

А. П. Райский, аспирант; Н. А. Белясова, доцент; Е. П. Малечко, студентка

РАСПРОСТРАНЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ ЛАКТОКОККОВ В МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ, ПРОИЗВЕДЕННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

130 samples of different sour-milk products have been analysed and 14 phages lines have been revealed and cleared, spectrum of lytic action and morphological features have been defined. 7 sensitive for lactic phages bacterial cultures *Lactococcus lactis* have been isolated.

В основе производства ферментированных молочных продуктов лежат микробиологические процессы, определяющие качество продукции, ее пищевую ценность и безопасность для здоровья потребителя. Нередко на молочных предприятиях наблюдаются случаи снижения активности ферментационных процессов в результате поражения заквасочной микробиоты бактериофагами.

Инфекция бактериофагами заквасочных бактерий является постоянной проблемой при производстве молочнокислых продуктов. Специфическими признаками данной проблемы являются: удлинение графиков производства, прерывание процесса ферментации на любой из стадий, существенные экономические потери. С тех пор как бактериофаги лактококков были идентифицированы в качестве главной причины неудачных процессов сквашивания молока [2], большие усилия были направлены на получение устойчивых к бактериофагам заквасочных штаммов [3]. Наиболее простым решением данной проблемы является выделение спонтанных фагоустойчивых мутантов молочнокислых бактерий, которые могут быть получены в процессе инфицирования бактериальной популяции определенным фагом в высоком титре [4]. Однако эти мутанты характеризуются довольно узким спектром устойчивости, что служит очевидным недостатком данного метода.

При производстве кисломолочных продуктов могут использоваться однокомпонентные и многокомпонентные заквасочные культуры. Проще получить однокомпонентные фагоустойчивые закваски, проверив их на отношение к бактериофагам, выделенным на данном предприятии. Однако применение таких заквасок возможно только при высокой санитарно-гигиенической культуре на производстве. Необходимо также постоянное изучение фагового фона каждого предприятия, на котором планируется использовать заквасочные бактерии, регулярная работа по выделению бактериофагов, чья изменчивость характеризуется высокой скоростью [5].

В нашей стране при производстве кисломолочных продуктов традиционно используются многоштаммовые закваски. В состав таких заквасок обычно вводят несколько ге-

нетически различающихся штаммов молочнокислых кокков, которые, как правило, не могут подвергаться фаголизису одновременно. Однако для получения высокого качества требуется нормальное развитие всех компонентов используемой закваски. Следовательно, и в состав заквасочного консорциума целесообразно включать штаммы, отобранные по результатам теста на фагоустойчивость.

Это тем более важно, что в смешанной культуре могут оказаться лизогенные бактерии и чувствительные к их умеренному фагу клетки. В таком случае фаголизис практически неизбежен [6].

В задачи данного исследования входило выделение из разных кисломолочных продуктов, производимых на предприятиях Республики Беларусь, вирулентных бактериофагов, которые могли бы составить коллекцию, пригодную, с одной стороны, для отбора фагоустойчивых штаммов лактококков, а с другой – для анализа нуклеиновых кислот этих фагов и создания методов их генотипирования.

Трудность выявления вирулентных фагов бактерий из окружающей среды состоит в том, что обнаружить их присутствие можно только при наличии чувствительных к ним бактерий, поскольку между фагами и бактериями существует достаточно высокая степень специфичности [5].

Поэтому в первой серии экспериментов по выделению фагов из проб кисломолочных продуктов кроме коллекционных штаммов лактококков использовали бактериальные культуры, которые выделяли из продуктов, служащих источниками фагов.

Всего в работе использовано 15 коллекционных штаммов *L. lactis* и 20 штаммов грамположительных молочнокислых кокков, выделенных из проб кисломолочных продуктов.

В ходе исследования проанализировано 130 образцов кисломолочных продуктов, произведенных в разных регионах Республики Беларусь, из которых выделили и расчистили 14 линий фагов и выявили для них чувствительные культуры бактерий *L. lactis*. Результаты представлены в табл. 1.

**Распространение бактериофагов лактококков в молочных продуктах,
произведенных в Республике Беларусь**

Источник выделения		Предприятие-изготовитель	Доля проб, контаминированных фагами, %	Число выделенных фаговых штаммов
Сыр	«Голландский»	ГМЗ г. Копыль	20	3
	«Российский»	ГМЗ г. Ружаны	60	
	«Голландский»	ГМЗ г. Барановичи	0	
	«Десертный»	ГМЗ № 3 г. Минск	0	
	«Российский»	ГМЗ г. Пинск	20	
Творог	«Нежирный»	ГМЗ № 3 г. Минск	20	5
	«Крестьянский»	ГМЗ г. Новогрудок	40	
	«Нежирный»	ГМЗ г. Новогрудок	50	
	«Любительский»	ГМЗ г. Лунинец	40	
	«Диетический»	ГМЗ г. Копыль	0	
	«Крестьянский»	ГМЗ г. Пинск	0	
	Самоквасный	Крестьянское хозяйство в Пинском районе	20	
Кефир	«Любительский»	ГМЗ г. Новогрудок	50	2
	«Троицкий»	ГМЗ № 3 г. Минск	10	
	«С лактулозой»	ГМЗ № 3 г. Минск	0	
	«Любительский»	ГМЗ г. Лида	0	
		ГМЗ № 2 г. Минск	0	
		ГМЗ г. Пинск	0	
Глазированные сырки		ГМЗ № 1 г. Минск	0	1
		ГМЗ № 3 г. Минск	0	
		ГМЗ г. Береза	20	
Сметана	«Традиционная»	ГМЗ г. Глубокое	0	3
	«Свислочь»	ГМЗ г. Новогрудок	40	
	«Берестье»	ГМЗ г. Лида	25	
		ГМЗ г. Копыль	0	
		ГМЗ № 3 г. Минск	0	
		ГМЗ г. Брест	0	
Йогурт		ГМЗ № 1 г. Минск	0	0
		ГМЗ г. Волковыск	0	
		ГМЗ № 3 г. Минск	0	
Ряженка		ГМЗ № 2 г. Минск	0	0
Масло	«Крестьянское»	ГМЗ г. Глубокое	0	0
	«Крестьянское»	ГМЗ г. Новогрудок	0	
Напиток «Берестье»		ГМЗ г. Брест	0	0
Молоко	«Вкусное»	ГМЗ г. Копыль	0	0
	«Домашнее»	ГМЗ г. Лида	0	
	«Домашнее»	ГМЗ г. Новогрудок	0	
		ГМЗ № 3 г. Минск	0	
		ГМЗ г. Пинск	0	
		Крестьянское хозяйство в Пинском районе	0	

Культивирование лактококков осуществляли на пептонно-дрожжевой среде М17 с глюкозой (0,5%) в качестве источника углерода. Наличие фагов в оттопленной сыворотке определяли полосованием на газонах

тест-культур, титр лизатов – методом двойных агаровых слоев [7].

Приведенные в табл. 1 данные дают возможность обнаружить группу кисломолочных продуктов, в наибольшей степени контамини-

рованных бактериофагами (твердые сыры, творог и творожные сырки, кефир, сметана).

Анализ распространения лактофагов на предприятиях Республики Беларусь позволяет заключить, что чаще других они встречаются в продуктах гормолзаводов г. Новогрудка и г. Лунинца. Количество бактериофагов в исследуемых образцах достигало 10^2-10^8 БОЕ/мл. При этом обнаружено несколько морфологических типов фагов, различающихся особенностями негативных колоний. Представителей каждого морфологического типа отбирали, подвергали процедуре «расчистки», получали лизаты с высоким титром и исследовали спектр литического действия (табл. 2).

Анализ результатов, приведенных в табл. 2, показывает, что выделенные фаги различаются по морфологии негативных колоний, что свидетельствует о большом их разнообразии.

Таблица 2
Характеристика выделенных бактериофагов лактококков

Фаг	Морфология негативных колоний		Спектр литического действия
	Диаметр, мм	Дополнительные характеристики	
E1	3,30±0,19	Прозрачные, ровный край	411
E2	0,49±0,08	Прозрачные, ровный край	411, 415, 502
E3	1,48±0,11	Прозрачные, размытый край	411, 502
E4	1,8±0,06	Прозрачные, размытый край	415
E5	0,32±0,07	Слабомутные, размытый край	411
E6	1,02±0,04	Слабомутные, ровный край	411, 502
E7	2,39±0,23	Прозрачные, ровный край	411
E8	0,90±0,04	Прозрачные, ровный край	502
E9	1,20±0,05	Прозрачные, размытый край	411, 510
E10	1,95±0,10	Прозрачные, ровный край	415, 505
E11	0,35±0,12	Прозрачные, ровный край	510
E12	1,30±0,07	Прозрачные, ровный край	411, 510

Окончание табл. 2

Фаг	Морфология негативных колоний		Спектр литического действия
	Диаметр, мм	Дополнительные характеристики	
E13	1,59±0,06	Прозрачные, ровный край	413
E14	1,01±0,17	Прозрачные, ровный край	411, 503

Эти типовые фаги можно использовать для проверки свойств отбираемых заквасочных штаммов, чтобы исключить попадание в производство штаммов бактерий, чувствительных к циркулирующим на этих производствах фагам. Такая проверка является обязательной и регламентирована соответствующими документами для каждого заквасочного штамма, запускаемого в производство кисломолочных продуктов.

Для получения безопасной для потребителя высококачественной продукции в молочной промышленности необходимо постоянно проводить фаговый мониторинг предприятия и применять меры борьбы с бактериофагом.

Литература

1. Перфильев Г. Д., Суслов Н. В. Бактериальные закваски, препараты и концентраты. – Углич; М.: Агропромиздат, 1995. – 100 с.
2. Allison G. E., Klaenhammer T. R.. Phage resistance mechanisms in lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 1998, 8: 207–226
3. Книга М. И., Змиев В. В. Технология молока и молочных продуктов. – М.: Пищевая промышленность, 1980. – 60 с.
4. Банникова Л. А., Королева Н. С. Микробиологические основы молочного производства. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.
5. Chopin A., Bolotin A., Sorokin A., Ehrlich S. D., Chopin M. C. Analysis of six prophages in *Lactococcus lactis* IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations. *Nucleic Acids Res.*, 2001, 29, 644–651.
6. Jarvis A. W., Fitzgerald G. F., Mata M., Mercenier A., Neve H., Powell I. A., Ronda C., Saxelin M. and Teuber M. (1991) Species and type phages of lactococcal bacteriophages. *Intervirology*, 32, 2–9, 1986. – 276 p.
7. Lillehaug D.: An improved plaque assay for poor plaque producing temperate lactococcal bacteriophages. *J. Appl. Microbiol.*, 1997; 83: p. 85–90.