

ПРОГРАМА РОЗШИРЕНОГО ФАГОВОГО МОНІТОРИНГУ

Проведено моніторингові дослідження 156 зразків різноманітної молочної продукції на присутність фагів молочнокислих бактерій, отриманих від 10 різних молокопереробних підприємств. Встановлено, що 73% зразків були контаміновані бактеріофагами лактобактерій різних таксонів. Встановлено позитивну кореляцію ($r_s=0,78$, $n = 10$, $p < 0,05$) між показником C_{ϕ} , що показує кількість видоспецифічних фагів та K_k коефіцієнтом контамінації. Отже, виявлення різних за видоспецифічністю фагів свідчить про небезпечне фагове забруднення об'єкта незалежно від рівня його контамінації. Проведено аналіз факторів ризику - джерел накопичення фагів. Показано, що сировина та повітря, відповідно, у 1,5 та 2,2 рази частіше забруднені фагами ніж обладнання.

Ключові слова: бактеріофаги, лактобактерії, контамінація, моніторинг, видоспецифічність, кореляція.

Проведены мониторинговые исследования 156 образцов различной молочной продукции на присутствие фагов молочнокислых бактерий, полученных от 10 различных молокоперерабатывающих предприятий. Установлено, что 73% образцов были контаминированы бактериофагами лактобактерий различных таксонов. Установлено положительную корреляцию ($r_s=0,78$, $n = 10$, $p < 0,05$) между показателем C_{ϕ} , показывающим количество видоспецифических фагов и K_k коэффициентом контаминации. Следовательно, выявление различающихся по видоспецифичности фагов свидетельствует об опасном фаговом загрязнении объекта независимо от уровня его контаминации. Проведен анализ факторов риска - источников накопления фагов. Показано, что сырье и воздух, соответственно, в 1,5 и 2,2 раза чаще загрязнены фагами, чем оборудование.

Ключевые слова: бактериофаги, лактобактерии, контаминация, мониторинг, видоспецифичность, корреляция.

It was held a monitoring study of 156 samples of different dairy products for the presence of lactic acid bacteria phages. These samples were obtained from 10 different dairy plants. It was defined that 73 % of the samples were contaminated by bacteriophages of lactic acid bacteria of different taxons. It was established a positive correlation ($r_s=0,78$, $n = 10$, $p < 0,05$) between indicator C_{ϕ} , that shows species-specific phages number and contamination coefficient K_k . So, detection of different by their specificity phages tells about object's dangerous phage contamination regardless of its contamination level. A risk factors (phages accumulation sources) analysis was done. It was shown that raw materials and air by 1,5 and 2,2 times, respectively, were more polluted with phages than equipment.

Key words: bacteriophages, lactic acid bacteria, contamination, monitoring, species-specificity, correlation.

Бактеріофаги, що вражають молочнокислі бактерії роду *Lactococcus* на сьогодні є однією з найбільш досліджених груп, більше уваги ніж їм приділяється, хіба що вірусам, які інфікують *E. coli*. Така зацікавленість пояснюється передусім значними економічними збитками, яких зазнає молочна промисловість внаслідок фаголізу заквашувальної мікрофлори. Перший випадок враження бактеріофагами заквашувальної культури молочнокислих бактерій був зафіксований Коксом та Вайтхедом ще у 1935 році. Підвищення рівня рН, висока концентрація лактози, низький вміст молочної кислоти – це неповний перелік наслідків ураження культури бактеріофагами [1-2].

Чутливість культур закваски до інфекції бактеріофага залишається проблемою під час виробництва різноманітної кисломолочної продукції та сирів. Молочні фаги виявляються у сирому молоці, вони витримують пастеризацію, мають короткий латентний період [3].

Фаги завжди присутні у навколишньому середовищі виробництва молочних продуктів і тому завданням біотехнологів є насамперед визначати рівень забруднення, для того щоб унеможливити їхнє неконтрольоване поширення. Фаговий контроль полягає у застосуванні різних практичних засобів: дотримання та удосконалення санітарних умов (окремі виробничі, заквашувальні приміщення, продумана система технологічного обладнання, вентиляції і т.д.), ротація штамів у заквашувальній культурі, використання фагорезистентних заквасок і т.д.

У разі гальмування чи зупинки ферментації молока, першочерговим кроком звичайно є дослідження на наявність літичних фагів. Для детекції молочних фагів найдоступнішими є мікробіологічні методи [4]. В останні роки деякі виробники заквашувальних культур розширили свій аналіз до ідентифікації виду фагу. Розроблено методи для ідентифікації найпоширеніших видів фагів - моноклональні антитіла, ДНК зондування, ПЦР. Ці детекційні способи мають також забезпечувати можливість ідентифікації нових видів фагів, що з'являються [5-6].

Метою роботи було – аналізування фагового стану вітчизняних молоко-переробних підприємств для розробки програми розширеного фагового моніторингу.

Матеріали та методи досліджень

Об'єктами досліджень були зразки молочної сировини, молочних сумішей, готової молочної продукції, виробничі закваски, змиви з обладнання, сироватка, повітря виробничих приміщень, ізоляти фагів молочнокислих бактерій, виділені за умов виробництва, штами молочнокислих бактерій з колекції відділу біотехнології ІПР. Вилучення фагів проводили у агаризованому поживному середовищі на основі гідролізованого молока, використовуючи метод подвійного агару із 10 мМ CaCl₂ [4]. Як тест-культури для визначання бактеріофагів молочнокислих бактерій використовували спеціально підібрані штами *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *L. lactis ssp. lactis biovar diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, нелізогенні та чутливі до широкого кола фагів. Реєстрували кількість зон лізису тест-культури, титр фагів виражали у бляшкоутворювальних одиницях у см³ (БУО/см³). Графічну обробку результатів здійснювали за допомогою програм Microsoft Exel 7.0 for Windows 95 Version 2.0, обробку даних - за допомогою комп'ютерної програми „Excel XP” за загальноноживаними статистичними методиками [7].

Результати досліджень та їх обговорення.

Для проведення цілеспрямованої боротьби з фаголізисом необхідно мати відомості про розповсюдження бактеріофагів на підприємствах, дослідити біологічні джерела розмноження фагів [8].

Були проведені моніторингові дослідження 156 зразків різноманітної молочної продукції на присутність фагів молочнокислих бактерій, отриманих від 10 різних молокопереробних підприємств. Встановлено, що 73% зразків були контаміновані бактеріофагами лактобактерій різних таксонів.

На рисунку 1 показано розподіл досліджуваних зразків за видоспецифічністю фагів, що їх контамінували. Більшість зразків містили фаги активні щодо *Lactococcus lactis* – 53 зразків, дещо менше зразків були забруднені лише фагами *Streptococcus thermophilus* – 48 зразок. Необхідно зауважити, що у 8,3% зразків було виявлено фаговий коктейль, тобто вони містили фаги активні як до мезофільної, так і до термофільної заквашувальної мікрофлори.

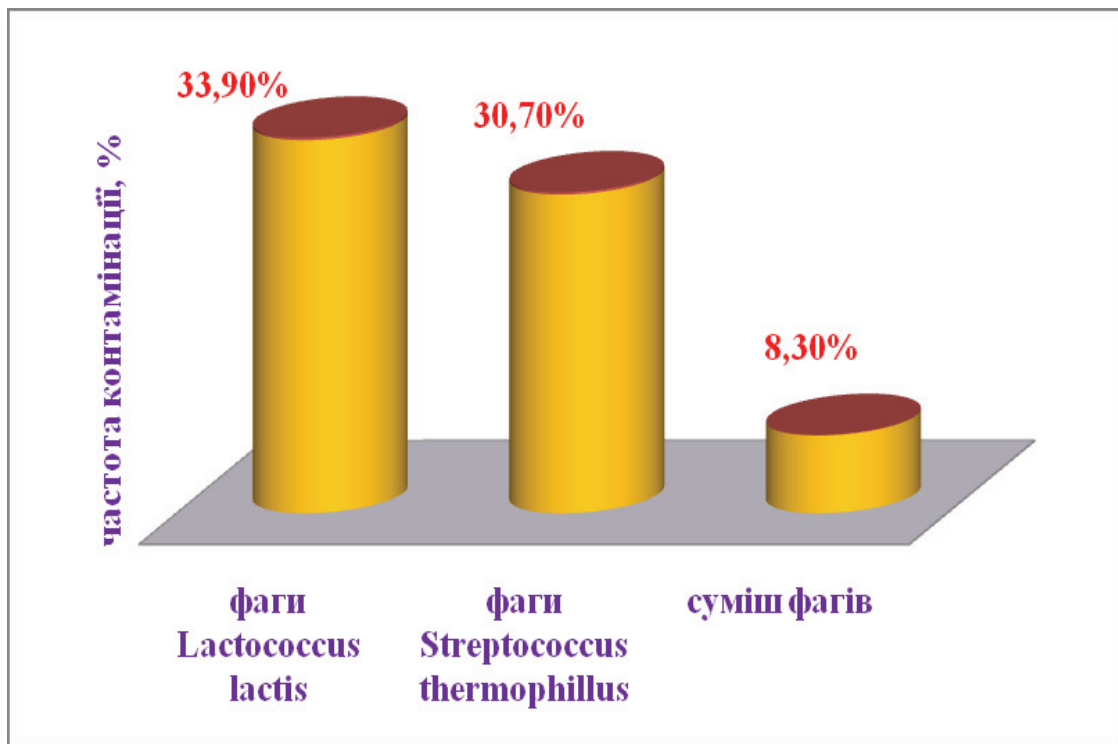


Рис. 1. Розподіл зразків за видоспецифічністю фагів

Для аналізу фагового стану конкретного підприємства провели серію розрахунків фагових формул.

Показник широти спектру бактеріофагів S_{ϕ} визначали за кількістю видів бактеріофагів, які було виявлено за допомогою відповідних тест-культур на підприємстві в цілому.

Коефіцієнт контамінації K_k (забруднення) об'єкта бактеріофагом розраховували за формулою:

$$K_k = \frac{K_{\phi}}{K_m} \times 100,$$

де

K_k - коефіцієнт контамінації об'єкта бактеріофагом, %;

K_{ϕ} – кількість фагів, які було виявлено на об'єкті за допомогою певної тест-культури, шт.;

K_m – загальна кількість тест-культур, які було використано під час фагового моніторингу, шт.

Результати подано в таблиці 1. Як свідчать данні таблиці лише один завод №1 характеризувався стабільним безпечним фаговим станом - рівень фагового забруднення не перевищував 10^1 БУО/см³. Натомість більшість підприємств (60% від заг.) характеризувалась II рівнем фагової контамінації – титр фагів становив 10^2 - 10^4 БУО/см³. На 7-ми заводах циркулювали фаги з широким спектром літичної дії (табл.1).

Встановлено, що показник S_{ϕ} , який показує кількість видоспецифічних фагів, корелює з K_k коефіцієнтом контамінації. Обрахування коефіцієнту кореляції дозволило встановити достовірний зв'язок між цими характеристиками - коефіцієнт кореляції Спірмана був позитивним і мав значення $r_s=0,78$ ($n = 10$, $p < 0,05$).

Отже, виявлення різних за видоспецифічністю фагів свідчить про незадовільний фаговий стан, небезпечне фагове забруднення об'єкта незалежно від рівня контамінації.

Нами було проведено розширений аналіз фагового стану трьох молокопереробних підприємств. Результати подано на рис. 2.

Показники фагового моніторингу

Об'єкт дослідження	К _ф кількість фагів	С _ф широта спектру фагів	Рівень забруднення	К _к коефіцієнт контамінації, %
<i>Завод №1,</i> Черкаська обл.	4	1	I рівень	28,5
<i>Завод 2,</i> Київська обл.	4	1	II- III рівень	28,5
<i>Завод 3,</i> Полтавська обл.	10	3	II рівень	71,4
<i>Завод 4,</i> м. Київ	7	3	II рівень	50,0
<i>Завод 5,</i> Миколаївська обл.	3	2	II рівень	21,4
<i>Завод 6,</i> Київська обл.	8	3	II рівень	57,1
<i>Завод 7,</i> Тернопільська обл.	6	2	II рівень	42,8
<i>Завод 8,</i> Житомирська обл.	5	1	III рівень	35,7
<i>Завод 9,</i> Київська обл.	12	3	II- III рівень	85,7
<i>Завод 10,</i> м. Київ	8	3	II рівень	57,1

Примітка: К_т - 14 шт.

Аналіз отриманих даних показав, що важливим фактором ризику -джерелом накопичення фагів на виробництві є повітря виробничих приміщень. Так, на прикладі заводу № 1 видно, що контролювання чистоти лише обладнання не дає змоги виявити джерело появи фагів у продуктах. На прикладі заводу №2 показано, що частота контамінації фагами зразків повітря у 1,3 рази більша ніж обладнання. А на заводі №3 повітря виробничих приміщень вже у 2,2 рази більше контаміновано фагами ніж обладнання. Титр фагів становив 10^3 – 10^4 БУО/м³ повітря.

Отже, повітря виступає важливим фактором ризику, що потребує ретельнішого контролювання. Натомість, як правило, більшої уваги на молокопереробних заводах приділяють саме контролю обладнання. Зрозуміло, що обладнання регулярно миється і дезінфікується. Обробка ж повітря застосовується інколи - не має системного характеру.

Встановлено, що небезпечним джерелом появи фагів на виробництві є сировина. Показано, що сировина майже у 1,5 рази частіше забруднена фагами ніж обладнання (рис. 2, завод №3).

Таким чином, фаговий моніторинг на молокопереробних та сироробних підприємствах повинен містити комплекс досліджень:

- контроль повітря виробничих приміщень;
- визначення наявності бактеріофагу на обладнанні;
- визначення наявності бактеріофагу в молочній сировині та продукції.

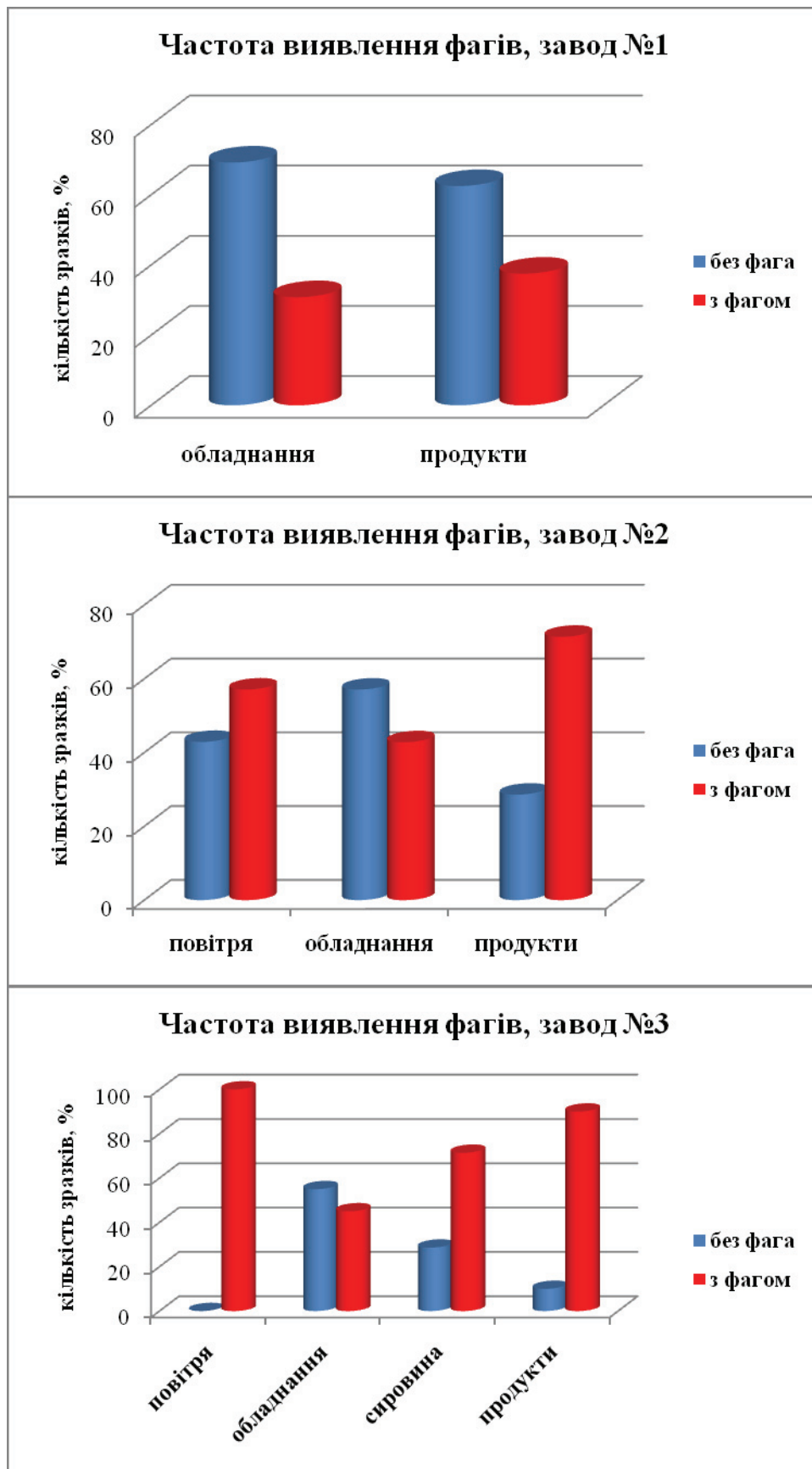


Рис. 2 Аналіз факторів ризику-джерел накопичення фагів

Висновки

Програма розширеного фагового моніторингу дозволяє:

по-перше - виявити фактори ризику, що спричиняють або сприяють відхиленню фагової ситуації від норми;

по-друге - розробити та реалізувати коректні протифагові заходи, як профілактичні – за відсутності фагів, так і для знищення фагової інфекції - в разі виявлення фагів.

Література

1. Deveau H. Biodiversity and classification of lactococcal phages /H. Deveau, S. Labrie, M.-C. Chopin, S. Moineau // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – Vol. 72, № 6. – P. 4338–4346.

2. Garneau J. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations / J. Garneau, Moineau S. // Microbial Cell Factories. – 2011. – Vol. 10, № 2. – P. 1-10.

3. Marcy M. Bacteriophages and dairy fermentations / M. Marcy, S. Moineau, A. Quiberoni // Bacteriophage. – 2012. – Vol. 2, № 3. – P. 149-155.

4. Адамс М. Бактериофаги. – М.: Мир. - 1961. – 527 с.

5. 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.

6. Labrie S. Multiplex PCR for detection and Identification of Lactococcal bacteriophages / S. Labrie, S. Moineau // Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – Vol. 66, № 3. – P. 987–994.

7. Васнев С.А. Статистика: Учебное пособие Москва: МГУП.- 2001. - 170 с.

8. Raiski A. Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in the Republic of Belarus / A. Raiski, N. Belyasova // International Journal of Food Microbiology. – 2009. – Vol. 130, № 1. – P.1-5.