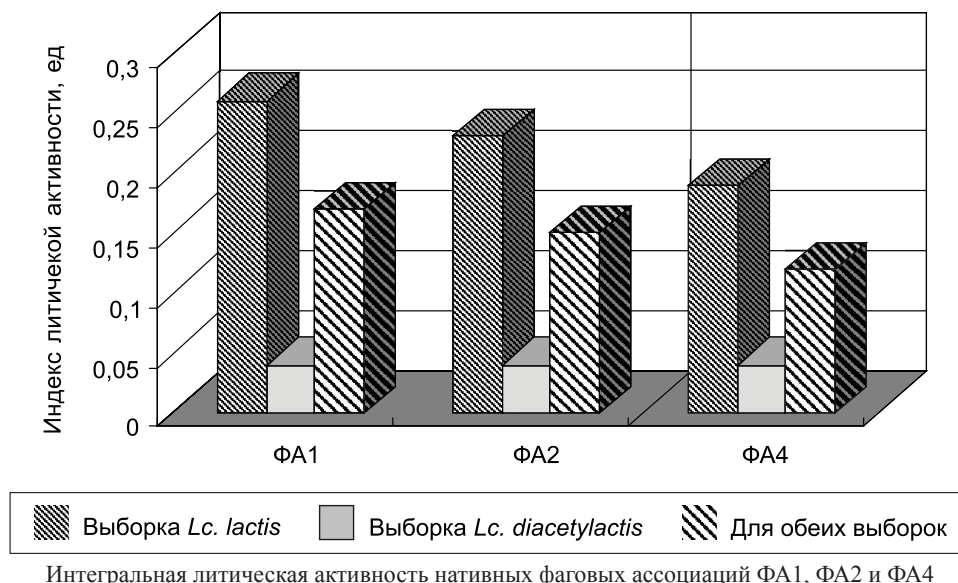
(зоны отсутствия или задержки роста колоний клеток индикаторных культур).

Результаты экспериментов с термизованными МФС (258 систем) не выявили наличия данных негативных зон для 74 штаммов *Lc. lactis* и 12 штаммов *Lc. diacetylactis*. Это свидетельствует об отсутствии в этих образцах ингибирующих факторов. В последующих экспериментах термизованные МФС не тестировали.

В экспериментах по исследованию «стерильных» МФС (408 систем) в местах нанесения аликвоты образца отмечено появление всего лишь 11 зон. Такие зоны у МФС ФА1, ФА2 и ФА4 среди культур *Lc. lactis* выявлены на трех штаммах (№1, 12 и 29); а у МФС ФА4 — по отношению к двум культурам *Lc. diacetylactis* (№6 и 16).

По сравнению с нативными МФС такое соотношение было неожиданно мало. Однако это противоречие вполне объяснимо, если вспомнить, что в «стерильных» МФС присутствовали только бактериофаги, морфологически способные пройти через фильтрационные поры (в данном случае 200 нм), фаговые же корпускулы больших размеров фильтрующей мембраной отсекались. Таким образом, наличие негативных зон (зон лизиса) для «стерильных» МФС свидетельствовало о наличии в соответствующих МФС более широкого по морфологии спектра бактериофагов по отношению к вариантам, где такие зоны не выявлены. Естественно, что для получения «стерильных» МФС, содержащих весь указанный спектр фагочастиц, необходимо применение мембран с большими размерами пор (460 нм), которые способны обеспечить получение «стерильных» МФС с фагосодержанием, адекватным нативному [6]. Это позволит сохранить морфологическое многообразие штаммового состава ФА, содержащихся в тестируемых субстратах.

Выявленная величина индекса литической активности (ИЛА), определяемая как доля числа негативных зон от количества тестируемых систем для каждой выборки, ожидаемо варьировала в зависимости от МФС, вида и представительности выборки тестируемых индикаторных культур лактококков. Так, для наиболее представительной выборки *Lc. lactis* (72 штамма) ИЛА нативных ФА1, ФА2 и ФА4 составил соответственно 0,26; 0,23 и 0,19. Для выборки *Lc. diacetylactis* (52 штамма) ИЛА был намного ниже и составил 0,04 для трех исследованных проб. Это свидетельствует о несколько меньшей интегральной чувствительности примененных культур вида *Lc. diacetylactis*, содержащихся в коллекции СибНИИС, по отношению к тестируемым ФА. Графическая интерпретация по фагоскринингу культур двух наиболее представительных выборок *Lc. lactis* и *Lc. diacetylactis* представлена на рисунке.



Таким образом, исследования выявили достаточно близкие (с точки зрения наличия определенного значимого уровня интегральной активности) значения ИЛА в ряду проб ФА1, ФА2 и ФА4 для выборок обоих видов лактококков (включая объединенную). Причем крайние значения ИЛА отличаются не более, чем на 27% (между ФА1 и ФА4).

Необходимо отметить, что выявленные в опытах «рекордные» на протяжении межотборного периода уровни литической активности ФА, установленные для выборки *Lc. lactis* (ИЛА составлял от 0,26 до 0,19), свидетельствовали о том, что фаги, специфичные культурам этого вида, успешно репродуцировались на клетках *Lc. lactis*. Причем клетки бактерий-хозяев могли иметь в данном случае как «заквасочное», так и «сырьевое» происхождение.

Если учесть, что культуры вида *Lc. lactis* являются основным кислотообразующим агентом заквасок, то лизис их клеток может негативно сказаться на ходе молочнокислого процесса со всеми негативными последствиями.

Выводы

1. Выявленное в экспериментах появление на газонах индикаторных культур негативных зон в местах нанесения аликвоты исходных проб сыворотки (66 случаев) свидетельствует о наличии в них литических агентов (бактериофагов).

2. Термизация нативных МФС и их последующее тестирование показали отсутствие в исходных пробах ингибирующих факторов нефаговой природы или «сверхтерморезистентных» фагов.

3. Фильтрация образцов сыворотки через бактериальные мембраны с размерами пор 200 нм показала эффективность этой операции с точки зрения получения аликвоты пробы, свободной от клеток контаминирующей микрофлоры, но содержащей фаговые корпускулы меньшей, чем размеры пор, морфологии.

Последнее, естественно, не исключает наличия в нативных МФС бактериофагов больших размеров и свидетельствует, скорее, о величине морфологического спектра фаговых корпускул данных ФА.

4. Установлена высокая литическая активность ФА, локализованных в исходных пробах подсырной сыворотки. Для наиболее представительной выборки индикаторных культур *Lc. lactis* (72 штамма) ИЛА нативных МФС ФА1, ФА2 и ФА4 составлял соответственно 0,26; 0,23 и 0,19. Для выборки *Lc. diacetylactis* (52 штамма) этот индекс намного ниже — 0,04 для всех трех упомянутых МФС.

5. Выявлена несколько меньшая интегральная чувствительность тестируемых культур вида *Lc. diacetylactis*, содержащихся в коллекции СибНИИС, по сравнению с бактериями вида *Lc. lactis*.

6. Полученные данные свидетельствуют об определенной вариабельности штаммового состава фагового пула предприятия (включая морфологические признаки), причем, возможно, ее выраженность характеризуется некоторой видоспецифичностью относительно тестируемых коллекционных культур.

7. Близкие по значению ИЛА для МФС ФА1, ФА2 и ФА4 для выборок *Lc. lactis* и *Lc. diacetylactis* свидетельствуют о сохранении достаточно высокой интегральной активности «заводских» ФА на протяжении всего «межотборного» периода, а лидирующее положение, по нашим данным, принадлежит фагам, специфичным культурам вида *Lc. lactis*. При этом клетки бактерий-хозяев могут иметь как «заквасочную», так и «сырьевую» этиологию.

Эти выводы подтверждают наличие постоянной опасности фаголизиса хотя бы определенной доли клеток ферментирующего микробиоценоза сырной массы со всеми вытекающими негативными последствиями для биотехнологии продукта.

Библиографический список

1. Гудков А.В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты / под ред. С.А. Гудкова. — 2-е изд., испр и доп. — М., 2004.
2. Ганина В.И. Влияние бактериофагов на формирование органолептических свойств молочных продуктов // Переработка молока. — 2003. — №7 (45).
3. Ганина В.И., Волкова И.Р. Фаговый фон на предприятиях, вырабатывающих кисломолочные продукты // Переработка молока. — 2005. — №7 (68).
4. Сорокина Н.П., Перфильев Г.Д., Полянская И.С. Бактериофаги лактококков // Сыроделие и маслоделие. — 2014. — №1.
5. Снятковский М.В., Карычев Р.З., Шаманова Г.П. Бактериофаги в молочном производстве и борьба с ними // Переработка молока. — 2006. — №5 (79).
6. Волкова И.Р. Разработка метода индикации бактериофагов, лизирующих молочнокислые бактерии : автореф. дис. ... канд. техн. наук. — М., 2007.