

### ФАГОВИЙ МОНІТОРИНГ МОЛОЧНОЇ ПРОДУКЦІЇ

*Проведено моніторингові дослідження різноманітної молочної продукції на присутність фагів молочнокислих бактерій. Основними об'єктами фагового моніторингу були традиційні загальноживані продукти: сметана, кефір, сир кисломолочний, сир твердий, йогурт та заквашувальні культури для їх виробництва. В роботі застосовано вірусологічні методи: «двошаровий метод», метод «збігаючої краплі», хлороформна індукція профагів. Встановлено, що біля 80% продуктів були забруднені фагами лактобактерій. Показано, що важливим зовнішнім джерелом бактеріофагів на виробництві можуть бути заквашувальні препарати. Проведено дослідження з виявлення лізогенного стану молочнокислих бактерій. Доведено, що фаговий моніторинг дозволяє встановити джерела, ступінь фагового забруднення - необхідні показники для розробки ефективних протифагових програм.*

**Ключові слова:** бактеріофаги, моніторинг, індукція, лізогенність.

Бактеріофаги разом з іншими представниками царства *Vira* є найбільш поширеними біологічними мікроорганізмами на планеті. З моменту їх відкриття у 1915 році та встановлення, що саме вони є основною причиною різноманітних вад ферментації, пройшло майже століття, однак проблема фаголізису цінних промислових штамів молочнокислих бактерій і досі залишається актуальною. На виробництвах, де зосереджена велика маса бактеріальної культури в експоненціальній фазі росту, створюються сприятливі умови для розмноження бактеріофагів. Заквашувальні культури постійно інфікуються вірусами, які містяться в сирому молоці, де їх кількість може сягати від  $10^1$  до  $10^4$  БУО/см<sup>3</sup> [1].

---

© О.В. Науменко, 2014

За оцінкою іспанських вчених, принаймні 10% зразків молока на молокопереробних підприємствах містять бактеріофаги молочнокислих бактерій [2]. Температурна обробка, яку на разі використовують на виробництві, дозволяє позбутися лише бактеріальної складової молока, тоді як віруси здатні витримувати температури в середньому на 20°C вищі. Бактеріофаги завдяки своїм мікроскопічним розмірам здатні до аерозольного поширення. За деякими дослідженнями встановлено, що у 1 м<sup>3</sup> повітря на молочному підприємстві може міститися до  $10^3$  фагових часток [3]. Очевидно, що фаголізис заквашувальних культур призводить до великих матеріальних втрат на виробництві, що спонукає вчених усього світу шукати можливі способи вирішення даної проблеми.

В Україні проблема фаголізису особливо гостро постала в останні десятиліття, коли вітчизняні дослідження з ряду причин було майже припинено. Внаслідок відсутності фагового контролю на підприємствах кількість випадків порушення ферментації значно зросла. Безсумнівно розробка нових ефективних методів для боротьби з фаголізисом повинна базуватися на

всебічному вивченні біологічних властивостей фагів різних таксономічних груп, особливостей їх життєвого циклу. На сьогодні, універсальних способів боротьби з фаголізисом не існує. Всі запропоновані заходи лише частково обмежують поширення бактеріофагів або дозволяють виявити їх наявність у культурі на ранніх етапах ферментації молока. Найдієвішим вважається використання фагостійких штамів мікроорганізмів, селекцію та конструювання яких необхідно проводити постійно. Тому для відбору фагорезистентних заквашувальних культур ряд країн систематично здійснює фаговий моніторинг на підприємствах молочної промисловості [4].

Метою роботи було проведення моніторингових досліджень різноманітної молочної продукції на присутність фагів молочнокислих бактерій. Основними об'єктами фагового моніторингу були традиційні загальноживані продукти: сметана, кефір, сир кисломолочний, сир твердий, йогурт та заквашувальні культури для їх виробництва.

Матеріали і методи: Виділення бактеріофагів проводили методом «подвійного агару» із додаванням 10 мМ CaCl<sub>2</sub> [5]. Здатність до спонтанного вивільнення профагів визначали після нарощування чистих культур *Lactococcus lactis* у гідролізованому молоці (ГБ) впродовж доби за оптимальної для них температури 30 °С. На наявність бактеріофага досліджували фаголізат після центрифугування за 3000 об/хв. упродовж 15 хв. методом «збігаючої краплі». Також проводили індукцію помірних фагів шляхом додавання до ГБ із добовою культурою хлороформу у співвідношенні 1:10, отриману суміш спочатку витримували упродовж 30 хв. за кімнатної температури, потім - у термостаті за 30 °С упродовж 1,5 год. Оброблені клітини вилучали центрифугуванням за 3000 об/хв. упродовж 15 хв. і досліджували надосадову рідину на наявність фагів. Утворення на газоні індикаторного штаму негативних колоній або зон лізису свідчило про лізогенність досліджуваних культур.

У результаті проведених моніторингових досліджень було встановлено, що біля 80% продуктів були забруднені фагами лактобактерій. У таблиці 1 подано данні щодо спектру обстеженої продукції різних виробників та результати фагового моніторингу. За ступенем контамінації визначено три рівня фагового забруднення на виробництві: низький – від 1 до 10<sup>1</sup> БУО/см<sup>3</sup>; середній – від 10<sup>2</sup> до 10<sup>4</sup> БУО/см<sup>3</sup> та високий – від 10<sup>5</sup> і більше БУО/см<sup>3</sup>. Показано, що 69% зразків продукції містили фаги з титром від 10<sup>5</sup> і більше БУО/см<sup>3</sup>. Це III рівень забруднення фагами, який свідчить про доволі небезпечний фаговий стан підприємств.

Найзабрудненішими фагами з даної вибірки продуктів були зразки кефірів та сметани. Цей факт можна пояснити тим, що на сьогодні виробники практикують під час виготовлення кефірів та, навіть, сметани застосування комплексних препаратів, змішування різної мікрофлори (як мезофільної, так і термофільної), часто без урахування їх сумісності та фаготипів. Тому можуть відбуватись неконтрольовані процеси ферментації внаслідок утворення нових типів фагів, спричиненого спонтанними природними мутаціями. Для того, щоб знизити ймовірність цього явища необхідно дотримувати такого правила -

упродовж одного робочого дня змішування різних партій або різних видів полівидових концентратів при готуванні виробничих заквасок чи прямому внесенні у молочну суміш категорично забороняється. Крім того на кожному підприємстві повинна мати місце чітка ротаційна програма, яка регламентує послідовність змін різних партій концентратів, різних виробників.

Таблиця 1 Фаговий моніторинг продуктів

Об'єкт дослідження			Кількість зразків, шт.	Наявність фагів	Рівень забруднення
№ п/п	Виробник	Продукт			
1	м.Київ, молзавод А	йогурт	2	+	II
		кефір	1	+	III
		йогурт	1	+	III
2	м.Київ, молзавод Б	сир к/м	2	-	-
		кефір	1	+	II
3	м.Київ, молзавод В	сир к/м	2	+	III
4	м.Київ, підприємство Г	сир	2	+	III
		сир	1	-	-
5	Чернігівська обл., молзавод Д	сметана	1	+	I
		сметана	2	+	II
		сметана	5	+	III
		кефір	1	+	II
		кефір	2	-	-
		кефір	6	+	III
6	Донецька обл., молзавод Е	сир к/м	1	+	III
7	Полтавська обл., маслозавод Ж	сметана	1	-	-
8	Черкаська обл., молзавод З	сир	1	+	III

Відомо, що джерелом бактеріофагів може бути сама культура молочнокислих бактерій. За результатами досліджень американських вчених 25 з 30 комерційних штамів молочнокислих бактерій містили генетичну

інформацію профагів [6]. Тривалий час ДНК помірних фагів може реплікуватися разом з бактеріальною хромосоною. Однак у випадку впливу будь яких стресових умов, як наприклад: голод, ультрафіолетове опромінення (яке часто застосовують для знезараження виробничих приміщень), зневоднення, наявність у молочній основі антимікробних сполук, відбувається зміна поведінки вірусу, який з лізогенної стадії переходить до літичного циклу розвитку і за лічені години може знищити заквашувальну культуру. Тому, для з'ясування можливої контамінації фагами, нами були досліджені зразки виробничих заквасок та бактеріальних концентратів. Результати тестування подано у таблиці 2.

**Таблиця 2 Фаговий моніторинг заквашувальних препаратів (ЗП)**

Об'єкт дослідження		Кількість, шт.	Наявність фагів	Рівень забруднення
Виробник	Призначення ЗП			
Україна, виробник № 1	для сирів № 1	2	+	II-III
	для сирів № 2	2	+	II-III
	для сметани № 1	2	+	III
	для сметани № 2	2	-	-
	для сметани № 3	2	+	II-III
	для ряжанки № 1	2	+	III
	для ряжанки № 2	1	-	-
Україна, виробник № 2	для біо-продукта	4	-	-
Україна, виробник №3	для біо-продукта	2	+	II
Росія, виробник № 4	для сирів	3	-	-
Кітай, виробник № 5	для йогурту	2	+	I

Як свідчать данні таблиці 2 важливим зовнішнім джерелом бактеріофагів молочнокислих бактерій є заквашувальні препарати. Цікаво, що при виробництві виробничої закваски виробником № 3 був застосований ЗП виробника № 2, який не містив фагів. Однак, у готовій виробничій заквасці вже були виявлені фаги молочнокислих бактерій. Отже, зараження фагами відбулося на підприємстві саме під час готування закваски.

Необхідно підкреслити, що в зразках ЗП, які містили бактеріофаги з титром  $10^6$  БУО/см<sup>3</sup> і більше, були виявлені гомологічні фаги не тільки до індикаторних культур лактобактерій з колекції відділу біотехнології ІПР, але і до штамів, що входять до складу цих препаратів. Як засвідчують науковці, цей факт пояснюється тим, що при наявності у заквасці фагів із титром  $10^7$  БУО/см<sup>3</sup> може виникати 1 мутант фагів зі зміненим спектром літичної дії [7]. Зрозуміло, що за таких обставин ні ротація штамів, ні використання фагостійких культур

не попередять швидку втрату активності таких заквасок чи концентратів.

Одним із етапів відбору фагостійких культур є встановлення лізогенного стану бактерій, оскільки такі культури є потенційно небезпечними для застосування у біотехнологіях кисломолочних продуктів. Відомо, що лізогенні культури інколи спонтанно вивільняють вірулентні мутанти помірних фагів [8]. У зв'язку з цим нами було проведено дослідження з виявлення лізогенного стану молочнокислих бактерій, застосовуючи різні методологічні підходи.

Показано, що тільки одна з досліджених молочнокислих культур, а саме *Lactococcus lactis* dl 15 спонтанно вивільняла фаги, причому вони лізували саму культуру-хазяїна (табл. 3).

**Таблиця 3** Здатність культур молочнокислих бактерій до спонтанного та індукованого вивільнення профагів

Індикаторна культура	Досліджувані культури					
	Спонтанна індукція			Хлороформна індукція		
	11 cr	dl 15	16 lact	11 cr	dl 15	16 lact
ИК <sub>1</sub> -11 cr	-	-	-	-	-	-
ИК <sub>2</sub> - dl 15	-	+	-	-	+	+
ИК <sub>3</sub> - 16 lact	-	-	-	-	-	-
ИК <sub>4</sub> -Л <sub>1</sub>	-	+	-	+	+	-
ИК <sub>5</sub> - Л <sub>2</sub>	-	+	-	-	+	-
ИК <sub>6</sub> - Л <sub>3</sub>	-	+	-	-	+	+

Отримані нами данні узгоджуються з результатами Б.В.Тараканова [9], згідно яких лише 28% з досліджених культур спонтанно вивільняли фаги, які добре репродукувались на культурі-хазяїна.

З метою повнішої оцінки лізогенного стану культур було проведено хлороформну індукцію профагів. Було показано, що фаги містились у культуральній рідині усіх оброблених штамів (див. табл. 3). Отже, обробка хлороформом є дієвим засобом визначення лізогенності молочнокислих бактерій.

**Висновки:** Фаговий моніторинг має наступні задачі: 1) системний контроль бактеріофагів для оцінювання умов виробництва; 2) виявлення джерел контамінації (внутрішні та зовнішні) та ступеню забруднення (титр фагів, вид фагів) виробництва бактеріофагами; 3) встановлення фізико-хімічних факторів, які можуть зумовити індукцію помірних фагів та виникнення фаголізу культур; 4) розробка ротаційних програм з залученням культур, стійких до типів фагів, що циркулюють на конкретному виробництві.

**Список літературних джерел:**

1. *Garneau J., Moineau S.* Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations // *Microbial Cell Factories.* – 2011. – Vol. 10, N 2. – P. 1-10.
2. *Deveau H., Labrie S., Chopin M.-C., Moineau S.* Biodiversity and classification of lactococcal phages // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2006. – Vol. 72, N 6. – P. 4338-4346.

3. Verreault D., Gendron L., Rousseau M., Veillette M., Massé D., Lindsley G., Moineau S., Duchaine C. Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2011. – Vol. 77, N 2. – P. 491-497.
4. Moineau S., Lévesque C. Control of bacteriophages in industrial fermentation//In Kutter E., Sulakvelidze A. (ed.) *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press, Boca Raton, Fla. – 2005. – P. 286-296.
5. Адамс М. Бактериофаги. – М.: Мир. – 1961. – 527 с.
6. Marcy M., Moineau S., Quiberoni A. Bacteriophages and dairy fermentations // *Bacteriophage*. – 2012. – Vol. 2, N 3. – P. 149-155.
7. Huggins A., Sandine W. Incidence and properties of temperate bacteriophages induced from lactic streptococci// *Appl. Environ. Microbiol.* – 1977. – Vol. 33, N 1. – P. 184-191.
8. Davidson B.E., Powell I.B., Hillier A.J. Temperate bacteriophages and lysogeny in lactic acid bacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1990. – Vol. 7, N 1-2. – P. 79-90.
9. Тараканов Б.В. Биология лизогенных штаммов *Streptococcus bovis* и вирулентных мутантов их умеренных фагов // *Микробиология*. – 1996. – Т. 65, № 5. – С. 656-662.

**O.V.Naumenko**, Institute of Food Resources of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kiev

## **PHAGE MONITORING OF DAIRY PRODUCTS**

### Summary

*A monitoring studies of various dairy products for the presence of lactic acid bacteria phages were conducted. The phage monitoring main objects were commonly traditional products: sour cream, kefir, cottage cheese, cheese, yogurt and starters for their production. In the work such virological methods were used: «double layer» method, «cascading drop» method, prophages chloroform induction. It was found that about 80 % of products were contaminated with lactic acid bacteria phages. It was shown that starters may be an important external source of bacteriophages in the production. A study on the identification of lactic acid bacteria lysogenic state was conducted. It was proved that phage monitoring allows to set the source, the degree of phage contamination – the necessary parameters for development of effective anti-phage programs.*

**Key words:** *bacteriophages, monitoring, induction, lysogenic.*