

*А.Н. Казак, С.Л. Василенко, Н.Н. Фурик*

*Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь*

## **ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ В ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ**

*Проведен отбор 169 образцов молочной продукции (сметана и сметанный продукт, творог, сыр, ряженка, йогурт и йогуртный продукт, молоко сырое), а также сыворотки творожной и подсырной, рассолов из соляных бассейнов, образцы лужи с пола цеха, пробы воздуха и т.п. Определено качественное и количественное содержание вирусных частиц в отобранных образцах продукции. Проведен анализ литической активности бактериофагосодержащей молочной продукции на индикаторные культуры.*

**Введение.** Производство ферментированных молочных продуктов основано на использовании заквасок (традиционных и прямого внесения), бактериальных концентратов и монокультур, включающих в свой состав микроорганизмы разных таксономических групп. Получение готовых продуктов с заданным комплексом свойств во многом определяется составом и свойствами применяемых микроорганизмов. Наиболее часто для производства ферментированных молочных продуктов (в частности, творога, сметаны, ряда кисломолочных напитков и т.п.) используются бактериальные концентраты и закваски, в состав которых входят штаммы лактококков и термофильного стрептококка [1, 2]. Ферментация молока – микробиологический процесс, уязвимый к воздействию бактериофагов. Более того, именно фаговые инфекции являются наиболее частой причиной замедления или вовсе остановки процесса сквашивания [3].

Фаги содержатся в молоке и присутствуют в окружающей среде всех молочных заводов. Лизис бактерий в ферментерах, вызванный бактериофагами, уменьшает выход конечного продукта или снижает его качество, нанося тем самым экономический ущерб предприятиям [3]. Снижение активности молочнокислого брожения из-за действия бактериофагов наблюдается при выработке 5-15 % ферментированных молочных продуктов [4-5]. Особую опасность представляют фаги, способные лизировать широкий спектр молочнокислых

микроорганизмов, в том числе и лактококков. Так как на заводах для обеспечения ассортимента выпускаемой продукции используются одновременно несколько партий поливидовых концентратов молочнокислых бактерий, это приводит к возникновению фагов с новыми, более широкими, спектрами литической активности [5]. Они обладают повышенной вирулентностью по сравнению с фагами, выделенными на молочных фермах и молокоприемных пунктах [4]. Бактериофаги могут попадать на производство экзогенно (из воздуха промышленного цеха, из сырого молока, с различными добавками и др.) или эндогенно (вирулентные мутанты профагов лизогенных культур, используемых в заквасках).

Широкое распространение лактофагов на молочных производствах вынуждает производителей и исследователей искать все новые пути борьбы с фаговой инфекцией. Основным способом предотвращения массового лизиса на предприятиях является создание и использование в производстве фагоустойчивых бактериальных заквасок и концентратов. У некоторых штаммов *Lc. lactis* обнаружен естественный механизм защиты от фагов, который заключается в наличии у данных штаммов «антифаговых» плазмид. В настоящее время в литературе описано более 40 таких внехромосомных генетических элементов [6]. Данный механизм защиты широко эффективен не только против одного вируса, но и против множества фагов одного вида, а в некоторых случаях и против бактериофагов нескольких видов.

Таким образом, необходимо проводить постоянное выделение и изучение бактериофагов молочнокислых бактерий для использования их при определении фагочувствительности культур и комбинаций штаммов молочнокислых бактерий, используемых для изготовления бактериальных концентратов, для отбора наиболее устойчивых к фаговой инфекции консорциумов.

**Материалы и методы исследований.** Объектами исследований являлись 18 индикаторных культур лактококков, 16 производственных штаммов лактобацилл, 5 – термофильных стрептококков из Централизованной отраслевой коллекции промышленных штаммов молочнокислых бактерий РУП «Институт мясо-молочной промышленности»; 191 образец молочной продукции, а также образцы рассолов из соляных бассейнов, сыворотки подсырной и творожной, воздуха производственных помещений и лужи с пола цеха; 68 фаговых изолятов, выделенных из фагосодержащих образцов молочной

продукции (сметана, творог, сыр, подсырная и творожная сыворотка и т.д.), отобранных на молочных заводах Республики Беларусь.

Культивирование микроорганизмов осуществляли в средах ГО [5] – лактококки, термофильный стрептокок, MRS [1] – лактобациллы, лактококки, M17 [3] – лактококки, термофильный стрептокок. Агаризованные плотные среды содержали 1,5% агара, полужидкие среды – 0,6% агара. Инкубировали микроорганизмы в термостате при  $30\pm 1$  °C (*Lc. lactis*),  $34\pm 1$  °C (*Lb. plantarum*, *Lb. casei*),  $37\pm 1$  °C (*Lb. rhamnosus*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*) и  $42\pm 2$  °C (*Lb. bulgaricus*, *Lb. lactis*, *Str. thermophilus*).

*Получение фагосодержащей пробы продукции.*

Предварительная подготовка образца включала перевод из «твердого» состояния (для творога и сыра) в растворенное состояние, для чего используемый образец стерильно растирали в ступке с физиологическим раствором в соотношении 1:9; в жидких молочных продуктах осаждение белков молока производили добавлением 10 %-ной молочной кислоты.

Предварительно подготовленные образцы и жидкие продукты, не нуждающиеся в дополнительной обработке (сыворотка, сметана, йогурт и др.), очищали от твердых взвешенных частиц центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10-15 мин. Надосадочную жидкость подвергали вторичной обработке центрифугированием при 5000 об/мин в течение 30 мин для осаждения бактериальных клеток. Полученные фугаты консервировали хлороформом и использовали в дальнейшей работе.

*Определение наличия фагов в образцах продукции.* Индикаторную культуру выращивали в жидкой оптимальной среде при оптимальной температуре в течение  $16\pm 2$  ч, после чего 0,3 мл выросшей культуры смешивали с 5 мл той же среды, содержащей 0,6 % агара, предварительно расплавленной и охлажденной до 45 °C. Смесь равномерно распределяли по поверхности агаризованной среды, предварительно разлитой по  $20\pm 5$  мл в чашки Петри и подсушенной. После застывания верхнего слоя на приготовленные газоны наносили 0,1 мл подготовленного образца продукции. Посевы инкубировали в термостате при оптимальной температуре для роста индикаторной культуры в течение  $16\pm 2$  ч. О наличии бактериофагов в образцах продукции судили по наличию прозрачной зоны лизиса или отдельных негативных колоний.

*Определение литической активности бактериофагосодержащих образцов продукции.* Индикаторную культуру выращивали в жидкой

оптимальной среде при оптимальной температуре в течение  $16\pm 2$  ч, после чего 0,3 мл выросшей культуры смешивали с 5 мл той же среды, содержащей 0,6 % агара, предварительно расплавленной и охлажденной до  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Смесь равномерно распределяли по поверхности агаризованной среды, предварительно разлитой по  $20\pm 5$  мл в чашки Петри и подсушенной. После застывания верхнего слоя на приготовленные газоны с помощью репликатора наносили подготовленные фагосодержащие образцы продукции. Посевы инкубировали в термостате при оптимальной для роста индикаторной культуры температуре в течение  $16\pm 2$  ч. О фагочувствительности исследуемой индикаторной культуры судили по наличию прозрачной зоны лизиса.

*Определение содержания бактериофагов в образцах продукции.* Готовили десятичные разведения подготовленной фагосодержащей пробы продукции. Индикаторную культуру выращивали в жидкой оптимальной среде при оптимальной температуре в течение  $16\pm 2$  ч, после чего 0,3 мл выросшей культуры смешивали с 5 мл той же среды, содержащей 0,6 % агара, предварительно расплавленной и охлажденной до  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , и 1 мл подготовленного фагосодержащего образца из соответствующего десятичного разведения. Смесь равномерно распределяли по поверхности агаризованной среды, предварительно разлитой по  $20\pm 5$  мл в чашки Петри и подсушенной. После застывания верхнего слоя посевы инкубировали в термостате при оптимальной для роста индикаторной культуры температуре в течение  $16\pm 2$  ч. Учитывали количество негативных колоний. Определение количества фагов проводили путем умножения числа негативных колоний на соответствующее разведение. Для проб «твердых» образцов учитывали предварительное разведение образца.

**Результаты и их обсуждение.** Для изготовления ферментированных молочных продуктов используют бактериальные концентраты и закваски, в состав которых входят молочнокислые микроорганизмы, относящиеся к разным родам и видам, поэтому в них могут развиваться различные группы бактериофагов. Для выявления фагов молочнокислых микроорганизмов проанализировали состав микрофлоры бактериальных концентратов, выпускаемых различными производителями (табл. 1).

Таблица 1 – Заквасочные культуры, которые могут быть выявлены в образцах молочной продукции

Наименование молочной продукции	Молочнокислые микроорганизмы								
	<i>Lc. lactis</i>	<i>Str. thermophilus</i>	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. bulgaricus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. lactis</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>
Сыр	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Рассол	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Сыворотка подсырная	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Творог	+	+	–	–	–	–	–	–	–
Сыворотка творожная	+	+	–	–	–	–	–	–	–
Сметана	+	+	–	–	–	–	–	–	–
Ряженка	–	+	–	–	–	–	–	–	–
Йогурт	–	+	–	+	–	–	–	+	–

Как видно из таблицы 1, для изготовления сыров могут использоваться культуры видов *Lactococcus lactis*, *Str. thermophilus*, *Lb. lactis*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, которые также можно выявить в подсырной сыворотке и рассолах из соляных бассейнов. Для изготовления сметаны, сметанного продукта и творога могут применяться культуры видов *Lc. lactis* и *Str. thermophilus*. Соответственно, данные молочнокислые микроорганизмы обнаруживаются и в творожной сыворотке. Для изготовления йогурта применяются культуры видов *Str. thermophilus*, *Lb. lactis*, *Lb. bulgaricus*. При производстве ряженки используются культуры *Str. thermophilus*. В сыром молоке и образцах воздуха может присутствовать широкий спектр мезофильных и термофильных молочнокислых микроорганизмов, что делает их удобными объектами исследования для обнаружения бактериофагов.

Для анализа наличия бактериофагов молочнокислых бактерий отобран 191 образец молочной продукции, изготовленной на молокоперерабатывающих предприятиях Республики Беларусь (творог, сметана, сыр, ряженка, йогурт), и отходов молочного производства (сыворотка творожная и подсырная, рассол из соляных бассейнов и др.) (табл. 2).

Таблица 2 – Характеристика образцов молочной продукции и отходов молочного производства, отобранных для исследования

Наименование образца	Количество отобранных образцов
Сметана, сметанные продукты	39
Творог, творожные продукты	37
Сыр	45
Рассол соляных бассейнов	3
Сыворотка подсырная	8
Сыворотка творожная	10
Йогурт, йогуртные продукты	22
Ряженка, простокваша	4
Пастеризованное молочное сырье	7
Сырое молоко	4
Производственная закваска	3
Воздух в производственных помещениях	8
Лужа на полу производственного помещения	1

Для выявления бактериофагов в образцах молочной продукции использовали подготовленные пробы, очищенные от белка и бактериальных клеток. Установлено, что 94 образца продукции содержали бактериофаги лактококков. Бактериофаги лактобацилл и термофильных стрептококков в исследованных образцах на используемых в качестве индикаторных культурах не обнаружены (табл. 3, рис. 1)

Как видно из таблицы 3, рисунка 1, зимой наибольшее количество фагосодержащих образцов отобрано на предприятиях Минской (69,2 %) и Гродненской (64,3 %) областей. Среди весенних образцов бактериофаги преобладали в образцах продукции, изготовленной на предприятиях Гомельской (100 %), Минской (84,6 %) и Гродненской (71,4 %) областей. Наибольшее количество фагосодержащих образцов летнего периода изготовлено на предприятиях Гродненской (70 %) и Гомельской (62,5 %) областей.

Таблица 3 – Характеристика фагосодержащих образцов молочной продукции и отходов молочного производства

Регион отбора	Количество образцов, изготовленных и отобранных в течение:									
	зимы		весны		лета		осени		года	
	Всего	Фагосодержащих	Всего	Фагосодержащих	Всего	Фагосодержащих	Всего	Фагосодержащих	Всего	Фагосодержащих
Брестская обл.	5	1	12	7	7	4	12	8	36	20
Витебская обл.	5	2	11	4	5	2	7	4	28	12
Гомельская обл.	2	0	2	2	8	5	1	0	13	7
Гродненская обл.	14	9	7	5	10	7	8	2	39	23
Минская обл.	13	9	13	11	15	8	24	15	65	43
Могилевская обл.	1	0	1	0	5	1	3	2	10	3
<b>Итого:</b>	<b>40</b>	<b>21</b>	<b>46</b>	<b>29</b>	<b>50</b>	<b>27</b>	<b>55</b>	<b>31</b>	<b>191</b>	<b>108</b>

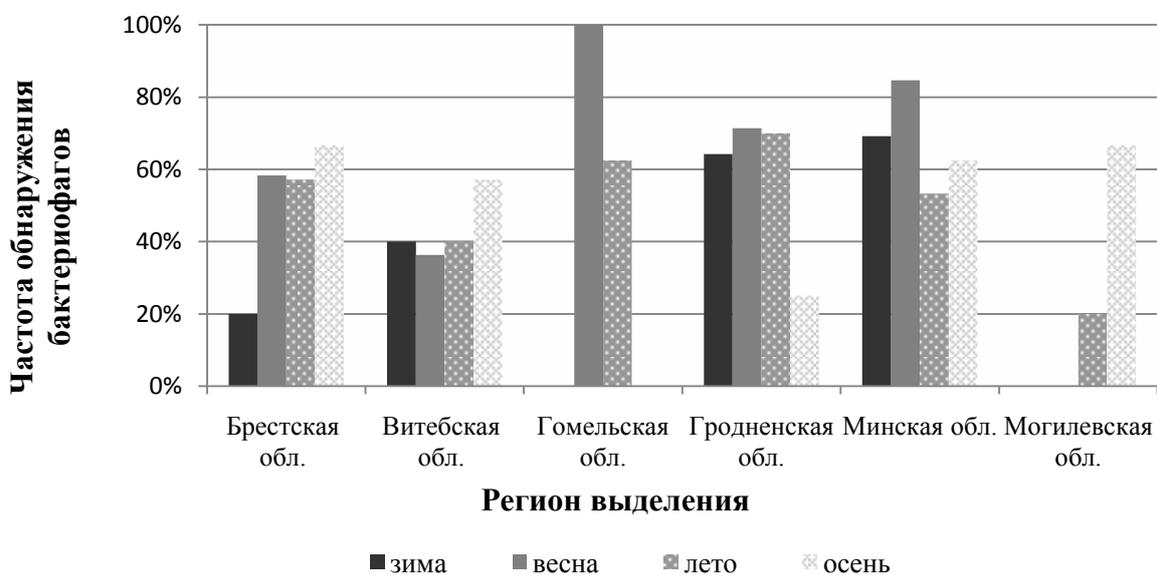


Рисунок 1 – Содержание бактериофагов в образцах молочной продукции и отходах молочного производства

Образцы продукции осеннего производства содержали бактериофаги в 66,7 % случаев для Брестской и Могилевской областей и в 62,5 % случаев для Минской области. Таким образом, наибольшее число случаев обсемененности молочной продукции и отходов молочного производства бактериофагами наблюдается для образцов, отобранных с предприятий Минской и Гродненской областей (табл. 3, рис. 1).

При анализе частоты выявления бактериофагосодержащей продукции в зависимости от времени года, установлено, что чаще всего фаги обнаруживали в образцах продукции, изготовленной в весенний период года (63 % случаев). В остальные периоды года частота обнаружения вирусных частиц составила 52,5 %, 54 % и 56,4 %, соответственно, в зимний, летний и осенний периоды.

Проведен анализ бактериофагосодержащей молочной продукции по воздействию на индикаторные культуры, используемые для выявления бактериофагов (рис. 2).

Как видно из рисунка 2, основная часть образцов молочной продукции вне зависимости от времени отбора образца содержала лактофаги с низким спектром литической активности – образцы лизировали от 1 до 5 индикаторных культур.

Во всех фагосодержащих образцах проводили количественное определение фаговых частиц. Большая часть производимых молочных продуктов на территории нашей страны представлена творогом и творожными продуктами, сметаной и сырами. В связи с этим, большой интерес представляет собой анализ содержания вирусных частиц в указанных продуктах, а также выделение бактериофагов, лизирующих молочнокислые бактерии, входящих в состав бактериальных концентратов и заквасок для выработки данных групп продуктов (рис. 3-5).

Как видно на рисунке 3, в зимний период года в образцах сметаны и сметанных продуктов лактофаги обнаружены в небольшом количестве – от  $1 \times 10^2$  до  $3 \times 10^2$  БОЕ/г для четырех образцов. В одном образце на используемых индикаторных культурах бактериофаги не обнаружены. В образцах продукции, произведенных в весеннее время, содержание бактериофагов составило от  $1,15 \times 10^1$  до  $3,1 \times 10^2$  БОЕ/г для 6 образцов; в двух образцах бактериофаги отсутствовали. В 10 образцах сметаны и сметанных продуктов, изготовленных в летний период года, бактериофаги не обнаружены, в пяти фагосодержащих образцах количество вирусных частиц варьировало от  $6,75 \times 10^0$  –  $2,98 \times 10^3$  БОЕ/г.

В четырех образцах сметаны, изготовленных осенью, не удалось выявить бактериофаги, в семи фагосодержащих образцах количество вирусных частиц составило от  $6 \times 10^0$  до  $3,1 \times 10^3$  БОЕ/г.

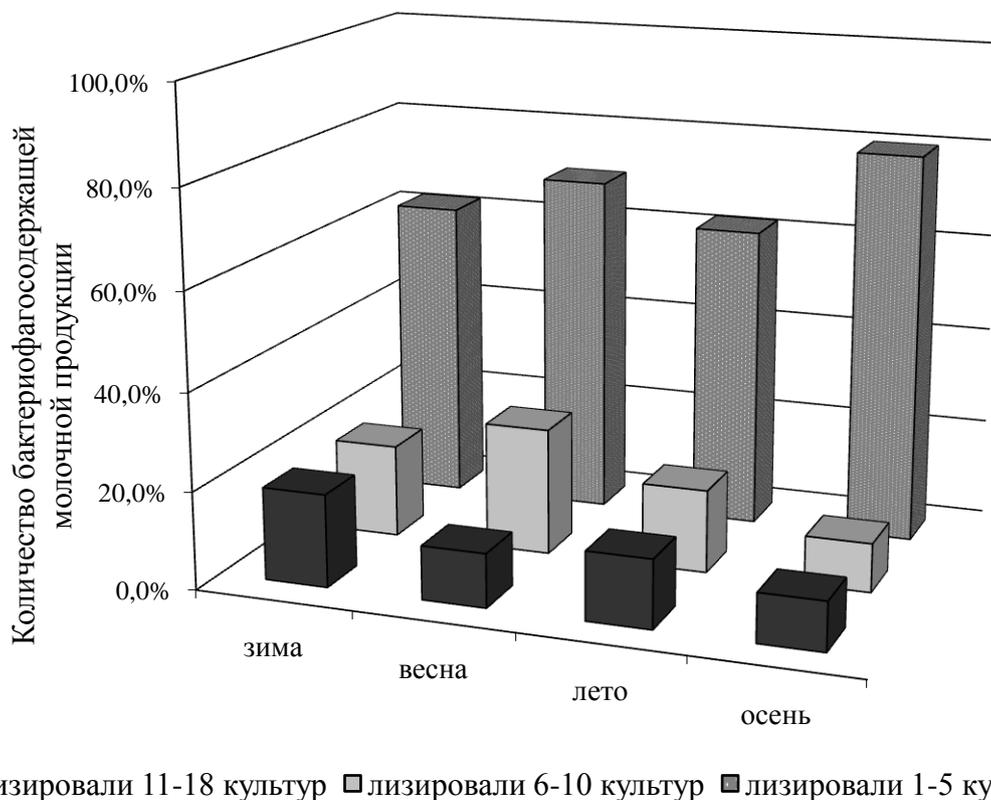


Рисунок 2 – Анализ литической активности бактериофагосодержащей молочной продукции в зависимости от времени отбора образца

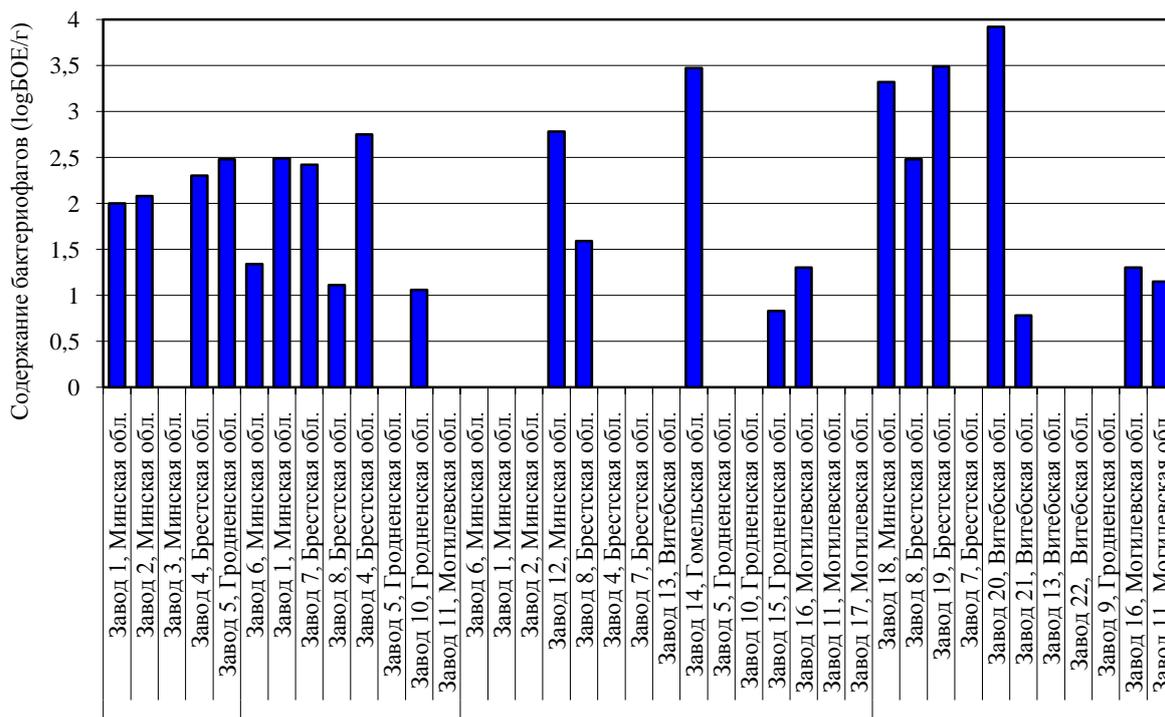


Рисунок 3 – Содержание бактериофагов в образцах сметаны и сметанных продуктов

Таким образом, содержание лактофагов в сметане и сметанных продуктах в течении года не превышало  $3,1 \times 10^3$  БОЕ/г. Количество фагосодержащих образцов сметаны и сметанных продуктов, отобранных в зимний период, составило 80 %, в весенний – 75 %, в летний – 33,3 %, в осенний – 63,6 %.

Как видно на рисунке 4, 50 % образцов творога и творожных продуктов, изготовленных в зимний период, содержали бактериофаги. Количество вирусных частиц в них составило от  $1,2 \times 10^3$  до  $5,2 \times 10^6$  БОЕ/г. В весенних образцах творога содержание лактофагов колебалось в диапазоне от  $7,75 \times 10^1$  до  $9,4 \times 10^6$  БОЕ/г; в летних – от  $3,4 \times 10^1$  до  $4,34 \times 10^4$  БОЕ/г, причем в 33 % летней продукции бактериофагов не выявлено. В осенних образцах творога содержалось от  $8 \times 10^0$  до  $6,14 \times 10^3$  вирусных частиц.

Таким образом, содержание вирусных частиц в образцах творога и творожных продуктов на протяжении года варьируется в широком диапазоне. Количество фагосодержащих образцов сыров, отобранных в зимний период, составило 50 %, в весенний – 88,8 %, в летний – 58,3 %, в осенний – 72,7 %.

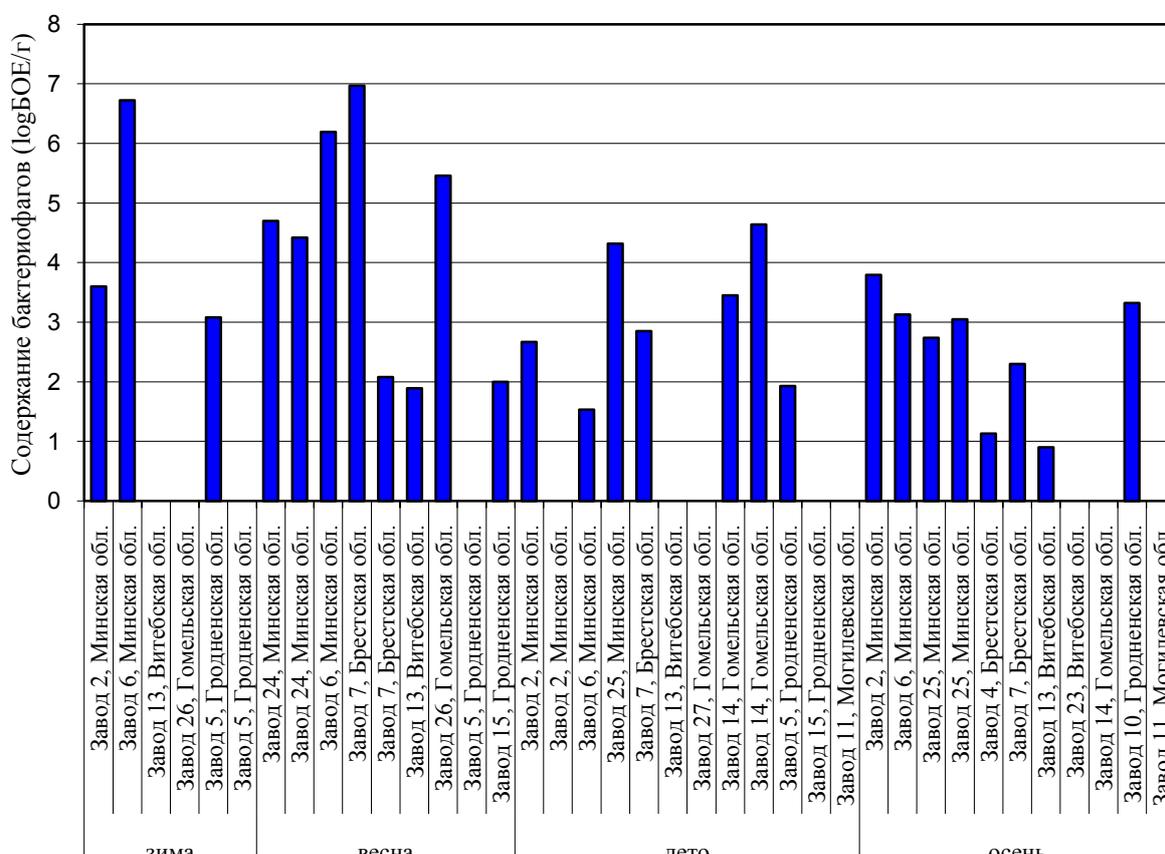


Рисунок 4 – Содержание бактериофагов в образцах творога и творожных продуктов

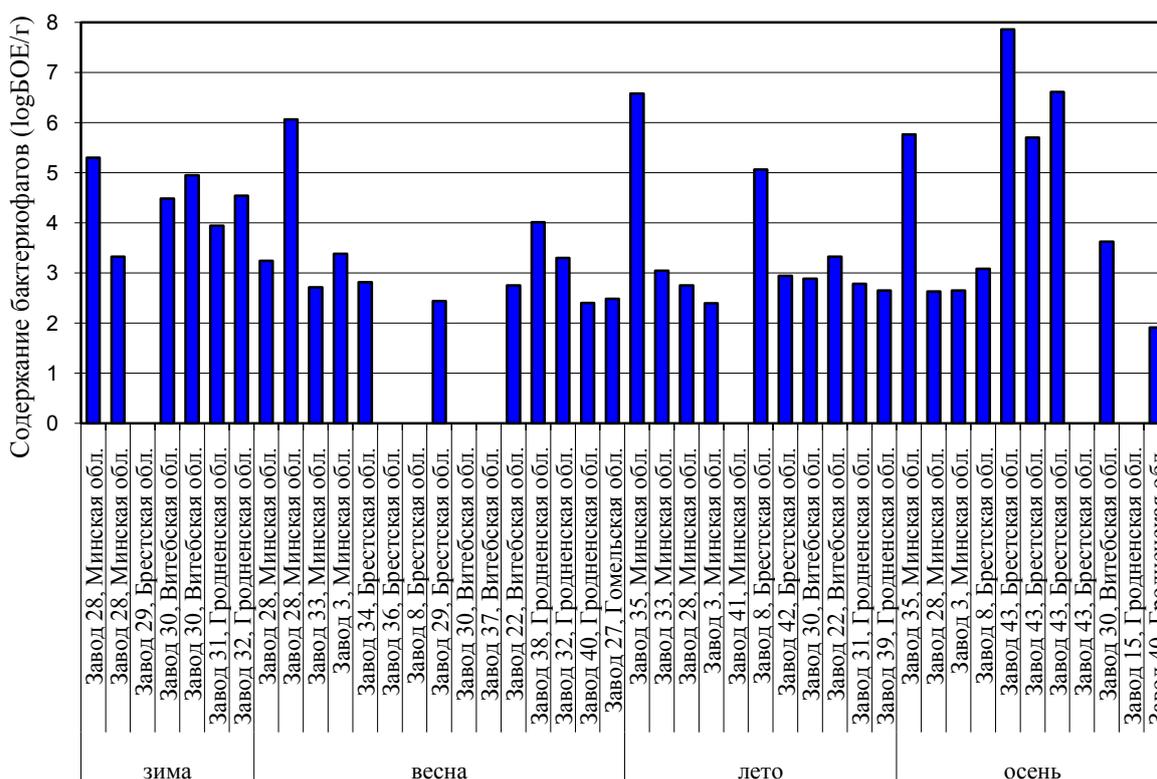


Рисунок 5 – Содержание бактериофагов в образцах сыра

Как видно на рисунке 5, в 17,8 % образцах сыра, отобранных на протяжении 2012 года, на используемых индикаторных культурах не выявлены бактериофаги, в остальных образцах их количество, также как и в образцах творога и творожных продуктов, колебалось в широком диапазоне: от  $2,1 \times 10^3$  до  $2 \times 10^5$  БОЕ/г в зимних образцах, от  $2,5 \times 10^2$  до  $1,14 \times 10^6$  БОЕ/г в весенних образцах, от  $2,48 \times 10^2$  до  $3,78 \times 10^6$  БОЕ/г в летних образцах, от  $8,15 \times 10^1$  до  $7,2 \times 10^7$  БОЕ/г в осенних образцах.

Таким образом, 82,2 % образцов сыра содержали бактериофаги лактококков. Количество фагосодержащих образцов сыров, отобранных в зимний период, составило 85,7 %, в весенний – 71,5 %, в летний – 90,9 %, в осенний – 81,8 %.

**Заключение.** Проведен отбор образцов молочной продукции, изготовленных на молокоперерабатывающих предприятиях страны в течении 2012 года. Отобрано 169 образцов молочной продукции (сметана и сметанный продукт, творог, сыр, ряженка, йогурт и йогуртный продукт, молоко сырое), а также образцы сыворотки творожной и подсырной, рассолов из соляных бассейнов, образцы лужи с пола цеха, пробы воздуха и т.п. Установлено, что 94 образца продукции содержали бактериофаги лактококков. Бактериофаги лактобацилл и термофильных стрептококков в исследованных образцах

на используемых в качестве индикаторных культурах не обнаружены. По результатам анализа воздействия бактериофагосодержащей молочной продукции на индикаторные культуры установлено, что большая часть образцов выделенных в различные периоды года (62 % зимой и летом, 70 % - весной, 80 % осенью) содержала вирусы, лизирующие от 1 до 5 индикаторных культур.

Установлено, что наибольшая частота обнаружения бактериофагов в образцах молочной продукции и отходов молочного производства с предприятий Минской (69,2 %, 84,6 %, 53,3 % и 62,5 % соответственно, для зимы, весны, лета и осени) и Гродненской (64,3 %, 71,4 %, 70 % и 25 % соответственно, для зимы, весны, лета и осени) областей.

Среди исследованных 39 образцов сметаны и сметанных продуктов 56,4 % содержали бактериофаги лактококков, количество которых не превышало  $3,1 \times 10^3$  БОЕ/г. Количество фагосодержащих образцов сметаны и сметанных продуктов, отобранных в зимний период, составило 80 %, в весенний – 75 %, в летний – 33,3 %, в осенний – 63,6 %.

Среди исследованных 37 образцов творога и творожных продуктов 67,5 % содержали бактериофаги лактококков, количественное содержание которых на протяжении года варьировалось в широком диапазоне. Количество фагосодержащих образцов сыров, отобранных в зимний период, составило 50 %, в весенний – 88,8 %, в летний – 58,3 %, в осенний – 72,7 %.

Среди исследованных 45 образцов сыра 82,2 % содержали бактериофаги лактококков. Количество фагосодержащих образцов сыров, отобранных в зимний период, составило 85,7 %, в весенний – 71,5 %, в летний – 90,9 %, в осенний – 81,8 %.

## Литература

1. Teuber, M. The Genus *Lactococcus*. / M. Teuber, A. Geis // In: *The Prokaryotes*. – Dworkin M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.-H.; Stackebrandt, E. (Eds.), 3d ed., Springer-Verlag, New York, NY. – 2006. – P. 205–224.
2. Квасников, Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко // М.: Наука, 1975. – 389 с.
3. Аркадьева, З.А. Промышленная микробиология: учеб. Пособие для вузов по спец. «Микробиология» и «Биология» / З.А. Аркадьева,

А.М. Безбородов, И.Н. Блохина и др.; под ред. Н.С. Егорова. – М.:Высш.шк.,1989.– 688 с.

4. Гудков, А.В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты / Под ред. С.А. Гудкова. – М.: ДеЛи принт, 2003. – 800 с.

5. Фурик, Н.Н. Коллекция бактериофагов и индикаторных культур молочнокислых бактерий / Н.Н. Фурик, Л.В. Сафроненко., Н.В. Дудко, Е.М. Сафроненко // Наука и инновации. – 2008. – №1. – С.32-34.

6. Daly C, Fitzgerald G F, Davis R. Biotechnology of lactic acid bacteris with special reference to bacteriophage resistance. *Antonie Leeuwenhoek*. 1996;70:99–110

7. De Man, J.C. A medium for the cultivation of lactobacilli / J.C. De Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe // *J. Appl. Bacteriol.* – 1960. – Vol. 23. – P. 130-135.

8. ГОСТ 10444.11-89. Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых бактерий. Дата введения 01.01.1991 г. п.3.3.1

*A.N. Kazak, S.L. Vasylenko, N.N. Furik*

## **INVESTIGATION OF BACTERIOPHAGE PREVALENCE IN FERMENTED MILK PRODUCTS**

### **Summary**

169 samples of milk products (sour-cream, sour-cream product, cheese, curd, ryazhenka, yogurt, yogurt product, fresh milk), whey, salt brine, puddle from floor, etc. were selected. The qualitative and quantitative content of viral particles in selected samples are determined. Lytic activity of bacteriophages containing samples on the indicator strains was investigated.