

НАУКОВО-МЕТОДОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ СЕЛЕКЦІЇ ФАГОСТІЙКИХ ЗАКВАШУВАЛЬНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

О.В. Науменко, к.т.н., с.н.с., заст. зав. відділу,
Н.Ф. Кігель, д.т.н., гол.н.с.,
Відділ біотехнології,
Інститут продовольчих ресурсів НААН

*Виконано пошукову роботу з відбору заквашувальних штамів лактобактерій за стійкістю до фагів, що циркулюють на молокопереробних підприємствах. Об'єктами фагового моніторингу були зразки готової молочної продукції, бакконцентрати, сировина, повітря виробничих приміщень, вода, змиви з обладнання. Виділення та титрування фагів проводили у твердих поживних середовищах на основі гідролізованого молока (ГА) або М 17 з 0,5% глюкози, використовуючи техніку «подвійного» агару з 10 мМ CaCl₂, чутливість культур лактобактерій до фагів визначали методом 'spot test' (D. Lillehaug, 1997). Проведено фаговий моніторинг 114 зразків продукції 8-ми молокопереробних підприємств України - частота виявлення фагів становила від 4,2 до 100%. Ізольовано чисті лінії вірулентних фагів щодо *Lactococcus lactis* ssp. (56,7%) та *S. thermophilus* (21,6%), які характеризувались високими темпами репродукції на підібраних гомологічних культурах та нагромаджували до $1,2 \times 10^8$ БУО/см³. Досліджено мікробіоту некомерційних харчових продуктів (кисломолочні продукти, сири, ферментована рослинна сировина), з яких віділено чисті культури мікроорганізмів. У результаті селекційного скринінгу з отриманого банку культур відібрано біотехнологічно активні фагостійкі штами, зокрема видів *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Leuconostoc lactis*.*

Ключові слова: заквашувальна культура, бактеріофаг, скринінг, селекція, фагорезистентність

UDK 576.32/36: 578.24:579.2:637.146

SCIENTIFIC AND METHODOLOGICAL ASPECTS OF SELECTION OF PHAGE RESISTANCE OF STARTER MICROORGANISMS

O. Naumenko, Ph. D., Technics, Senior Researcher,
N. Kigel, D-r of Sciences, Technics, Chief Researcher,
Department of Biotechnology,
Institute of Food Resources of NAAS

*The purpose of the work was to search for the selection of fermentation strains of lactic acid bacteria for resistance to phages circulating in dairy processing enterprises. The objects of phage monitoring were samples of finished dairy products, bacterial concentrates, raw materials, air of industrial premises, water, equipment washes. Extraction and titration of phages were carried out in solid nutrient media based on hydrolyzed milk (GA) or M 17 of 0.5% glucose using the technique of «double» agar with 10 mM CaCl₂, sensitivity of strains to phages was determined by the method of 'spot test' (D Lillehaug, 1997). Phage monitoring of 114 samples of products from 8 milk processing enterprises of Ukraine was conducted - the frequency of detection of phages ranged from 4.2 to 100%. Pure lines of virulent phage against *Lactococcus lactis* ssp. (56.7%) and *S. thermophilus* (21.6%), were isolated these characterized by high rates of reproduction in selected homologous cultures and accumulated to 1.2×10^8 CFU / ml. The microbiota of non-commercial food products (sour milk products, cheeses, fermented vegetable raw materials) were investigated these being used to isolated pure cultures of microorganism. As a result of breeding screening, biotech-active phage-resistant strains, in particular the species *Streptococcus thermophilus*,*

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus saxe*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Leuconostoeas lactis*, were selected from the obtained pot of cultures.

Key words: starter culture, bacteriophage, screening, selection, bacteriophage resistance

Бактеріофаги становлять серйозну проблему для молочної промисловості. На додаток до дотримання суворих санітарних умов, запобігти ураженню фагами можна, наприклад: за допомогою використання відповідних «антифагових» середовищ; застосування ротації заквашувальних культур, заснованій на заміні штамів лактобактерій, що належать до різних груп чутливості до бактеріофага; використанням селекціонованих штамів, стійких до циркулюючих на виробництві бактеріофагів.

Фагорезистентність може бути забезпечена природними захисними механізмами: інгібуванням адсорбції фага; блокуванням уведення ДНК фага в клітину; системою рестрикції/модифікації; системою абортівної фагової інфекції або іншими стратегіями захисту клітини [1, с. 89-113]. На даний час в молочній промисловості застосовуються у великих масштабах штами, які набули фагостійкості саме природними механізмами [2, с. 99-110; 3, с. 377-382].

Існує кілька методологічних підходів для створення фагостійких штамів. Вони включають в себе уточненні методи, такі як: ізоляція (виділення) спонтанних мутантів, стійких до бактеріофагів; кон'югативна передача плазмід, що кодують стійкість до бактеріофага тощо. Альтернативним підходом є поліпшення штамів за використання методів рекомбінантних ДНК-технологій [4, с.10] і за допомогою системи CRISPR-cas [5, с. 816-821], які дозволяють провести точкову модифікацію на бактеріальній ДНК на рівні одного нуклеотиду. Розроблено методи створення генетично модифікованих організмів, які відповідають визначенню «харчової якості» (food-grade) [6, с. 917-921; 7, с. 112-116]. Однак вони в даний час не використовуються для безпосереднього впровадження у промислових культурах через негативне ставлення споживачів та відсутність відповідних нормативних документів. Використання методів генної інженерії, які мають величезний потенціал для розвитку фагозахисних механізмів та створення фагостійких мутантів, на даний час обмежено через заборону промислового використання генетично модифікованих мікроорганізмів [8, с. 611-624].

Метою даної роботи було провести селекційний скринінг заквашувальних штамів за фагостійкістю.

Матеріали та методи.

Виділення фагових ізолятів проводили з різних біологічних джерел методом подвійного агару з 10 мМ CaCl₂ згідно з [9, с. 85–90]. Титр фагів визначали за кількістю негативних колоній у найбільшому розведенні проби, результати виражали в бляшко утворювальних одиницях у см³ (БУО/см³). Для виявлення бактеріофагів застосовували спеціально відібрані фагочутливі тест-культури: *L. lactis ssp. lactis* Л₁; Л₃; *L. lactis ssp. lactis* 63 с; *L. lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* 4dl; *S. thermophilus* 66/12; 27/1 з колекції відділу біотехнології ІПР НААН. Чутливість культур лактобактерій до фагів визначали за допомогою 'spot test', шляхом нанесення фагів на чашку Петрі з ГА з 10 мМ CaCl₂ та досліджуваною культурою в логарифмічній фазі росту. У досліджах використовували бактеріофаги з титром 10⁷ БУО/см³ об'ємом по 0,02 см³. Чашки інкубували за оптимальної температури для культури впродовж 24-36 год. Фагочутливими вважали ті штами, на бактеріальних газонах яких у місцях нанесення фагу спостерігали наявність зони лізису. Показник частоти виявлення фагів (ЧФ) у% розраховували за формулою:

$$\text{ЧФ} = (\text{КОФ}^+ / \text{ЗКО}) \times 100, \quad (1)$$

де КОФ⁺ - кількість об'єктів із виявленим бактеріофагом;
ЗКО – загальна кількість досліджених об'єктів.

Результати досліджень та їх обговорення.

На першому етапі розробки фагозахисних стратегій необхідно дослідити циркуляцію фагів на виробництві, встановити видоспецифічність фагів та визначити фаготипи промислових штамів лактобактерій.

Було проведено фаговий моніторинг 114 зразків продукції 8-ми молокопереробних підприємств України. Об'єктами досліджень були зразки готової молочної продукції, бакконцентрати, сировина, повітря виробничих приміщень, вода, змиви з обладнання тощо.

Встановлено, що титр фагового забруднення знаходився у діапазоні 10^1 - 10^6 БУО/см³ залежно від об'єкту фагового моніторингу (табл. 1).

Табл. 1

Показники фагового моніторингу

Об'єкт	Видова специфічність фагів МКБ, вид				Діапазон титру фагів, БУО/см ³
	<i>L. lactis ssp. lactis</i>	<i>L. lactis ssp. lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>	<i>L. lactis ssp. cremoris</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
Завод 1	0	0	0	3	10^1 - 10^2
Завод 2	3	0	0	0	1 - 10^2
Завод 3	0	0	0	0	0
Завод 4	2	0	2	2	10^1 – 10^4
Завод 5	3	0	0	0	1 - 10^2
Завод 6	6	4	0	1	10^1 - 10^4
Завод 7	0	0	0	2	1 - 10^1
Завод 8	7	0	2	0	10^1 – 10^6
Усього	21	4	4	8	1 - 10^6

З таблиці 1 також видно, що за видовою специфічністю віруси групувались у 4 фагогрупи. Переважали віруси, активні щодо *L. lactis ssp. lactis*, - 56,7% від загальної кількості виявлених фагів. На другому місці за частотою поширення були фаги, активні щодо *Streptococcus thermophilus* – 21,6%.

Для оцінювання фагового стану підприємств в цілому було розраховано показник частоти виявлення фагів за формулою (1). Аналіз отриманих результатів (табл. 2) показав, що лише один із досліджених заводів не був контамінований бактеріофагами. На інших досліджених молокопереробних підприємствах встановлено значну циркуляцію фагів - частота виявлення фагів становила від 4,2 до 100%.

Необхідно зауважити, що переважали підприємства з I рівнем контамінації. Це говорить в першу чергу про те, що на цих заводах розуміють потенційні загрози фагової контамінації і ведуть профілактичні роботи з попередження фаголізу заквашувальної мікрофлори. До профілактики фаголізу належать, чи не в першу чергу, саме вірусологічні дослідження і планове оцінювання фагового стану підприємства навіть за відсутності збоїв технологічного циклу.

З об'єктів фагового моніторингу – найзабрудненіших фаговмісних зразків (II- III рівні фагового забруднення) було ізольовано вірулентні фаги щодо *Lactococcus lactis ssp.* та *S. thermophilus*, які характеризувались високими темпами репродукції на підібраних гомологічних культурах та нагромаджували до $1,2 \times 10^8$ БУО/см³.

Аналізування фагового стану підприємств

№ з/п	Об'єкт	ЗКО загальна кількість об'єктів	КОФ кількість об'єктів із фагом	ЧФ частота виявлення фагів, %	Рівень забруднення
1	Завод 1	19	3	15,7	I рівень
2	Завод 2	3	3	100	I рівень
3	Завод 3	6	0	0	0 рівень
4	Завод 4	2	2	100	II рівень
5	Завод 5	19	3	15,7	I рівень
6	Завод 6	10	6	60,0	II рівень
7	Завод 7	47	2	4,2	I рівень
8	Завод 8	8	7	87,5	III рівень
	Усього	114	26	22,8	I - III рівні

Завдяки створеній колекції фагів, виділених за умов виробництва, можна проводити скринінг молочнокислих бактерій за ознакою фагорезистентності.

Наступним етапом роботи було дослідження варіативності лактобактерій за ознакою фагорезистентності. Було досліджено мікробіоту некомерційних харчових продуктів домашнього приготування (кисломолочні продукти (сметана, кефір, простокваша); сир твердий, сир кисломолочний; ферментована рослинна сировина (розсіл з квашеної капусти) і виділено чисті культури мікроорганізмів.

На підставі результатів дослідження низки культуральних, фізіологічних, біохімічних та генетичних ознак було визначено родову, видову приналежність виділених бактеріальних ізолятів. Отриманий банк чистих культур далі використовувався, як селекційне поле для скринінгу штамів за цільовим призначенням, зокрема за ознакою фагорезистентності.

Нововиділені та з колекції ІПР фаги (виділені та досліджені у попередніх НДР, як еталонні фаги певного виду) були використані для встановлення фаготипів нових штамів лактобактерій.

У таблиці 3 показано профіль відібраних штамів за фагостійкістю.

Було обраховано I_L індекс літичної активності - співвідношення кількості лізованих фагом штамів до числа випробуваних. Обрахування індексу літичної активності показало, що нові фаги відрізнялись один від одного за ступенем агресивності по відношенню до досліджених бактерій - I_L коливався від 0,13 до 0,35.

Данні щодо чутливості лактобактерій до різних типів фагів, за необхідності, дозволяють грамотно поєднувати зазначені бактерії у заквашувальних культурах і скласти ротаційні програми [10, с. 149-158].

В цілому, проведені дослідження дозволили відібрати з нововиділених культур такі перспективні фагостійкі штами: *L. lactis* subsp. *lactis* L 1, *L. lactis* ssp. *cremoris* ПІ; *Lb.acidophilus* R 18/Н та *Lb. K₉* та *L. rhamnosus* АВ.

З термофільних стрептококів перевагу було надано штамам *S. thermophilus* 2/14д, ЕТ-1, СТ-гр. та О-4, стійким до фагового навантаження.

Результати дослідження фаготипів лактобактерій:
 +/- чутливий/стійкий до фага; ІК – індикаторна культура

Фаги	Штами							
	L 1, П1, O-4, Et-1, СТ-гр, 2/14 л, 18/Н, К ₉ , АВ, 1404	L ½-4	L 3/1	L 2/2-24	52-20	4dl	2с/1	6/12
FT-8	-	+(ІК)	-	-	-	-	-	-
FT-9	-	-	-	-	-	-	+(ІК)	+
FT-10	-	-	+(ІК)	-	-	-	-	-
Зол/1	-	-	+	+(ІК)	-	+	-	-
Зол/2	-	-	-	+(ІК)	-	+	-	-
f _{я3}	-	-	+(ІК)	-	-	-	-	-
f10	-	-	-	-	+(ІК)	-	-	-
f S ₆₁	-	-	-	-	+(ІК)	-	+(ІК)	+
f3	-	-	-	-	-	+(ІК)	-	-
f O ₁₅	-	-	-	-	-	-	+	+(ІК)
fNdan	-	-	-	-	-	-	+(ІК)	+

Тестування гемолітичної активності (рис.1) показало, що нововиділені штами *Streptococcus thermophilus* належали до групи альфа-типу гемолізу. Це дало підставу вважати їх безпечними та придатними для подальшого використання у біотехнологіях харчових продуктів.

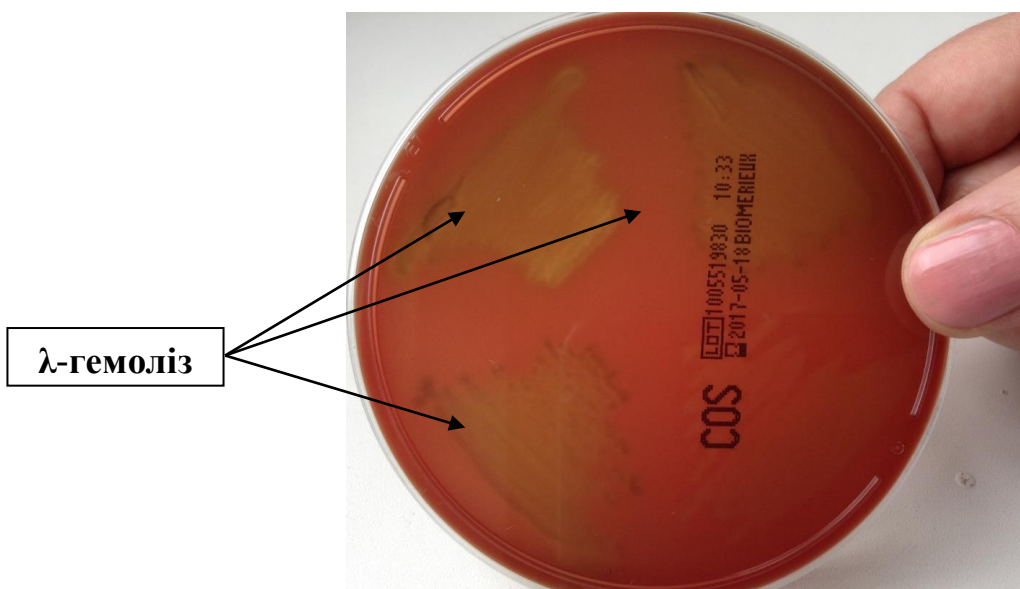


Рис. 1. Визначення типу гемолізу штамів *S. thermophilus* 0-4, Et-1 та СТ-гр

Нами було досліджено такі біотехнологічні характеристики, як: рівень молокозсідальної активності та урожайність бактерій, енергію кислотоутворення, стійкість до агресивних сполук кишкового тракту, здатність знижувати рівень лактози за ферментації молока, антагоністичну активність.

За результатами проведених досліджень за комплексом ознак відібрано біотехнологічно активні штами, зокрема видів *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Leuconostoc lactis*.

Висновки

Визначено специфічні риси циркуляції фагів на 8 молокопереробних підприємствах України. Встановлено, що біля 47% зразків продукції містили фаги різного титру: з них у 12% зразків фаговий титр був небезпечним 10^4 - 10^6 БУО/см³.

Проведено відбір фагорезистентних штамів, як біотехнологічно перспективних а також фагочутливих штамів, як тест-культур для проведення фагового моніторингу.

За комплексом ознак відібрано біотехнологічно активні штами різних таксономічних груп. Штами *Lactobacillus acidophilus* 3138, *Leuconostoc lactis* 1404, *Streptococcus thermophilus* O-4, 2/14л та СТ-гр задепоновано у Національному депозитарії промислових мікроорганізмів ІМВ НАН України.

Розроблено зміну №6 до ТУ У 15.5-00419880-100:2010 «Заквашувальні культури», де розширено асортимент та введено поняття «одноштамові культури», зокрема «одноштамова культура *S. thermophilus*». Штами *S. thermophilus*, відібрані за фагорезистентністю та здатністю до продукції екзополісахаридів, можуть бути застосовані як так звані «технічні» штами для стабілізації процесу ферментації навіть за умови фагової інфекції та покращення текстури ферментованого молока. Крім того, такі штами доцільно залучати до мультиштамових заквасок з метою збільшення стабільності продукту, підвищення реологічних властивостей тощо.

Використані джерела

1. Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria / A. Forde, G.F. Fitzgerald// Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology. – 1999. – Vol. 76. – Pp. 89-113.
2. Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance / C. Daly, G. Fitzgerald, R. Davis // Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology. – 1996. – Vol. 70. – Pp. 99-110.
3. Applications of phage resistance in lactic acid bacteria / S. Moineau // Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology. – 1999. – Vol. 76. – Pp. 377-382.
4. Precision genome engineering in lactic acid bacteria / J.P. Van Pijkeren, R. Britton // Microbial Cell Factories. – 2014. – 13 (Suppl. 1). - P.10.
5. Programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity / M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna, E.A. Charpentier // Science. – 2012. – Vol. 17. – Pp. 816-821.
6. Genetic engineering and modification of bacteria / Johansen E. // In Encyclopedia of Food Microbiology / R. Robinson, C. Batt, P. Patel. Academic Press, London. - 1999. – Pp. 917-921.
7. Challenges when transferring technology from Lactococcus laboratory strains to industrial strains / Johansen E // Genet Mol Res. – 2003. –Vol. 2. – Pp.112-116.
8. The long and winding road from the research laboratory to industrial applications of lactic acid bacteria / M.B. Pedersen, S.L. Iversen, K.I. Sørensen, E. Johansen // FEMS Microbiol Rev. - 2005. - Vol. 29. - Pp. 611-624.
9. An improved plaque assay for poor plaque-producing temperate lactococcal bacteriophages / D. Lillehaug // Journal of Applied Microbiology.- 1997.- Vol. 83. – Pp. 85–90.
10. Bacteriophages and dairy fermentations / M.B. Marcó, S. Moineau, A. Quiberoni//Bacteriophage. - 2012.- Vol. 2(3).- Pp. 149-158.

References

1. Forde, A. and G.F. Fitzgerald. 1999. Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. 76:89-113.
2. Daly, C., Fitzgerald G. and R. Davis. 1996. Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. 70:99-110.
3. Moineau S. 1999. Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. 76: 377-382.
4. Van Pijkeren, J.P. and R. Britton. 2014. Precision genome engineering in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*. 13 (Suppl. 1):10.
5. Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna and E.A. Charpentier. 2012. Programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Sci*. 17:816-821.
6. Johansen, E. 1999. Genetic engineering and modification of bacteria. In *Encyclopedia of Food Microbiology*. Robinson, R., C. Batt and P. Patel. Academic Press, London. - 1999:917-921.
7. Johansen, E. 2003. Challenges when transferring technology from *Lactococcus* laboratory strains to industrial strains. *Genet Mol Res*. 2:112-116.
8. Pedersen, M.B., S.L. Iversen, K.I. Sørensen and E. Johansen. 2005. The long and winding road from the research laboratory to industrial applications of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 29:611-624.
9. Lillehaug, D. 1997. An improved plaque assay for poor plaque-producing temperate lactococcal bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology*. 83:85-90.
10. Marcó, M.B., S. Moineau and A. Quiberoni. 2012. Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage*. 2(3):149-158.