

УДК 578.81

PHAGE MONITORING OF DAIRY PRODUCTS

O. Naumenko

Institute of Food Resources of NAAS of Ukraine

Key words: <i>Bacteriophages</i> <i>Monitoring</i> <i>Induction</i> <i>Lysogenic</i>	ABSTRACT Monitoring studies of determining the presence of lactic acid bacteria phages in various dairy products were conducted. The following virological methods were used: double layer method, cascading drop method, prophage 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 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 and the degree of phage contamination, which are necessary parameters for development of effective anti-phage programs.
Article history: Received 09.09.2014 Received in revised form 17.10.2014 Accepted 27.10.2014	
Corresponding author: O. Naumenko E-mail: naumenkoo@list.ru	

ФАГОВИЙ МОНІТОРИНГ МОЛОЧНОЇ ПРОДУКЦІЇ

О.В. Науменко

Інститут продовольчих ресурсів НААН України

У статті описано моніторингові дослідження різноманітної молочної продукції на наявність фагів молочнокислих бактерій такими вірусологічними методами: «двошаровий метод», метод «збігаючої краплі», хлороформна індукція профагів. Встановлено, що близько 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 надає можливість визначити 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 р. та встановлення, що саме вони є основною причиною різноманітних вад ферментації, пройшло майже століття, однак проблема фаголізу 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/см³ [1].

За оцінкою іспанських вчених, принаймні 10 % зразків молока на молокопереробних підприємствах містять бактеріофаги молочнокислих бактерій [2]. Температурна обробка на виробництві дозволяє позбутися лише бактеріальної складової молока, тоді як віруси здатні витримувати температури в середньому на 20 °С вищі. Бактеріофаги завдяки своїм мікроскопічним розмірам здатні до аерозольного поширення. Так, встановлено, що в 1 м³ повітря на молочному підприємстві може міститися до 10³ 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 були майже припинені. Внаслідок відсутності фагового контролю на підприємствах кількість випадків порушення ферментації значно зростає. 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 у деяких країнах систематично здійснюється фаговий моніторинг на підприємствах молочної промисловості [4].

Мета. Проведення моніторингових досліджень різноманітної молочної продукції на наявність фагів молочнокислих бактерій.

Основні **об'єкти** фагового моніторингу — традиційні загальноживані продукти (сметана, кефір, сир кисломолочний, сир твердий, йогурт і заквашувальні культури для їх виробництва).

Матеріали і методи. Виділення бактеріофагів проводили методом «подвійного агару» із додаванням 10 мМ CaCl₂ [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.

Результати і обговорення. У результаті проведених моніторингових досліджень встановлено, що близько 80 % продуктів були забруднені фагами лактобактерій. У табл. 1 наведено дані про спектр обстеженої продукції різних виробників і результати фагового моніторингу. За ступенем контамінації ви-

значено три рівні фагового забруднення на виробництві: низький — від 10^1 БУО/см³; середній — від 10^2 до 10^4 БУО/см³ та високий — від 10^5 і більше БУО/см³. Показано, що 69 % зразків продукції містили фаги з титром від 10^5 і більше БУО/см³. Це III рівень забруднення фагами, який свідчить про доволі небезпечний фаговий стан підприємств.

Найзабрудненішими фагами з даної вибірки продуктів були зразки кефірів і сметани. Цей факт можна пояснити тим, що під час виготовлення кефірів і сметани виробники застосовують комплексні препарати, змішують різну мікрофлору (як мезофільну, так і термофільну), часто без урахування їх сумісності і фаготипів. Через це можуть відбуватися 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 бути розроблена чітка ротаційна програма, яка регламентує послідовність змін різних партій концентратів і 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 із 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, 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. Для з'ясування можливої контамінації фагами нами були досліджені зразки виробничих заквасок і бактеріальних концентратів. Результати тестування подано у табл. 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	-	-
Китай, виробник № 5	для йогурту	2	+	I

Як свідчать дані, наведені в табл. 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/см³ і більше, були виявлені гомологічні фаги не тільки до індикаторних культур лактобактерій з колекції відділу біотехнології ІПП, але й до штамів, що входять до складу цих препаратів. Цей факт пояснюється тим, що за наявності у заквасці фагів із титром 10^7 БУО/см³ може виникати 1 мутант фагів зі зміненим спектром літичної дії [7]. За таких обставин запобігти швидкій втраті активності заквасок чи концентратів не зможе ні ротація штамів, ні використання фагостійких культур.

Одним із етапів відбору фагостійких культур є встановлення лізогенного стану бактерій, оскільки такі культури потенційно небезпечні для застосування у біотехнологіях кисломолочних продуктів. Відомо, що лізогенні культури інколи спонтанно вивільняють вірулентні мутанти помірних фагів [8]. Нами було проведено дослідження з виявлення лізогенного стану молочнокислих бактерій із застосуванням різних методологічних підходів.

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

Таблиця 3. Здатність культур молочнокислих бактерій до спонтанного та індукваного вивільнення профагів

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

Отримані дані узгоджуються з результатами Б.В. Тараканова [9], згідно з якими лише 28 % з досліджених культур спонтанно вивільняли фаги, які добре репродукувались на культурі-хазяїні. З метою повнішої оцінки лізогенного стану культур проведено хлороформну індукцію профагів. У результаті з'ясовано, що фаги містились у культуральній рідині всіх оброблених штамів (табл. 3). Отже, обробка хлороформом є дієвішим засобом визначення лізогенності молочнокислих бактерій.

Висновки

Фаговий моніторинг передбачає виконання таких завдань: 1) системний контроль бактеріофагів для оцінювання умов виробництва; 2) виявлення джерел контамінації (внутрішні і зовнішні) та ступеня забруднення (титр фагів, вид фагів) виробництва бактеріофагами; 3) встановлення фізико-хімічних факторів, які можуть зумовити індукцію помірних фагів і виникнення фаголізу культур; 4) розробка ротаційних програм із залученням культур, стійких до типів фагів, що циркулюють на конкретному виробництві.

Література

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. Адамс. — 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 / Б.В. Тараканов // *Микробиология*. — 1996. — Т. 65, № 5. — С. 656—662.

ФАГОВЫЙ МОНИТОРИНГ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ

О.В. Науменко

Институт продовольственных ресурсов НААН Украины

В статье описаны мониторинговые исследования различной молочной продукции на наличие фагов молочнокислых бактерий такими вирусологическими методами: «двуслойный метод», метод «сбегающей капли», хлороформная индукция профагов. Установлено, что около 80 % продуктов содержали фаги лактобактерий. Показано, что важным внешним источником бактериофагов на предприятии могут быть заквасочные препараты. Проведены исследования по выявлению лизогенного состояния молочнокислых бактерий. Доказано, что фаговый мониторинг позволяет установить источники, степень фагового загрязнения — необходимые показатели для разработки эффективных противофаговых программ.

Ключевые слова: бактериофаги, мониторинг, индукция, лизогенность.