

**БАКТЕРІОФАГИ, ЩО ЦИРКУЛЮЮТЬ НА МОЛОКОПЕРЕРОБНИХ
ПІДПРИЄМСТВАХ УКРАЇНИ**

Проведено моніторингові дослідження зразків, отриманих від 5-ти молочних заводів, на присутність фагів молочнокислих бактерій. Встановлено, що біля 85% зразків містили фаги літично активні стосовно бактерій роду *Lactococcus*, а 33% зразків – видоспецифічні фаги *Streptococcus thermophilus*. Титр фагів лактобактерій у зразках коливався від 1 до 10^6 БУО/см³ залежно від використаної тест-культури. З об'єктів моніторингу цілеспрямовано вилучено 16 нових фагових ізолятів. Встановлено шість морфотипів негативних колоній, що утворювали фаги на газонах гомологічних до них культур. Показано, що додавання CaCl₂ у середовище впливало на ефективність репродукції деяких фагів. За цією ознакою 67% фагів достовірно збільшували свою чисельність при додаванні 10 мМ CaCl₂ – коефіцієнт кореляції Спірмана був позитивним і мав значення $r = 0,85$ ($n = 10$, $p < 0,05$). Досліджено вплив виділених фагів щодо промислових штамів з колекції відділу біотехнології ІПР. Встановлено, що фаги f_1, f_6, f_{10} та f_{16} були найагресивнішими по відношенню до заквашувальних культур. Значення індексу літичної активності I_L (відношення кількості лізованих штамів до числа випробуваних) для них коливалося від 0,26 до 0,35.

Ключові слова: бактеріофаг, молочнокислі бактерії, тест-культура, лізис, негативна колонія, репродукція

Были проведены мониторинговые исследования образцов, полученных от 5-ти молочных заводов, на присутствие фагов молочнокислых бактерий. Установлено, что около 85% образцов содержали фаги литически активные относительно бактерий рода *Lactococcus*, а 33% образцов – видоспецифичные фаги *Streptococcus thermophilus*. Титр фагов лактобактерий в образцах колебался от 1 до 10^6 БОЕ/см³ в зависимости от использованной тест-культуры. Из объектов мониторинга целенаправленно выделены 16 новых фаговых изолятов. Установлено шесть морфотипов негативных колоний, которые образовывали фаги на газонах гомологичных к ним культур. Показано, что добавление CaCl₂ в среду влияло на эффективность репродукции некоторых фагов. По этому признаку 67% фагов достоверно увеличивали свою численность при добавлении 10 мМ CaCl₂ – коэффициент корреляции Спирмана был положительным и имел значение $r = 0,85$ ($n = 10$, $p < 0,05$). Исследовано влияние выделенных фагов на промышленные штаммы из коллекции отдела биотехнологии ИПР. Установлено, что фаги f_1, f_6, f_{10} и f_{16} были самыми агрессивными по отношению к заквасочным культурам. Значение индекса литической активности I_L (отношение количества лизированных штаммов к числу исследуемых) для них колебалось от 0,26 до 0,35.

Ключевые слова: бактериофаг, молочнокислые бактерии, тест-культура, лизис, негативная колония, репродукция

Monitoring studies of the samples, obtained from 5 dairy plants, for the presence of lactic acid bacteria phages, were conducted. It was found that about 85 % of the samples contained phages, lytically active as for the genus *Lactococcus*, and 33 % of the samples – species-specific phages *Streptococcus thermophilus*. Phage titer of lactobacteria in the samples ranged from 1 to 10^6 PFU per ml depending on the used test-culture. 16 new phage isolates were purposefully allocated from monitoring objects. Six morphotypes of plaque were specified, that formed phages on lawns of homologous to them cultures. It was shown that addition of CaCl₂ in the medium affected the reproduction effectiveness of some phages. On this basis 67 % of phages significantly

increased their number when adding 10 mM of CaCl_2 – Spearman correlation coefficient was positive and had a value of $r = 0,85$ ($n = 10$, $p < 0,05$). The selected phages influence on industrial strains from the collection of Biotechnology Department of the Institute of Food Resources was studied. It was determined that phages f1, f6, f10 and f16 were the most aggressive to starter cultures. Lytic activity index value I_1 (ratio of lysed strains to the studied strains) for them varied from 0,26 to 0,35.

Key words: bacteriophage, lactic acid bacteria, test culture, lysis, negative colony, reproduction

Бактеріофаги разом з іншими представниками царства *Vira* є найбільш поширеними біологічними агентами на планеті. З моменту їх відкриття у 1915 році та встановлення, що саме вони є основною причиною неуспішної ферментації, пройшло майже століття, однак проблема фаголізису цінних промислових штамів молочнокислих бактерій і досі залишається актуальною. Внаслідок інфікування заквашувальних культур бактеріофагами, відбувається зниження ферментативної та кислотопродукуючої активності штамів, що призводить до погіршення якості готової продукції. Крім того може відбуватися вторинна контамінація молочних виробів сторонньою мікрофлорою [1]. Очевидно, що все це призводить до великих матеріальних втрат на виробництві, що спонукає вчених усього світу шукати можливі способи вирішення даної проблеми. 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 у сирому молоці, де їх кількість може сягати від 10^1 до 10^4 БУО/см³ [2]. За оцінкою іспанських вчених, принаймні 10% зразків молока на молокопереробних підприємствах містять бактеріофаги [3]. Температурна обробка, яку наразі використовують на виробництві, дозволяє позбутися лише бактеріальної складової молока, тоді як віруси здатні витримувати температури в середньому на 20°C вищі.

Окрім первинної сировини, джерелом бактеріофагів може бути сама культура молочнокислих бактерій, що містить профаги у своєму геномі. За результатами досліджень американських вчених 25 з 30 комерційних штамів молочнокислих бактерій, а саме *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus rhamnosus*, містять генетичну інформацію профагів [4]. Тривалий час ДНК помірних фагів може реплікуватися разом з бактеріальною, однак у випадку впливу будь яких стресових умов, як наприклад, голод, ультрафіолет, зневоднення, наявність у середовищі антимікробних сполук, відбудеться зміна поведінки вірусу, який з лізогенної стадії перейде у літичну і за лічені години знищить культуру.

Бактеріофаги завдяки своїм мікроскопічним розмірам здатні до аерозольного поширення. За деякими дослідженнями встановлено, що у 1 м³ повітря на молочному підприємстві може міститися до 10^3 фагових часток [5].

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. 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. Найбільш дієвим способом є використання фагостійких штамів мікроорганізмів. Щороку за допомогою методів молекулярної біології, генетичної інженерії та селекції створюються сотні нових, резистентних штамів, однак внаслідок високої адаптаційної мінливості вірусів бактерій уже протягом 2–3 технологічних процесів культура втрачає свою стійкість [6].

Безсумнівно розробка нових ефективних методів для боротьби з фаголізисом повинна базуватися на всебічному вивченні біологічних властивостей фагів. Подібні дослідження окрім практичної, мають і наукову цінність, оскільки дозволяють розширити наші знання щодо різноманітності бактеріофагів та особливостей їх життєвого циклу. За оцінками

експертів 2/3 всіх ферментаційних процесів здійснюється молочнокислими бактеріями виду *L. lactis*. Крім того значного поширення набули бактерії *S. thermophilus* під час виробництва різноманітної молочної продукції [7]. Відповідно, фаги, вірулентні по відношенню до цих видів бактерій є найпоширенішими на молокопереробних підприємствах України та світу, і залишаються головним об'єктом біотехнологічних досліджень, які націлені на попередження їхнього негативного впливу на процес виробництва молочнокислої продукції.

Метою роботи було дослідження поширення та властивостей вірулентних бактеріофагів лактобактерій на вітчизняних молокопереробних підприємствах. *Об'єктами досліджень* були бактеріофаги, виділені з промислових зразків молочної продукції.

Матеріали та методи досліджень. Фаговий моніторинг проводили зі застосуванням тест-культур для визначання фагів, використовуючи метод «подвійного агару» [8]. Підраховували кількість негативних колоній на поверхні чашок Петрі на фоні бактеріального росту. Кількість фагових часток у 1 см³ досліджуваної проби виражали у бляшкоутворювальних одиницях (БУО) та розраховували за формулою:

$$X = N_{\text{БУО}} \times 10^n, \text{ де}$$

X – кількість фагових часток у 1 см³ проби;

N_{БУО} – кількість негативних колоній у посівах;

n – число десятикратних розведень проби, в посівах яких у чашки Петрі підраховували негативні колонії.

Стійкість культур до бактеріофагів визначали шляхом нанесення фаголізатів на чашку Петрі з твердим поживним середовищем на основі гідролізованого молока та досліджуваною культурою в логарифмічній фазі росту – метод „збігаючої краплі”. У дослідах використовували бактеріофаги титру 10⁸ БУО/см³ об'ємом по 0,02 см³. Чутливими вважали ті штами, на газонах яких у місцях нанесення фаголізату спостерігали наявність зони лізису. Визначення загальної кількості молочнокислих бактерій – за ГОСТ 10444.11-89 [9]. Математичну обробку результатів здійснювали за допомогою програм Microsoft Exel 7.0 for Windows 95 Version 2.0 за загальноуживаними статистичними методиками [10].

Результати досліджень та їх обговорення.

Дослідження розповсюдження бактеріофагів молочнокислих бактерій на підприємствах молочної галузі. При створенні ефективної системи боротьби з бактеріофагом важливе значення має організація фагового моніторингу – постійного контролю за ступенем акумуляції фагів на виробництві [11]. Однак в Україні в останні десятиліття проблемі фаголізису не приділяли належної уваги як науковці, так і виробники. Зрозуміло, що за цих умов на кожному підприємстві відбулося нагромадження власних типів бактеріофагів і зростає кількість порушень перебігу ферментації, спричинених ними. Тому набувають особливої ваги дослідження, спрямовані на розробку та практичне застосування на виробництві ефективних сучасних моніторингових систем інгібіторів росту лактобактерій, зокрема визначення бактеріофагів, які мають різних біологічних хазяїв, але в тому чи іншому ступеню порушують нормальний розвиток комплексних заквашувальних культур.

Нами були проведені моніторингові дослідження зразків з 5-ти молочних заводів на присутність фагів молочнокислих бактерій. Встановлено, що біля 85% зразків містили фаги літично активні стосовно бактерій роду *Lactococcus*, а 33% зразків – видоспецифічні фаги *Streptococcus thermophilus* (табл. 1).

Фаговий моніторинг

№ п/п	Джерело виділення	Наявність фагів залежно від тест-культури, 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>S.thermophilus</i>
1	2	3	4	5	6
Завод № 1 Миколаївська обл.					
1	сироватка підсирна	++	-	-	-
2		+	-	-	+
3		+++	-	-	-
4		+++	-	-	-
Завод № 2 Київська обл.					
5	молоко коров'яче незбиране	++	+	-	++
6		++	-	-	+
Завод № 3 Черкаська обл.					
7	молочна сироватка	+++	-	++	
8	сироватка молочна підсирна	++	+	+	
9	к/м продукт	-	-	-	++
10	закваска	-	-	-	+++
11	сироватка молочна підсирна (М)	++	-	-	
12	сироватка молочна підсирна (R)	-	-	-	
13	сироватка молочна підсирна (P)	+++		+	
14	сироватка молочна підсирна закваска (Ц)	++	-	-	
15	сироватка молочна підсирна закваска (P)	+++	-	-	+++
16	сироватка молочна підсирна закваска (R)	-	-	-	
17	сироватка молочна підсирна закваска (M)	++	-	-	
18	сироватка молочна підсирна закваска (R)	+			
19	сироватка молочна підсирна (закваска M)	+++			
20	сироватка молочна підсирна (закваска P)	++			+
21	сироватка молочна підсирна (закваска R)	+++		++	
22	молоко з сирю виготовлювача	-	-	-	+
23	заквашена молочна суміш перед внесенням фермента	+++	-	-	++
24	молочний згусток перед розрізкою	+++			+++
25	сироватка після розрізки	+++			+++

1	2	3	4	5	6
Завод № 4 Полтавська обл.					
26	сироватка молочна підсирна	++	-	-	+++
27	сироватка підсирна 1д	++	-	+	
28	сироватка підсирна 3д	++	-	-	
29	сироватка підсирна 6д	+++	-	-	++
30	сироватка підсирна 1д	+++	-	-	
31	сироватка підсирна 3д	+++	+	+	
32	сироватка підсирна 6д	+++	++	++	
33	сироватка підсирна № 1	+	-	-	
34	сироватка підсирна № 2	+	-	-	
35	сироватка підсирна № 1	+	-	-	
36	сироватка підсирна № 2	+		-	
37	сироватка підсирна № 1	-	-	-	
38	сироватка підсирна № 2	-	-	-	
39	сироватка підсирна № 1	+			
40	сироватка підсирна № 2	++	+	+	
41	сироватка підсирна № 3	+++	-	+	+++
Завод № 5 Івано-Франківська обл.					
42	сироватка підсирна	+++	++	-	
43	сироватка підсирна	+++	++	-	
44	сироватка підсирна	+++	++	-	
45	сироватка підсирна	+++	+++	-	+++

Примітка: – лізис відсутній; + лізис одного тест-штаму; ++ лізис трьох тест-штамів; +++ лізис більше трьох тест-штамів

Титр фагів лактобактерій у забруднених зразках коливався від 1 до 10^6 БУО/см³ залежно від використаної чутливої культури. Якщо порівнювати отримані данні фагового моніторингу з попередніми нашими дослідженнями [12] можна побачити, що поступово зростає ступінь контамінації фагами *Streptococcus thermophilus*. Такий експериментальний фактаж підтверджує дві тези: 1) суб'єктивний підхід – напрацьовані методологічні підходи підвищують ефективність моніторингу; 2) об'єктивний підхід – свідчить про те, що, на підприємствах молочної галузі належної уваги моніторингу фагів не приділяють.

Дослідження ростових параметрів фагів.

З об'єктів моніторингу було цілеспрямовано вилучено 16 нових фагових ізолятів. Встановлено морфологічну різноманітність негативних колоній, що утворювали ці фаги на газонах гомологічних до них культур. З негативної колонії кожного морфологічного типу відбирали матеріал і після процедури очищення впродовж 5–7 послідовних циклів (1 цикл включає кокультивування з чутливою культурою у рідкому середовищі, висів методом «подвійного агару», виділення колонії ідентичної морфології) отримували чисті лінії фагів. На рис. 1 показано зовнішній вигляд 6-ти морфотипів негативних колоній фагів.

Експерименти по титруванню одного і того ж фагового ізоляту на різних тест-культурах показали, що розміри і характер краю негативних колоній, а іноді і ступінь їх прозорості дуже сильно залежать від штаму – гомологічного до цього фагу. Таким чином, стає очевидним умовний характер досліджуваної ознаки (морфологія негативних колоній), який дає відтворювані результати лише при використанні, як індикаторних культур, одних і тих же бактерій-господарів, і проведенні досліджень у абсолютно однакових умовах.

Нами встановлено, що на репродукцію фагів впливали, як тип штаму, фізіологічний стан та вік бактеріальної культури, так і склад поживного середовища для визначання бактеріофагів.

Так, додавання CaCl_2 у середовище впливало на активність росту деяких фагів. Причому для нагромадження у максимальному титрі фаги потребували різної концентрації цього компонента в середовищі. За цією характеристикою фаги умовно розподілили на 3 групи (рис. 2).

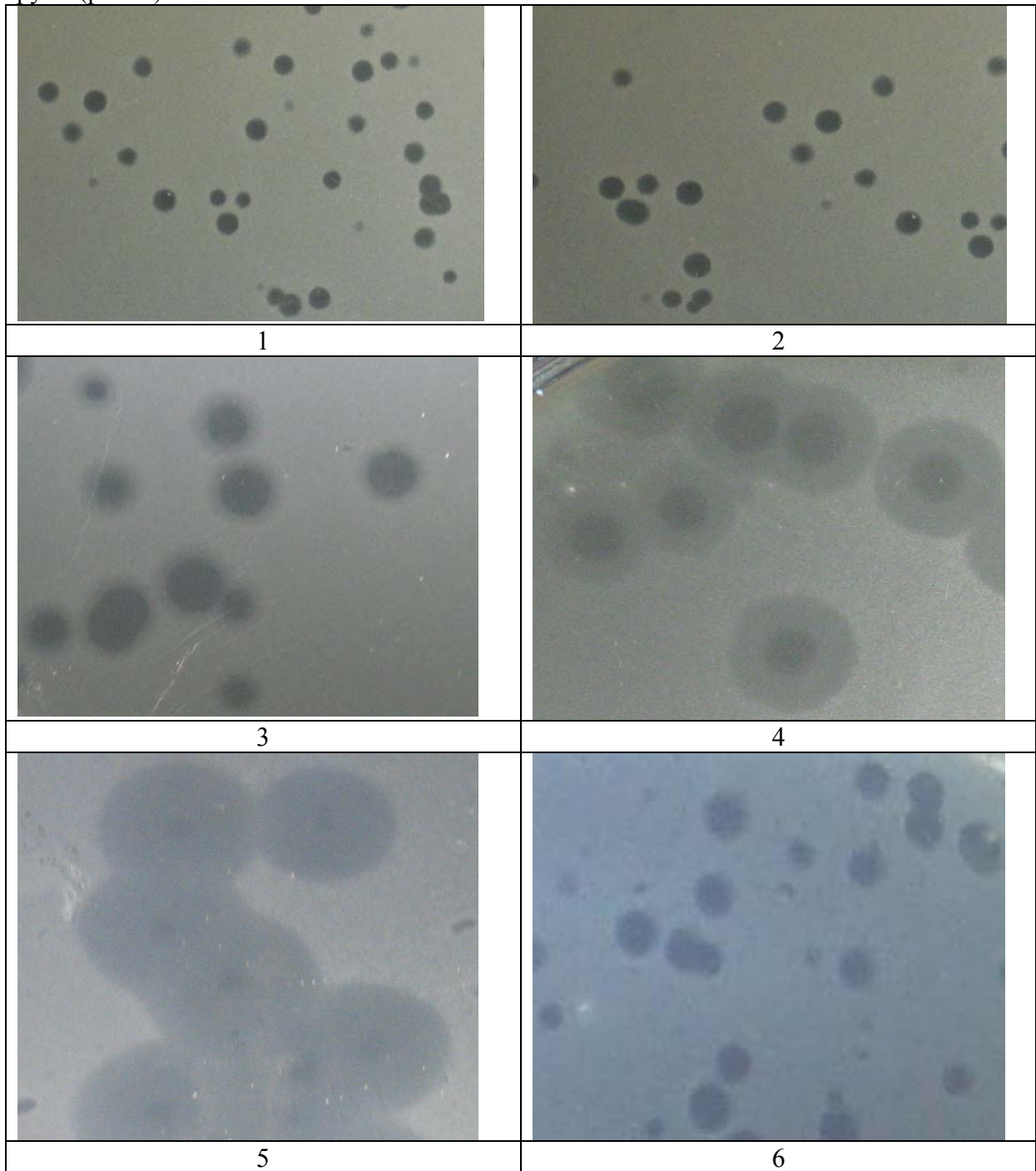
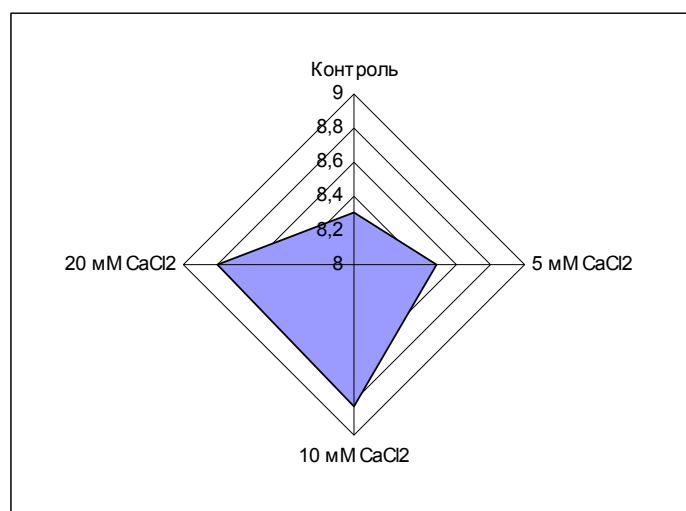


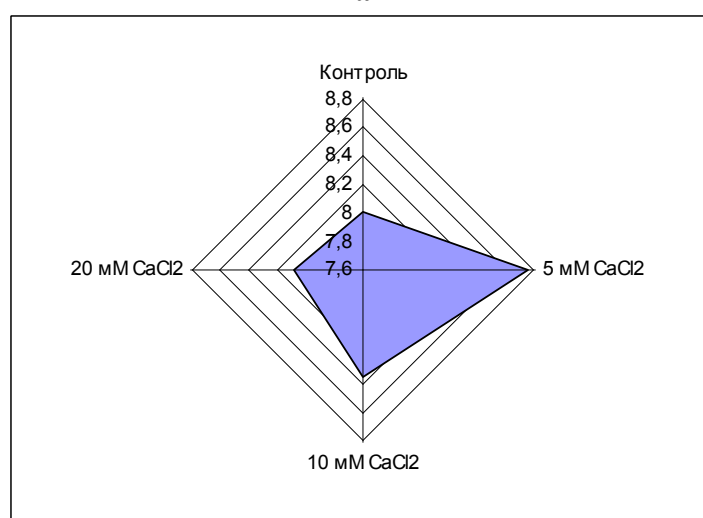
Рис. 1. Морфологія негативних колоній бактеріофагів,

метод подвійного агару:

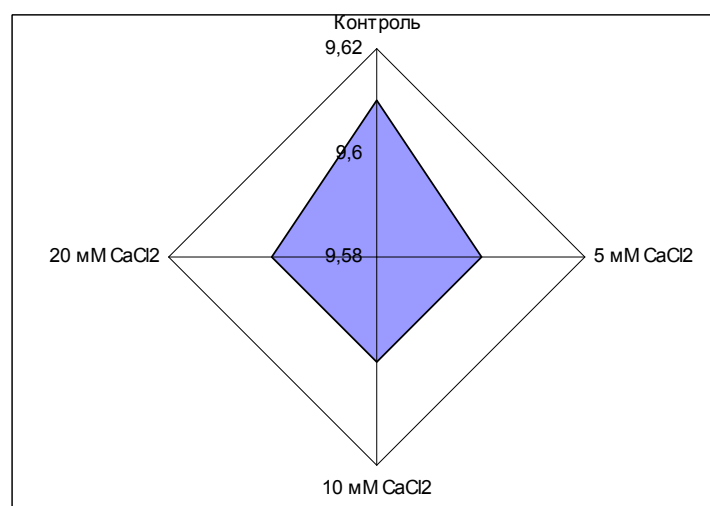
- 1 – рівний край, без ореолу (d 0,5–2,0 мм);
- 2 – рівний край, без ореолу (d 2,0–3,0 мм);
- 3 – розмитий край, ореол (d 2,5–4,0 мм);
- 4 – рівний край, ореол великий (d 2,5–6,5 мм);
- 5 – розмитий край, ореол великий (d 3,0–7,0 мм);
- 6 – розмитий край, без ореолу (d 2,5–3,5 мм)



а



б



с

Рис. 2. Вплив CaCl₂ на репродукцію фагів:

а – I група фагів – потребує додавання 10 мМ CaCl₂; б – II група фагів – потребує додавання 5 мМ CaCl₂; с – III група фагів – не потребує додавання CaCl₂

Фаги I групи достовірно збільшували свою чисельність при додаванні 10 мМ CaCl₂ – коефіцієнт кореляції Спірмана був позитивним і мав значення $r = 0,85$ ($n = 10$, $p < 0,05$). Ця група охоплювала 67% ізолятів з досліджуваної вибірки фагів.

Нагромадження фагів II групи було менш залежним від хлориду кальцію, тим не менш фіксували дещо кращий рівень накопичення за концентрації 5 мМ CaCl₂ у середовищі.

Фаги III групи не потребували для своєї репродукції CaCl₂ та характеризувались найбільшою урожайністю – приріст фагів за однакових умов був на 92–93% більшим порівняно з фагами інших груп.

Отримані дані узгоджуються з літературними. Так, V.Suarez встановив, що іони Ca⁺² (10 мМ) не впливали на кінетику адсорбції фагів *L. lactis*, але були необхідними для ефективного лізису клітин [13].

Вивчення спектру літичної активності фагів. Відомо, що спектр літичної активності є однією з обов'язкових таксономічних ознак вірусів [14]. Тестували інфекційність фагів щодо промислових штамів з колекції відділу біотехнології методом «збігаючої краплини». Результати подано у таблиці 2. Встановлено, що 61% від досліджених штамів характеризувались високою фагостійкістю – були резистентними відносно впливу 16 фагів. Два штами були чутливими до всіх досліджуваних фагів, чотири штами були чутливими до 8–12 фагів. Три штами піддавались лізису під впливом від 3 до 5 фагів. За індексом літичної активності I_л (відношення кількості лізованих штамів до числа випробуваних) встановлено, що фаги f₁, f₆, f₁₀ та f₁₆ були найагресивнішими по відношенню до досліджених бактерій. Значення I_л для них коливалися у діапазоні значень від 0,26 до 0,35. Це доволі високі значення, які свідчать про значну інфекційність та небезпечність досліджуваних фагів щодо заквашувальної мікрофлори.

Інтенсивність літичного впливу спостерігали візуально. Фаги формували на газонах чутливих культур різні за морфологією зони лізису. Ми спостерігали три морфологічні віаранти зон лізису: 1) стерильна зона, всередині вторинний ріст культури у вигляді окремих колоній; 2) мутна зона лізису всередині, по краям стерильний ореол; 3) чітка стерильна зона.

Після проведених досліджень на встановлення специфічності бактеріофагів для кожного з них було відібрано індикаторну культуру, на якій напрацьовувалася максимальна кількість вірусних часток.

Фаговий титр після чотирьохгодинного кокультивування чутливих культур з бактеріофагами коливався у діапазоні значень не менше ніж від 2,4x10⁵ до 5,2x10⁸ вірусних часток у см³ середовища.

Висновки

У результаті проведеної роботи було визначено джерела фагової контамінації та основні контрольні точки для здійснення фагового моніторингу на виробництві. З промислових зразків молочної продукції цілеспрямовано вилучено 16 нових фагових ізолятів. Досліджено деякі біологічні властивості фагів: морфологію негативних колоній, видоспецифічність, літичну активність. Встановлено умови репродукції виділених фагів.

Отримані науково-методологічні підходи щодо фагового моніторингу склали підґрунття для створення «Методичних рекомендацій для визначення бактеріофагів на молокопереробних підприємствах» [15].

Чутливість лактобактерій до виділених бактеріофагів

Номер штаму	Бактеріофаги															
	f ₁ S*	f ₂ R**	f ₃	f ₄	f ₅	f ₆ S	f ₇	f ₈	f ₉	f ₁₀ S	f ₁₁	f ₁₂	f ₁₃ S	f ₁₄	f ₁₅ S	f ₁₆ S
1	S	R				S				S			S		S	S
2	S	S	S	S	S		S				S			S	R	R
3	S	S	S		S	S		S		S	S		S	S	S	S
4	S	S		S			S		S	S		S		S	R	R
5	S		S	S		S		S	S	S		S		S	S	S
6															R	R
7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
8															R	R
9															R	R
10															R	R
11															R	R
12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
13															R	R
14															R	R
15															R	R
16															R	R
17															R	R
18										S					S	S
19															R	R
20	S					S									S	S
21															R	R
22															R	R
23															R	R
I _Л **	0,35	0,22	0,22	0,22	0,17	0,26	0,13	0,22	0,17	0,30	0,17	0,13	0,22	0,22	0,22	0,30

Примітка: * S – фагочутливий штам; ** R – фагостійкий штам; *** I_Л – індекс літичної активності.

Література

1. Szczepańska A., Hejnowicz M. S., Kołakowski P., Bardowski J. Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in Polish dairy environment // *Acta Biochimica Polonica*. – 2007. – Vol. 54, № 1. – P. 151–158.
2. Garneau J., Moineau S. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations // *Microbial Cell Factories*. – 2011. – Vol. 10, № 2. – P. 1–10.
3. Deveau H., Labrie S., Chopin M.-C., Moineau S. Biodiversity and classification of *Lactococcal* phages // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – Vol. 72, № 6. – P. 4338–4346.
4. Marcy M., Moineau S., Quiberoni A. Bacteriophages and dairy fermentations // *Bacteriophage*. – 2012. – Vol. 2, № 3. – P. 149–155.
5. Verreault D., Gendron L., Rousseau M., Veillette M., Masse D., Lindsley G., Moineau S., Duchaine C. Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2011. – Vol. 77, № 2. – P. 491–497.
6. Raiski A., Belyasova N. Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in the Republic of Belarus // *International Journal of Food Microbiology*. – 2009. – Vol. 130, № 1. – P. 1–5.
7. Broadbent J. R., McMahon D. J., Welker D. L., Oberg C.J., Moineau S. Biochemistry, genetics and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus* // *J. Dairy Sci.* – 2003. – Vol. 86. – P. 407–423.
8. Адамс М. Бактериофаги. – М. : Мир. – 1961. – 527 с.
9. ГОСТ 10444.11-89 Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов.
10. Васнев С. А. Статистика : Учебное пособие. – Москва : МГУП. – 2001. – 170 с.
11. 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.
12. Науменко О. В. Поширення бактеріофагів на молочних заводах України // *Sp. Z. O.o. «Nauka I studio», (Premysl, Польша). VIII Межд. Науч.-практ. Конференція «Наука и инновации-2013», 07.10–15.10.2013 Прага. – 2013. – Vol. 16. – P. 81–86.*
13. Suarez V., Moineau S., Reinheimer J., Quiberoni A. Argentinean *Lactococcus lactis* bacteriophages: genetic characterization and adsorption studies // *Journal of Applied Microbiology*. – 2007. – Vol. 104, № 2. – P. 371–379.
14. Hussain K., Masud T., Maqsood S., Mahmood T. Characterization of *Lactococcus* phages from dahi whey // *Pakistan J. of Nutrition*. – 2008. – Vol. 7, № 5. – P. 689–694.
15. Свідоцтво про реєстрацію авторського права на твір № 53030 Брошура «Методичні рекомендації з визначення бактеріофагів на молокопереробних підприємствах» // О. В. Науменко, Н. Ф. Кігель. – Заявка № 53309. Заявлено 07.11.2013. – Дата реєстрації 11.01.2014 р.