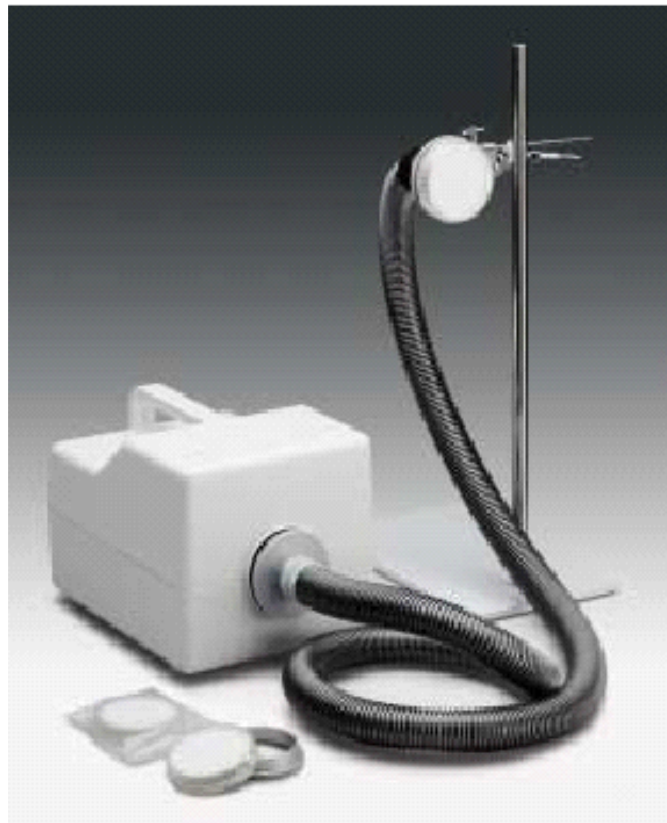
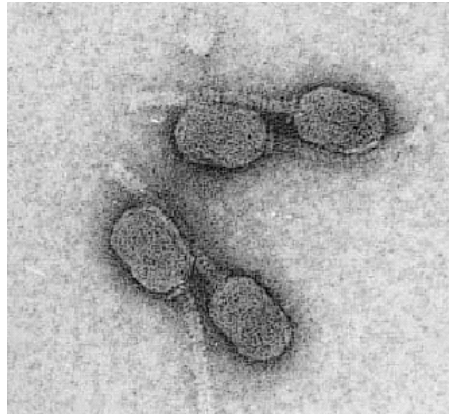
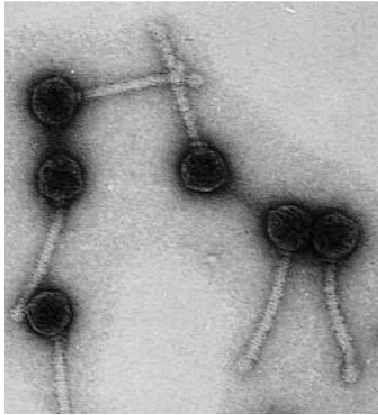


Kvantitativno određivanje bakteriofaga u zraku radnih prostorija mljekara



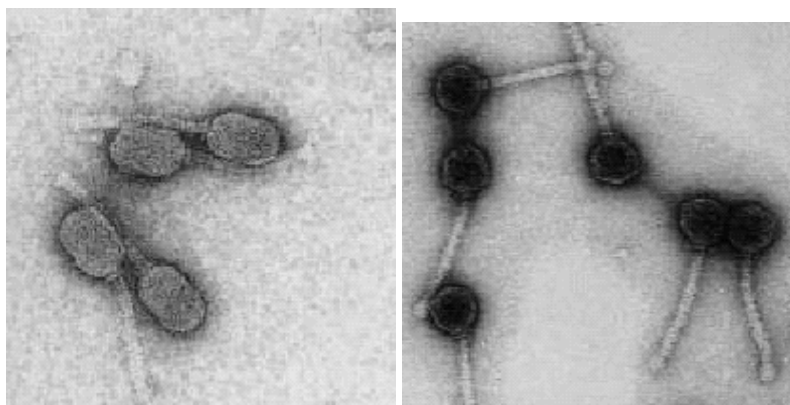
Preporučeni postupak "Korak-po-korak" kod korištenja Metode želatinoznih membranskih filtera

Unatoč naporima da se stvore kulture koje bi bile otporne na fage, bakteriofagi su i dalje glavni uzrok problema zakiseljavanja i, tako, kvarenja mljekarskih proizvoda. Potrebno je provoditi potpuno i pažljivo praćenje faga kako bi se pronašli sojevi otporni na njih, te njima zamijeniti osjetljive kulture i pronaći unutrašnji izvor infekcije.

Ovdje ćemo Vam prikazati jednostavnu metodu za kvantitativno određivanje zaraznih bakteriofaga u zraku radnih prostorija mljekara. Ova metoda garantira visoku stabilnost detektiranih bakteriofaga pod normalnim uvjetima skladištenja i transporta.

Metoda je testirana korištenjem bakteriofaga mezofilnih streptokoka mliječne kiseline (*Lactococcus lactis*). Najvažniji kriteriji za poboljšanje metode su slijedeći:

- Korištenje jednostavnog sustava pufera za ponovno otapanje Sartorijusovih želatinoznih filtera.
- Jednostavno rukovanje filterima nakon uzorkovanja.
- Visoka stabilnost sakupljenih faga – čak i nakon višednevnog čuvanja filtera u različitim temperaturnim uvjetima i nakon ponovljene determinacije titara faga.
- Metoda je pogodna za različite sojeve bakteriofaga koji se najčešće nalaze u mljekarama (slika 1).

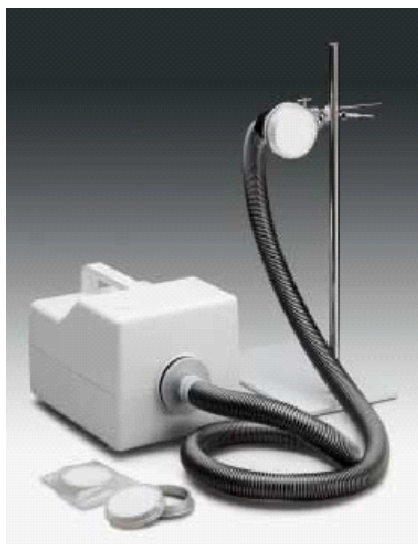


Slika 1:

Skenirajuće elektronske mikrofografije dva soja bakteriofaga mezofilnih streptokoka mliječne kiseline (*Lactococcus lactis*) sa okruglim (izodijametričnim) ili duguljastim (ovalnim) glavama, koji se često nalaze u mljekarama. Virusi su veliki oko 50 nm.

1. Sakupljanje bakteriofaga

Kod sakupljanja bakteriofaga iz zraka koristili su se Sartorijusovi proizvodi, **MD8 Air Sampler (sakupljač zraka)**, broj narudžbe 16743, koji je u međuvremenu zamijenjen sa **MD8 airscan-om**, broj narudžbe 16747 (230 V), 16746 (115 V) ili 16748 (110 V) (Slika 2) i **Želatinozni filteri**, promjera 80 mm sa veličinom pora 3 µm, broj narudžbe 12602-80-ALK.



Slika 2. MD8 sakupljač zraka sa želatinoznim filterima

Slijedeći filteri su također pogodni za uzorkovanje bakteriofaga:

Želatinozni filteri, broj narudžbe 17528-80-ACD (sterilni, pojedinačno pakirani), ili 17528-80-BZD (sterilni, pakirani po tri komada).

Bilješka: Bakteriofagi su uzorkovani kod protoka 100 l/min tijekom 3- do 12-minutnog vremenskog intervala.

2. Prijenos filtera

Filteri se prenose u sterilnim polietilenskim vrećicama za jednokratnu upotrebu.

Bilješka: 10 x 15 cm vrećice, koje možete naručiti preko prodavača laboratorijske opreme, su posebno izrađene za prijenos filtera.

3. Dodavanje pufera u sterilnu polietilensku vrećicu

Dodajte 5-10 ml pufera u vrećicu. Preporučuje se slijedeći sustav pufera: 1/4 Ringerove otopine sa dodatkom 10%-tnog obranog mlijeka.

Bilješka: Ringerova otopina se koristi u pripremi uzoraka mlijeka i mliječnih proizvoda, te je dostupna u obliku tableta koje možete naručiti preko prodavača laboratorijske opreme. ("Mlijeko i mliječni proizvodi – Priprema uzoraka i otopina za mikrobiološku kontrolu. IDF Standard 122B, 1992"). Obrano mlijeko bi trebalo biti napravljeno od obranog mlijeka u prahu. Ringerova otopina se, nakon

autoklaviranja (20 min., 121 °C), miješa sa obranim mlijekom (koje je također prethodno autoklavirano 15 min. na 115 °C).

4. Zatvaranje vrećica sa filterima

Vrećice je potrebno čvrsto zatvoriti kako bi se omogućilo što sigurnije skladištenje ili prijenos u istraživački laboratorij.

Bilješka: Preporučuje se čuvati filtere na hladnom mjestu i obraditi ih što je prije moguće. Pufer se može dodati kasnije (na primjer, prilikom testiranja, pufer je dodan nakon 4 i 24 sata).

5. Prije determinacije titra faga

Prije determinacije titara faga, filtere je potrebno zagrijati 2 minute u toploj vodi (37 °C). Nakon toga ih treba rukom resuspendirati/ homogenizirati u puferu (oko 2 minute).

6. Determinacija titra faga

Koristite agar overlay metodu kod izolacije kultura od više sojeva, osjetljivih na fage (Adams 1950).

Bilješka: Neophodno je determinirati titre korištenjem određenih individualnih sojeva. Ako mljekara ima individualne sojeve u kulturi ili određene kulture sa više sojeva, svi ti sojevi se moraju koristiti kao sojevi indikatori. Također, ako se koriste neodređene kulture sa više sojeva, tada se kulture koje su osjetljive na fage moraju izolirati prije početka testa. Općenito, dovoljno je prvo pripremiti izolate kultura individualnih kolonija, jer se njihovo zakiseljavanje može promatrati u prisutnosti sterilno profiltriranih proizvoda od surutke.

7. Skladištenje ostalih uzoraka

Skladištenje i čuvanje uzoraka u hladnjaku kroz više tjedana nije problem. Tako da provjeru nekih uzoraka možete ponoviti. Nema smanjenja u titrima kad se uzorci ponovno zagrijavaju i homogeniziraju.

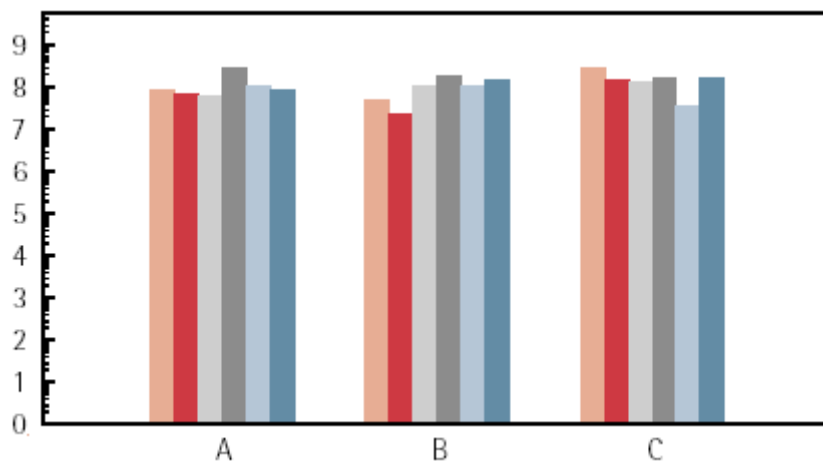
8. Praćenje stanja

Preporučuje se da mljekare koriste svoje proizvode od surutke prilikom praćenja količine faga u zraku.

Zaključak

Metodom prikazanom ovdje moguće je detektirati virulentne bakteriofage u različitom gradijentu koncentracije (Slika 4). Blizu samog izvora aerosola sa fagima, moguće je odrediti njihovu količinu do 3×10^8 jedinica koje tvore plakove (pfu) po m^3 zraka u mljekari. Donja granica za detekciju je manja od 5 faga po m^3 zraka (Slika 4). U slučaju mezofilnih streptokoka mliječne kiseline postoje dva vrlo bitna soja faga koja utječu na zakiseljavanje (fagi sa okruglim, izodijametričnim glavama i oni sa duguljastim, ovalnim glavama; Slika 1). Opisana metoda se može primijeniti jednako na oba soja.

Slika 3. prikazuje utjecaj različitih uvjeta skladištenja i čuvanja na titre sa fagima (pfu po m^3 zraka). Uzorci zraka su uzimani istodobno, u mljekari, blizu izvora aerosola sa fagima. Titri sa fagima su bili determinirani korištenjem soja *Lactococcus lactis*, osjetljivog na fage. Podaci pokazuju da različito rukovanje filterima (I) u odnosu na dodavanje pufera nakon uzorkovanja, (II) vrijeme obrade filtera nakon dodavanja pufera i izabrana temperatura, nisu kritični za svojstva titra faga. Nakon determinacije titra faga, uzorci su držani u hladnjaku četiri tjedna i onda opet obrađeni: čak i nakon tog vremena nije uočen značajan pad koncentracije u titru faga (podaci nisu prikazani).



Slika 3. Titar faga

Jedinice koje tvore plakove (pfu)
po m^3 zraka (\log_{10})

I. Vrijeme između uzorkovanja i dodavanja pufera filterima:

A 0 h (resuspenzija se radi bez odgode)

B 4 hrs.

C 24 hrs.

II. Vrijeme između dodavanja pufera filterima i određivanja titra faga; temperatura na kojoj se čuvaju vlažni filteri:

4 hrs. (temperatura čuvanja: 21°C)

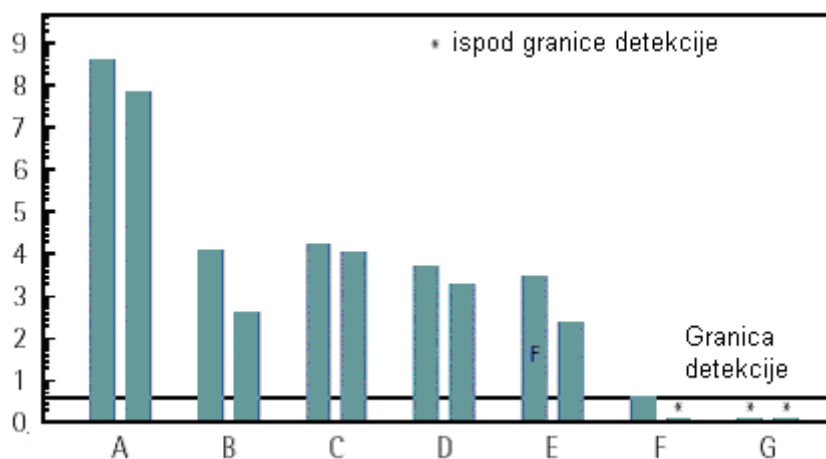
24 hrs. (temperatura čuvanja: 21°C)

4 hrs. (temperatura čuvanja: 4°C)

24 hrs. (temperatura čuvanja: 4°C)

4 hrs. (temperatura čuvanja: -20°C)

24 hrs. (temperatura čuvanja: -20°C)



Slika 4. Titar faga

Jedinice koje tvore plakove (pfu)
po m³ zraka (log₁₀)

- A Vrlo blizu samog izvora aerosola faga
- B Uzvodno od sustava sterilnih filtera fermentacijskog tanka
- C Ispred vrata koje vode u prostoriju sa izvorom aerosola faga
- D Iznad vrata koje vode u prostoriju sa izvorom aerosola faga
- E Ispred vrata koje vode u prostoriju sa kulturama
- F Filtrirani zrak koji se upuhava u fermentacijski tank
- G Unutar prostorije sa kulturama

Grafikon na slici 4. prikazuje konačne vrijednosti titara faga iz zraka u mljekari. Uzorci su uzeti na različitim mjestima u mljekari. Za svako pojedino mjesto su prikazane po dvije vrijednosti, bilo da su podaci dobiveni u različite dane ili na drugom mjestu.

Literatura:

Adams, M. H.: Methods of study of bacterial viruses Meth. Med. Res., Chicago 3 (1950) Sect. pp. 1-73.

Neve, H., Berger, A., Heller, K. J.: A method for detecting and enumerating airborne virulent bacteriophages of dairy starter cultures. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 47, pp. 193-207 (1995).