

## Diversity of phage associations homologous to lactic acid bacteria

N.I. Odegov<sup>1</sup>, R.V. Dorofeev<sup>1</sup>, A.N. Irkitova<sup>2\*</sup>, I.A. Funk<sup>1</sup>, T.N. Orlova<sup>1</sup>, A.V. Matsyura<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budget Scientific Institution Altai Research Institute of Agriculture

<sup>2</sup> Altai State University

ul. Lenina 61, Barnaul, Russia

E-mail: [Elen171987@mail.ru](mailto:Elen171987@mail.ru)

Submitted: 28.10.2017. Accepted: 13.12.2017

Information on the ecology of the "phage-bacterial host" system is given. The interaction of cultures of lactococci from the collection of the Siberian Research Institute of Cheese with associations of phages was investigated. Infection of sensitive cells with bacteriophage led to cell lysis, which was manifested by negative colonies on the lawn of a lactococcal culture. Characteristics of the biological properties of bacteriophages in the composition of phage associations are given (lytic activity, spectrum of lytic activity, specificity of action). Differentiation of species lysotypes of bacteriophages of mesophilic lactococci, selected at a single cheese enterprise in the Altai Territory was noted. The index of the lytic activity of the investigated phage associations ranged from 0.19 (sample of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar *diacetylactis*) to 0.24 (sample of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*) from studied strains. The value of the lytotype updated coefficient for the entire array of data varied from 0.25 to 1.00. It is concluded that the specificity of cheese biotechnology together with the evolutionary and genetic determinants of the microworld predetermine a constant high risk of cell phagolysis of starter cultures. Experimental studies confirmed the need to consider the phagocyte of lactic acid bacteria in biotechnology.

**Key words:** bacteriophages; lactococci; lactic acid bacteria; the index of lytic activity; coefficient of lysotype renewal; *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*; *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

---

## Изучение разнообразия ассоциаций фагов гомологичных молочнокислым бактериям

Н.И. Одегов<sup>1</sup>, Р.В. Дорофеев<sup>1</sup>, А.Н. Иркитова<sup>2\*</sup>, И.А. Функ<sup>1</sup>, Т.Н. Орлова<sup>1</sup>, А.В.Мацюра<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Алтайский научно-исследовательский институт сельского хозяйства

<sup>2</sup> Алтайский государственный университет

ул. Ленина 61, Барнаул, Россия

E-mail: [Elen171987@mail.ru](mailto:Elen171987@mail.ru)

Приведены сведения по экологии системы «фаг-бактериальный хозяин». Исследовано взаимодействия культур лактококков из коллекции Сибирского НИИ сыроделия с ассоциациями фагов. Инфицирование чувствительных клеток бактериофагом приводило к лизису клеток, проявившееся негативными колониями на газоне культуры лактококка. Дана характеристика биологических свойств бактериофагов в составе фаговых ассоциаций (литическая активность, спектр литической активности, специфичность действия). Отмечена дифференциация видовых лизотипов бактериофагов мезофильных лактококков, отобранных на одном сыродельном предприятии в Алтайском крае. Индекс литической активности исследуемых фаговых ассоциаций находится в пределах от 0,19 (выборка *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*) до 0,24 (выборка *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) из числа исследуемых штаммов. Величина коэффициента обновления лизотипа для всего полученного массива данных варьировала в диапазоне от

0,25 до 1,00. Сделан вывод, что специфика биотехнологии сыроделия и эволюционно-генетические детерминанты микромира определяют постоянную высокую опасность фаголизиса клеток заквасочных культур. Экспериментальные исследования подтверждают необходимость учитывать в биотехнологиях фаготип молочнокислых бактерий.

**Ключевые слова:** бактериофаги; лактококки; молочнокислые бактерии; индекс литической активности; коэффициент обновления лизотипа; *Lactococcus lactis subsp. Lactis*; *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*; *Lactococcus lactis subsp. cremoris*

## Введение

В окружающей человека естественной среде повсеместно распространены микроорганизмы различной таксономии, активно используемые человеком различных биотехнологиях.

Количество и штаммовое разнообразие микрофлоры, в частности, молочнокислых бактерий, определяет интенсивность ферментационных процессов при энзиматическом превращении основных компонентов молока – оптимального субстрата для процессов их жизнедеятельности. Высокий уровень молочнокислого процесса предупреждает появление в молоке посторонних, в том числе патогенных микроорганизмов, оказывает влияние на популяционные параметры микробиоценоза (уровень численности молочнокислых и других микроорганизмов, симбиотические, антагонистические взаимоотношения между ними и пр.).

Однако зачастую отмечается снижение скорости молочнокислого брожения. Многочисленные исследования показали, что в 80–90% таких случаев причиной этого являлись бактериофаги (Gibshman, 1948; 1955; Nepomnyashchaya et al., 1961; Lawrence, Gilles, 1973; Гудков, 1976; Brussow, 2001; McGrath, Fitzgerald, 2004; Sanlibaba, Akcelic, 2005; Moineau, 2005; Szczepanska, 2007; Marcy, Moineau, 2012; Sorokina, 2013; 2014). Поэтому при отборе заквасочных штаммов для использования в биотехнологиях необходимо учитывать признак фагоустойчивости (Ganina et al., 1991; Dworkin, 2006). Основой многих заквасочных композиций являются лактококки (*Lc. lactis*), которые в виде популяции микроорганизмов представляют собой особую экологическую нишу для воспроизводства и эволюции бактериофагов специфичным (гомологичным) лактококкам (Rayskiy et al., 2009). При значительном разнообразии фагов и бактерий – диапазон хозяев фага довольно узок (Sarga, 2006).

Бактериофаги по своему строению находятся на самой низкой ступени эволюции жизни на Земле. Соответственно, это как бы еще не «жизнь», а «программа», потенциал жизни. Образно говоря, это летающие и плавающие «шприцы» или «дискеты» с записанной программой, реализующейся лишь внутри бактериальной клетки. И таким образом, фаги являются не пассивным «грузом» бактерии, а принимают активное участие в метаболизме не только отдельной микробной клетки, но и бактериальной популяции в целом (Kushkina, Tovkach, 2011). А рассмотрение бактериофагов как стандартизированных носителей генетической информации предоставляет возможность их направленного использования (Lakhtin, 2008; Azeredo, Sutherland, 2008).

Цикл развития системы фаг-бактериальный хозяин состоит из четырех этапов: адсорбции бактериофага на поверхности бактериальной клетки; инвазии фага в клетку; размножения его внутри клетки хозяина и лизиса инфицированной клетки с выделением сформировавшихся фагочастиц (Adams, 1961; Cleary, 1977; Sturino, Klaenhammer, 2004). Отрезок времени между окончанием адсорбции фага и лизисом клетки – латентный период развития бактериофага, продолжительность которого и выход фагочастиц для различных систем фаг-бактериальный хозяин колеблется в значительных пределах. По ряду данных для фагов мезофильных лактококков эти величины равняются 25–150 минутам и 40–300 фагочастицам, соответственно (Dokukin et al., 1979; Saxelin et al., 1979; Mozzi et al., 2010). Бактериофаги могут осуществлять как литический, так и лизогенный циклы развития: в первом случае фаг называется вирулентным, во втором – умеренным (Kushkina, Tovkach, 2011; Garneau, Moineau, 2011).

Исследования отечественных и зарубежных авторов свидетельствуют, что штаммы молочнокислых бактерий имеют различную степень фагочувствительности. Установлено, что популяции бактериофагов на молокоперерабатывающих предприятиях находятся в постоянном динамическом состоянии, детерминируемом микробиоценозом предприятия (Karlikanova, Krapivina, 1975). Значительную долю (от 65 до 82%) среди них составляют фагочувствительные культуры: при этом набор фагов, лизирующих какой-либо штамм, изменяется от штамма к штамму (Madera, Garcia, 2003; Deveau, 2006; Naumenko, 2015). Поэтому необходимо учитывать фаготип бактериальных штаммов при подборе последних в состав заквасочных ассоциаций с тем, чтобы отобранные штаммы были чувствительны к наименьшему числу фагов из разных «литических» групп и принадлежали к различным группам штаммов, подобранным по чувствительности к одним и тем же бактериофагам.

Интересно отметить, что доля фагоустойчивых штаммов молочнокислых бактерий, близка по значению к распространенности фагоустойчивых культур среди других групп микроорганизмов. Эти данные, по-видимому, говорят в пользу предположения о существовании в природе определенного соотношения между фагоустойчивыми и фагочувствительными штаммами различных систематических групп микроорганизмов. Такое соотношение характеризует естественное динамическое равновесие в системе «фаг-бактериальный хозяин», управляемое едиными для всех микроорганизмов законами, сложившимися в результате их эволюции. Причем, термин «фагоустойчивый» говорит лишь о более или менее высокой устойчивости данного штамма к специфическим фагам, наиболее

распространенным в данный период в той или иной географической зоне и имеющимся в распоряжении исследователя.

Исследователи проводили изучение инактивации бактериофагов: установлена значительная вариабельность выживаемости фагов молочнокислых бактерий после воздействия повышенных температур и экспоненциальный характер процесса их тепловой инактивации (Koka, Mikolaichik, 1967; Sozzi, Maret, 1975; Selskov, 1976; Krylova et al., 1979; Chopin, 1980; Quiberoni, Suarez, 1999; Mercanti, 2012). Режимы пастеризации молока не обеспечивают гарантированной инактивации всех бактериофагов молочнокислых бактерий. Нагревание до температуры 65–70°C ослабляет развитие бактериофагов, но полное уничтожение всех присутствующих в молоке бактериофагов наступало после 3–10 минутной выдержки молока при 90–95°C (Gudkov et al., 1978). Термоинаktivация бактериофагов определяется денатурацией фагового белка (Goldfarb, 1961; Ganina, 2003; Sniatkovskiy, Karychev, 2006).

На репродукцию бактериофагов значительное влияние оказывает также величина активной кислотности среды. Установлены широкие пределы значений pH (от 3,5 до 10), при которых фаги способны вызывать лизис мезофильных лактококков; по данным исследователей полностью фаги погибали лишь при 2,5 ед. pH (Sokh, 1977; Lakhtin et al., 2012). Таким образом, бактериофаги молочнокислых бактерий обладают высокой кислото- и щелочеустойчивостью.

Значительную роль в процессе адсорбции фагов на бактериальных клетках играет ионный состав среды, изменение пептидогликана клеточной стенки бактерии. Установлено, что фаги молочнокислых стрептококков нуждаются в кофакторах адсорбции, например,  $\text{Ca}^{2+}$  (Collins, Nelson, 1950; Lawrence, Thomas, 1976; Meyrand, 2007). Однако, ряд данных свидетельствуют, что некоторые бактериофаги не нуждаются в ионах  $\text{Ca}^{2+}$  и растут в бескальциевой среде (Gudkov et al., 1979). Возможно,  $\text{Ca}^{2+}$  необходим в целом системе фаг-хозяин, как таковой (Sarga, 2006).

На репродукцию бактериофагов также значительное ингибирующее влияние оказывает излучение, например, УФ-лучи (Neromnyashchaya et al., 1961).

К другим факторам, влияющим на жизнестойкость бактериофагов, относятся перекисные соединения, дезинфицирующие и моющие средства, антибиотики, антифаговые сыворотки и т.д. (Sniatkovskiy et al., 2006; Mullan, 2017).

Таким образом, приведенные данные о биологии и экологии бактериофагов молочнокислых бактерий свидетельствуют, что взаимодействие фагов с клеткой-хозяином представляет собой сложный динамический процесс и на параметры этого процесса оказывают влияние различные факторы.

Основными источниками фагов, попадающих в смесь для выработки сыра, являются сырое молоко, поверхности трубопроводов и оборудования, а также закваска, которая могла быть контаминирована фагами ранее (Berzhuynas, Sukhotskene, 1973; 1976; Gudkov, Pak, 1973). Главная же роль в заражении предприятия бактериофагами принадлежит сыворотке, являющейся благоприятной средой для их репродукции, способствующей сохранению данного набора фагов, а также появлению их мутантов и фенотипических модификаций.

Главным способом, оказывающим ингибирующее влияние на цикл воспроизводства фагов, является ротация заквасочных микроорганизмов. Данный способ используется для обеспечения нормального течения микробиологических процессов при выработке сыра в присутствии бактериофагов (Gudkov, 2003).

Значительное место в арсенале методов противодействия бактериофагам в сыроделии отводится использованию концентрированных бактериальных препаратов и заквасок для беспересадочного способа приготовления производственной закваски или для «прямого внесения» в сырную ванну (Verble, 1969; Vannikova, 1975; Lloid, 1976). Эти меры эффективны и позволяют снизить до минимума вероятность заражения закваски посторонней микрофлорой и бактериофагами.

Указанные меры противодействия заражению молочнокислых бактерий бактериофагами позволяют в той или иной мере обезопасить культуры бактериальных заквасок от фаголизиса лишь до момента внесения их в ванну. Присутствие же бактериофагов в пастеризованном молоке, предназначенном для выработки сыра, практически неизбежно. Поэтому, для снижения вероятности инактивации закваски под действием бактериофагов при выработке сыра в ее состав вводят по несколько штаммов молочнокислых бактерий одного и того же вида, причем весь штаммовый состав закваски периодически меняют.

Однако, эта схема требует наличия в обороте огромного числа штаммов молочнокислых бактерий. Причем ротация заквасок предполагает постоянное пополнение этого фонда и, одновременно, не позволяет эффективно использовать особо ценные штаммы, на селекцию которых подчас затрачивается значительное количество труда и средств. Кроме того, многоштаммовость закваски не гарантирует ее неуязвимости в отношении фаголизиса (Erickson, 1980). Наконец, многократное использование оборудования в течение дня способствует обсеменению производства все возрастающим количеством фагочастиц, что увеличивает вероятность появления высоковирулентных мутантов фагов и расширению спектра их литического действия (Gudkov, 2003).

Таким образом, вышеприведенные исследования доказывают необходимость детального учета всех сторон взаимодействия системы фаг-хозяин с целью оптимизации штаммового состава заквасок по фагочувствительности.

При отсутствии на предприятии фагового мониторинга и отбора наиболее фагорезистентных в данный момент культур происходит развитие не всех видов бактерий, входящих в состав заквасок, а только наиболее устойчивых к фагам, циркулирующим в цехах (Ganina, Volkov, 2005). Однако, высокая генетическая изменчивость бактериофагов, их способность «захватывать» при репродукции на заквасочных культурах часть генома клетки-хозяина и наличие определенного мутагенного фона приводят к тому, что бактериофаги довольно быстро могут менять свою вирулентность, что ведет, в свою очередь, к накоплению на производстве высоковирулентных штаммов фагов с широким спектром литического действия. Поэтому заквасочные культуры, отобранные, как «фагорезистентные», могут

лизироваться фагами, причем возможный интервал времени, необходимый для смены такой «фаговой полярности» на противоположную, может оказаться достаточно коротким, и партия бактериального препарата, обеспечивающая поначалу высокую активность бактериальной закваски, может утратить эту способность задолго до предполагаемой смены партии препарата. Циркулирующий на предприятии фаговый пул определяет ассоциации фагов, которые и участвуют во взаимоотношениях с заквасочными штаммами бактериальных препаратов.

С целью изучить ассоциации бактериофагов гомологичных молочнокислым бактериям проведен отбор проб фагосодержащих субстратов на одном сыродельном предприятии Алтайского края.

## Материалы и методы

В процессе работы использовались следующие методы: перевивка коллекционных фагов; определение титра фагов в фаголизатах и субстратах; выявление негативных зон задержки роста индикаторных культур в месте нанесения пробы испытуемого субстрата (метод «стекающей капли»); подтверждение фаговой природы этих зон и др. Большинство этих методов основаны на применении двухслойного посева на твердые агаризованные питательные среды (Brussow, 2005). Для получения многоштаммовых фагосодержащих субстратов (МФС), освобожденных от жизнеспособных бактериальных клеток как заквасочного, так и незаквасочного происхождения использовался способ получения таких «стерильных» МФС с помощью хлороформирования (Ganina, Volkov, 2005).

В качестве индикаторных использовали 142 культуры лактококков видов *Lc. lactis*, *Lc. diacetylactis* и *Lc. cremoris* из коллекции лаборатории микробиологии СибНИИС. Объектами исследований служили МФС, отобранные на сыродельном предприятии и содержащиеся в них фаговые ассоциации (ФА).

Фагочувствительность лактококков устанавливали путем нанесения на газоны исследуемых штаммов капель, содержащих фаговые ассоциации. Способность фаговых ассоциаций лизировать культуру определяли через 24 часа культивирования по наличию зоны лизиса в местах нанесения капель (Tkachenko et al., 2014).

Культивирование индикаторных культур вели по общепринятым методикам, используемым в микробиологии молочных продуктов. Применяемые при этом субстраты и питательные среды (физиологический раствор, обезжиренное молоко, питательный бульон, питательный агар и др.) готовили также общепринятым способом (MP 2.3.2.2327-08, 2008; Odegov et al., 2014).

Отбор и подготовка проб к анализам осуществляли по MP 2.3.2.2327-08.

## Результаты и их обсуждение

Для оценки ингибирующего потенциала вирулентных бактериофагов на продуцирование молочной кислоты мезофильными лактококками в лактозосодержащих субстратах поставили эксперимент на примере развития моноштаммового варианта системы «фаг-бактериальный хозяин» в качестве составляющих которой рассматривались клетки тест-культуры *Lc. diacetylactis* 12 и вирионы вирулентного коллекционного фага (штамм 71).

Культивирование проводили в питательном бульоне на основе гидролизата молока, множественность фаговой контаминации составила 0.0003 (1 фагочастица на 30000 бактериальных клеток). Уровень кислотности среды инкубации тестировали по изменению оптических свойств среды (по окраске индикатора как функции активной кислотности среды) на микробиологическом анализаторе с программным управлением «Soleris-32». На рисунке 1 представлена динамика роста популяции клеток этой культуры в присутствии вирулентного бактериофага и без него.

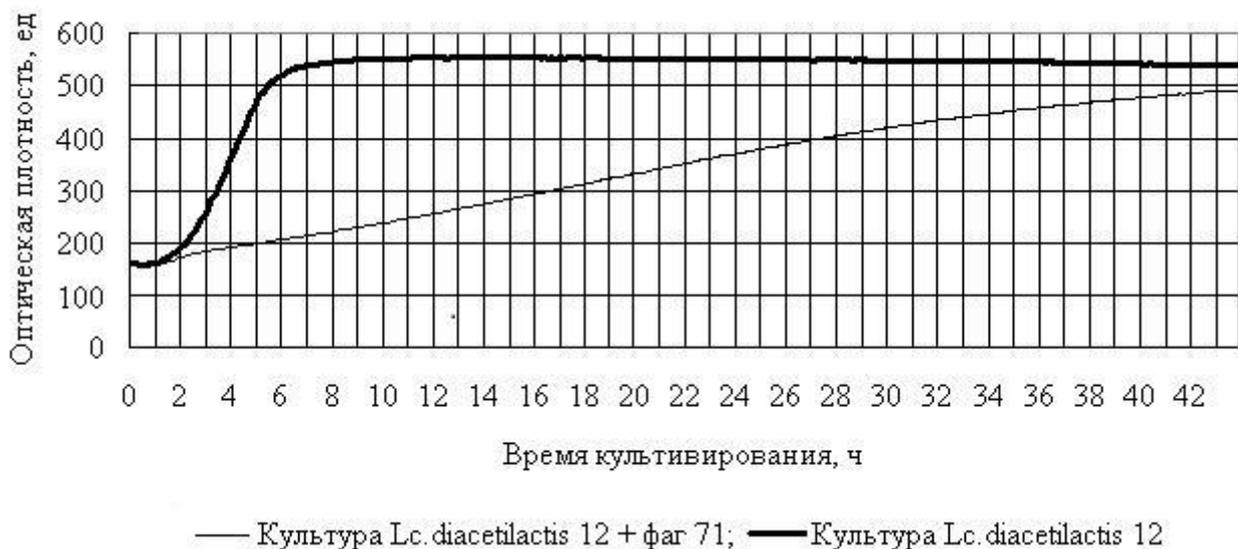


Рис.1. Развитие культуры *Lc. diacetylactis* 12 в среде, контаминированной корпускулами вирулентного бактериофага

Кривая роста культуры в варианте «без фага» имеет характерный вид и выраженный «лог-участок» протяженностью 4–5 часов. Наложение «фагового фактора» на процесс кислотообразования значительно снижает скорость нарастания кислотности среды и увеличивает период выхода кривой на «стационарную» фазу роста до 45 часов и более. Наблюдаемое отсутствие полного блокирования процесса объясняется естественной гетерогенностью популяции клеток тестируемой культуры по фагочувствительности.

Данные эксперимента свидетельствуют, что в рассматриваемых условиях фаговой контаминации субстрата, минимизированной по штаммовому и количественному уровням, фаголизис бактериальных клеток крайне резко ингибирует развитие их популяции и процесс кислотообразования в среде.

Для реальных же энзиматических процессов в молоке характерны поливалентные (полиштаммовые, поливидовые) системы «фаг-бактериальный хозяин», включающие широкий и меняющийся спектр бактериальных культур и биологически предопределенный микробиоценозом сыродельного предприятия набор фагов с высокой «суммарной» вирулентностью. В силу этой многофакторности негативный эффект в отношении заквасочных культур будет гарантированно и постоянно реализовываться в той или иной мере хотя бы из-за вышеуказанной гетерогенности, а также неопределенности и вариабельности штаммового состава и общей вирулентности фаговой составляющей таких систем.

Реальное взаимодействие фагов и молочнокислых бактерий, их опасность для протекания молочнокислого процесса можно оценить на примере литической активности фагового пула сыродельного предприятия. Эту активность с достаточной степенью предполагаемой адекватности тестировали на фоне набора коллекционных индикаторных культур, гомологичного по штаммово-видовому составу заквасочной популяции. Эта межштаммовая/межвидовая морфологическая дифференциация определяется в первую очередь вирулентностью бактериофагов к конкретной индикаторной культуре, множественностью фагового заражения субстрата и популяционно-видовыми показателями контаминирующей микрофлоры.

С этой целью в 2015г. на Барнаульском сыродельном экспериментальном заводе проводили отбор проб производственных технологических субстратов (молочная сыворотка). Нумерация его включает порядковый номер и дату отбора (число/месяц/год).

Как свидетельствуют данные величина индекса литической активности (ИЛА), определённого как отношение чувствительных культур к общему количеству культур в выборке, в «общем» ряду выборок индикаторных культур и тестированных фаговых ассоциаций (ФА) варьировала в широком диапазоне от 0,00 (тест «ФА45/12/05/15 на культурах *Lc. cremoris*») до 0,44 (тест «ФА57/15/06/15 на культурах *Lc. diacetylactis*»). Интересно отметить, что экстремумы соответствуют разным видам лактококков.

Интервал изменения ИЛА в ряду выборок индикаторных культур также был достаточно большим. Значения ИЛА для ФА38/21/04/15 в «межвыборочном» ряду для видов *Lc. lactis*, *Lc. diacetylactis* и *Lc. cremoris* составили соответственно 0,28; 0,08; и 0,21; для ФА45/12/05/15 – 0,32; 0,12 и 0; для ФА 45/15/06/15 – 0,26; 0,44 и 0,29; для ФА 45/14/07/15 – 0,21; 0,12 и 0,21; для ФА 45/13/08/15 - 0,17; 0,13 и 0,29 и для ФА 45/21/09/15 – 0,21; 0,27 и 0,21.

Графическая интерпретация данных по уровню ИЛА для трех наиболее репрезентативных выборок *Lc. lactis*; *Lc. diacetylactis* и *Lc. lactis + Lc. diacetylactis* представлена на рисунке 2. Как свидетельствуют данные «межвыборочные» тренды соотношений уровней ИЛА практически идентичны в ряду 4-х тестированных ФА (ФА38/21/04/15; ФА45/12/05/15; ФА45/12/05/15 и ФА62/14/07/15). Это свидетельствует об определенной близости степени межвидовой дифференциации (в пределах указанных видов культур) вирулентности фагового пула предприятия в соответствующих точках временной шкалы отбора проб.

Если же говорить о «межотборных» трендах применительно к определенному виду индикаторных культур, то необходимо отметить, что соответствующая виртуальная кривая для выборки *Lc. lactis* характеризуется меньшими по амплитуде колебаниями ординат, по сравнению с таковой для *Lc. diacetylactis*. Наличие «пикового» значения ординаты «июньской» ФА свидетельствует о возможности значительного роста «летней» вирулентности фагового пула по отношению к данной составляющей микробиоценоза предприятия.

Если рассматривать вариабельность ИЛА в ряду проб МФС, то наибольший диапазон отмечен для выборки *Lc. diacetylactis* – «от 0,08 до 0,44»; для этой же выборки отмечено максимальное значение коэффициента вариации ИЛА 189,5 %. Относительно двух других видовых выборок диапазон ИЛА был более узким: «от 0,18 до 0,32» у *Lc. lactis* и «от 0,00 до 0,29» у *Lc. cremoris*, а коэффициенты вариации равны соответственно этим выборкам 58,3 % и 145,0 %.

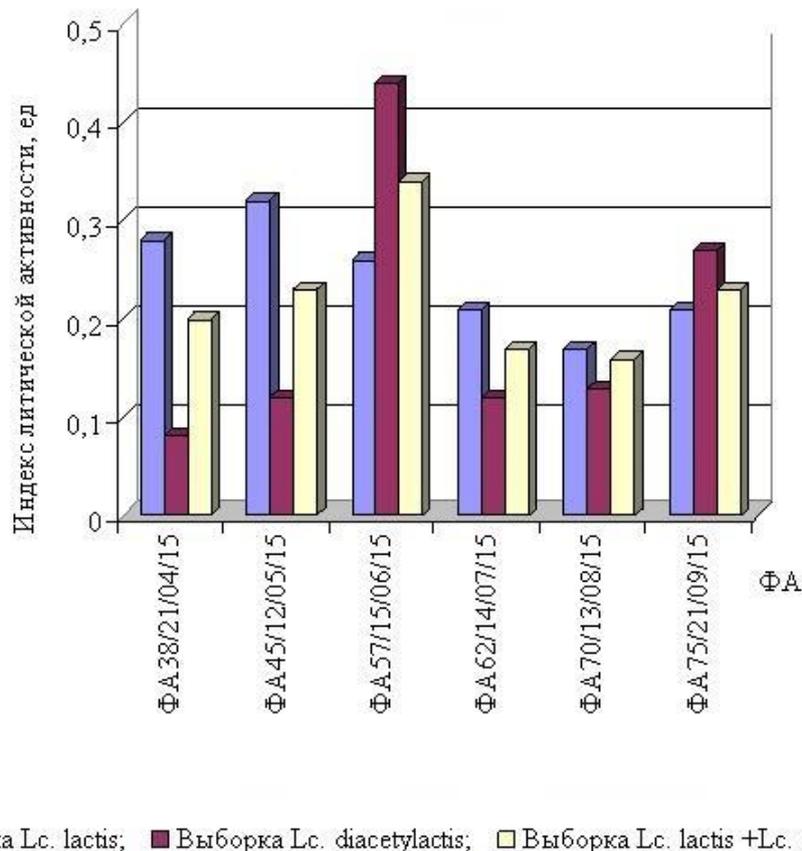
Для объединенных выборок значения ИЛА укладывались в диапазон «от 0,16 до 0,34» для выборки «*Lc. lactis + Lc. diacetylactis*» и «от 0,17 до 0,33» для выборки «*Lc. lactis + Lc. diacetylactis + Lc. cremoris*»; при этом указанные коэффициенты были равны соответственно 81,8 % и 72,7 %.

При этом средние значения ИЛА в ряду тестированных ФА для всех выборок культур варьировали незначительно и находились в пределах от 0,19 (выборка *Lc. diacetylactis*) до 0,24 (выборка *Lc. lactis*).

Необходимо отметить, что наибольшая (в пределах полученных данных) вариабельность ИЛА, характерная выборкам *Lc. diacetylactis* и *Lc. cremoris*, по-видимому косвенно свидетельствует в целом о большей мобильности уровня фагочувствительности культур этих видов как видовых составляющих микробиоценоза предприятия.

Установлено, что лизотипы в ряду ФА и индикаторных выборок характеризуются разной степенью дифференциации. В частности, тестирование на выборке *Lc. lactis* показало, что лизотипы ФА38/21/04/15 и ФА45/12/05/15, содержащихся в соответствующих МФС, отобранных почти с месячным интервалом, отличаются незначительно. Так, штаммы *Lc. lactis* 44 и *Lc. lactis* 48, составляющие 10% лизотипа ФА38/21/04/15, не лизируются ФА45/12/05/15. И, напротив, 22% культур, составляющих лизотип ФА45/12/05/15 (штаммы 5, 27, 36, 52 и 65 того же вида) резистентны к ФА38/21/04/15.

При этом для данных МФС выявлена достаточно высокая штаммовая аналогия спектров литического действия ФА. Лизотипы обоих рассматриваемых ФА включают по 18 совпадающих штаммов *Lc. lactis*. Их доли в лизотипах ФА38/21/04/15 и ФА 45/12/05/15 составили, соответственно 86 % и 75 %. Таким образом, для данной пары ФА выявлена достаточно высокая стабильность «спектрального» состава лизируемых культур. Можно отметить в данном случае и близость уровня ИЛА (0,28 и 0,32 соответственно этим ФА.)



**Рис. 2.** Уровень литической активности тестируемых ФА по отношению к разным выборкам индикаторных культур

Однако, сравнение литической активности ФА другой пары проб, например, ФА38/21/04/15 и ФА75/21/09/15 ФА (разделенных почти 5-месячным интервалом), тестируемых по отношению к той же выборке культур, выявляет иную величину дифференциации лизотипов. Вышеотмеченная штаммовая аналогия в лизотипах ФА38/21/04/15 и ФА75/21/09/15 была менее выражена (всего 5 «общих» штаммов) и составила соответственно 24% и 31%, т.е. данные лизотипы более дифференцированы между собой, чем лизотипы предыдущей пары. При этом по уровню литической активности ФА38/21/04/15 и ФА75/21/09/15 был достаточно близки: ИЛА этих ФА равнялись соответственно 0,28 и 0,21. Еще большие (в том числе и максимальные в пределах полученных данных) различия спектров лизируемых культур выявило тестирование литической активности ФА на фоне индикаторной выборки *Lc. diacetylactis*. Так, в лизотипы пары соседних (по ходу отбора) ФА38/21/04/15 и ФА45/12/05/15 входило по одному «общему» штамму (№150), что составило 25% и 24% «протяженности» соответствующих лизотипов. Значения ИЛА для этой пары также были близки между собой – 0,08 и 0,12, соответственно.

Таким образом, для ФА45/12/05/15 можно отметить сочетание незначительности доли культур из лизотипа предыдущей ФА и примерно среднего (в пределах данной индикаторной выборки) уровня ИЛА.

Для последующей пары ФА45/12/05/15 и ФА57/15/06/15 различия уже более выражены. Выявлены 4 совпадающих культуры (№№ 122; 127; 132 и 150), доли которых составили 80 % и 17 % от ширины лизотипа, а уровень ИЛА этих ФА дифференцировался значительно – 0,12 и 0,44. Необходимо отметить, что выявленный для ФА57/15/06/15 максимум ИЛА (0,44) здесь соседствует с малым значением доли совпадающих в данной паре ФА культур (17%).

Приведенные на примере двух наиболее представительных одновидовых индикаторных выборок *Lc. lactis* и *Lc. diacetylactis* данные свидетельствуют об отсутствии выраженной корреляции между изменением уровня интегральной литической активности исследуемых ФА, характеризуемого ИЛА, и мобильностью спектра лизируемых культур, характеризуемой величиной доли повторяющихся (т.е. переходящих из лизотипа предыдущей ФА) и, соответственно, числом появляющихся «новых» штаммов, резистентных предыдущей ФА.

Для повышения адекватности выводов введено понятие «коэффициент обновления лизотипа» (КОЛ), который рассматривается как динамический параметр фагового пула предприятия, характеризующий скорость изменения спектра его интегральной литической активности. Значение КОЛ рассчитывается как доля культур, появившихся в лизотипе каждой последующей ФА, по сравнению с предыдущими. Соответственно, чем выше значение КОЛ, тем

больше «обновленная» часть литического спектра в каждой последующей пробе МФС, а значит выше и его общая мобильность (вариабельность). По своей сути КОЛ отражает флуктуацию координат ареала «питания» фагового пула предприятия в пространстве его микробиоценоза.

Величина КОЛ для всего полученного массива данных варьировала (в «общем» ряду выборок и ФА) в диапазоне от 0,25 до 1,00. Естественно, что наиболее корректно рассматривать изменение данного «литического» параметра лишь относительно конкретной индикаторной выборки. В этом случае диапазоны изменения КОЛ для разных выборок отличались друг от друга довольно значительно. Так наибольшая (в ряду одновидовых выборок) протяженность рассматриваемого диапазона КОЛ (от 0,00 до 1,00) выявлена для культур *Lc. cremoris*; этому соответствовал тоже наибольший коэффициент вариации – 192,3 %. Для выборок *Lc. lactis* и *Lc. diacetylactis* рассматриваемые диапазоны были соответственно «от 0,25 до 0,75» и «от 0,33 до 0,83», а коэффициенты вариации – 100 % и 82 %. Интересно отметить, что для последних выборок интервалы варьирования КОЛ совпадали (0,5).

Среднее значение КОЛ для одновидовых выборок составило 0,50; 0,61 и 0,52, соответственно выборкам *Lc. lactis*, *Lc. diacetylactis* и *Lc. cremoris*. Последнее свидетельствует о значительной по величине «видовой» мобильности фагочувствительности культур этих близких видов мезофильных лактококков (несмотря на различия репрезентативности их выборок).

Для более представительных смешанных выборок (*Lc. lactis* + *Lc. diacetylactis* и *Lc. lactis*, + *Lc. diacetylactis* + *Lc. cremoris*) характерны примерно такие же значения обсуждаемых параметров и последующие выводы. Увеличение репрезентативности выборок естественно увеличивает и адекватность этих выводов.

Как уже отмечалось, полученные данные свидетельствуют, что показатели интегральной литической активности исследованных ФА (ИЛА и КОЛ) на разных стадиях наблюдений в рядах выборок и ФА варьировали «вразнобой». В частности, наиболее широкому спектру (максимум значения ИЛА) не всегда соответствовало максимально быстрое обновление его состава (максимум КОЛ). Например, для выборки *Lc. lactis* самая высокая скорость обновления спектра (КОЛ 0,75), выявлена у ФА75/21/09/15, и она соответствовала почти минимальному (в ряду тестируемых ФА) уровню литической активности (ИЛА 0,21) и, напротив, максимум ИЛА (0,32) выявлен у ФА45/12/05/15 при довольно «среднем» значении КОЛ (0,25).

А вот при тестировании ФА57/15/06/15 для выборки *Lc. diacetylactis* эти «динамические» максимумы (в ряду ФА) совпали (ИЛА 0,44 и КОЛ 0,83). Интересно отметить, что для данной выборки предыдущая ФА45/12/05/15 характеризовалась этим же значением КОЛ, но уже почти минимумом ИЛА (0,12), т.е. в этом случае максимальная скорость обновления спектра лизируемых культур сохранялась более длительное время и приходилась на май-июнь.

Необходимо отметить, что спектр лизируемых культур в ряду тестируемых ФА для этой выборки в течение времени наблюдений обновлялся с большей интенсивностью, чем для *Lc. lactis*. Например, за короткий «межотборный» период между ФА38/21/04/15 и ФА45/12/05/15 он обновился на 83 %, за последующий (чуть более длинный) период между ФА45/12/05/15 и ФА57/15/06/15 – снова на 83 %. Еще большей мобильностью характеризовался спектральный состав лизотипов ФА относительно выборки культур *Lc. cremoris* за этот же «последующий» период спектр фагочувствительных культур этих ФА сменился полностью.

Естественно, если рассматривать мобильность спектра таких культур для «несоседних» в своем ряду ФА, то можно сделать предположение, о практически гарантированной полной смене его состава за несколько более значительный промежуток времени, поскольку показатели КОЛ в этом случае можно в каком то смысле суммировать; при этом значение КОЛ конечно же может превышать 1,0. Данное суммирование учитывает возможные реверсные и/или циклические изменения лизотипа, которые тем не менее являются тем же атрибутом его мобильности как параметра динамики интегральной литической активности. Такие случаи выявлены, например, для «крайних» ФА в ряду отобранных МФС (апрель-сентябрь) при их тестировании относительно одновидовых выборок индикаторных культур *Lc. diacetylactis* и *Lc. cremoris*.

Вышеназванные соотношения ИЛА и КОЛ графически интерпретированы на рисунке 3, где представлена динамика данных параметров за период наблюдений.

Действительно, колебания в координатах «ФА-значения» положения лент ИЛА для разных выборок культур характеризуются различной амплитудой. При этом (в соответствие с вышеприведенными данными) максимум ее значения приходится на выборку *Lc. diacetylactis*, а наиболее «стабильна» в этом плане лента выборки *Lc. lactis*. Наибольшие значения ординат точек «перелома» лент ИЛА, как и следовало ожидать, соответствуют абциссам «летних» ФА.

Динамика параметра КОЛ значительно дифференцируется от таковой для ИЛА. Амплитуда изменения ординат КОЛ-лент в тех же координатах кратно превышает размах колебаний ИЛА-лент. Наибольшим диапазоном при этом характеризуется выборка *Lc. cremoris*, чуть меньшим – выборка *Lc. diacetylactis*, а для суммарной выборки он минимален. Эти резкие «взлеты» и «падения» ординат «перелома» (в подтверждение ранее сказанного) также приходятся на летний период. Причем тренд резкого изменения наклона КОЛ-лент сохраняется для всех выборок индикаторных культур.

Резюмируя обсуждение динамических параметров фагового пула предприятия, необходимо отметить, что более высокий уровень интегральной литической активности отмечен для ФА «майско-июньских» МФС, затем он немного спадал и потом несколько неожиданно поднимался в «сентябрьских». Такие колебания, как уже отмечалось, вполне объяснимы и детерминируются микробиоценозом предприятия (составом нативной микрофлоры молока, штаммово-видовым составом применяемых бакпрепаратов, частотой их ротации, способом внесения), многократностью выработок, санитарными показателями и др.

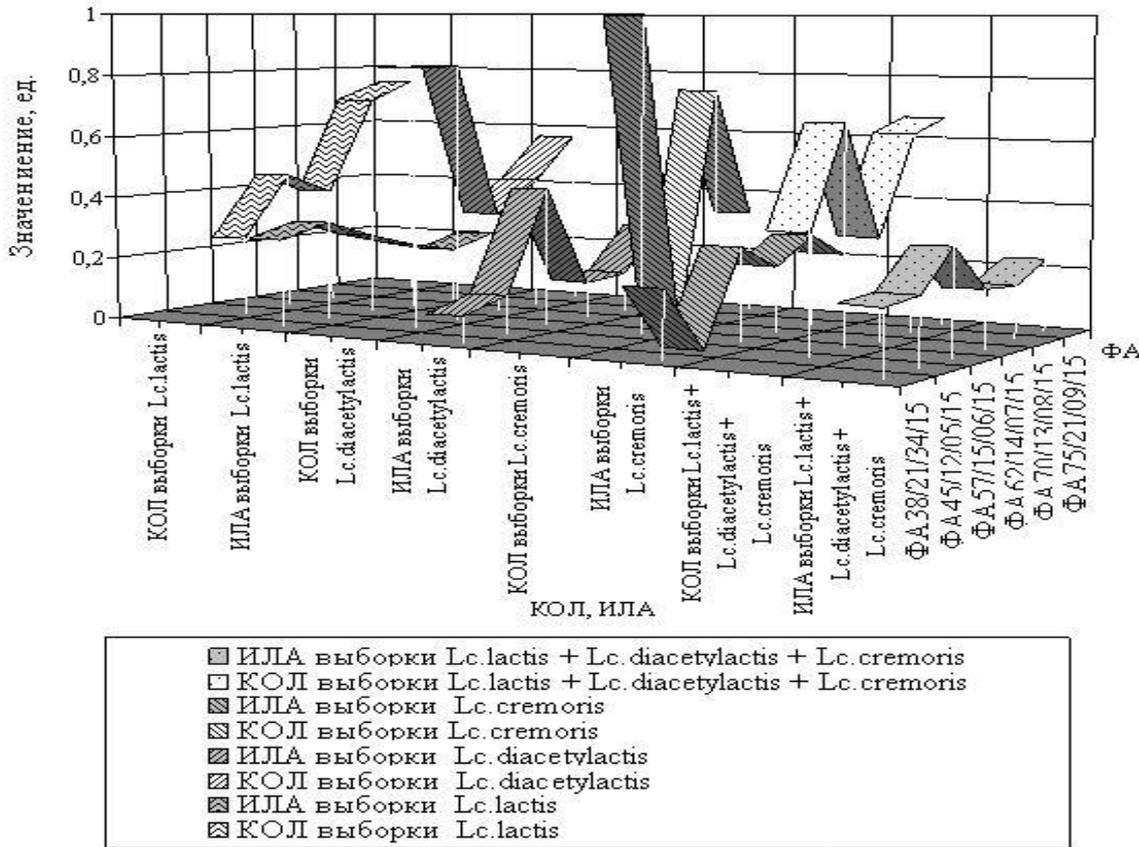


Рис. 3. Динамика параметров ИЛА и КОЛ тестируемых ФА для одновидовых и суммарной выборок индикаторных культур мезофильных лактококков

В целом, рассматривая вариабельность литических параметров фагового пула предприятия, необходимо отметить, что, несмотря на определенную «разнофазность» и «асинхронность» выше описанных динамических параметров, тестируемых ФА, их интегральная литическая активность в течение всего периода наблюдений характеризовалась высоким (особенно в летний период) уровнем, широким и мобильным по составу спектром лизируемых культур. Эта активность более выражена (в пределах полученных данных) в отношении культур *Lc.lactis* и *Lc.diacetylactis*, что особенно опасно, поскольку культуры этих видов являются определяющей кислотообразующей частью заквасочного микробиоценоза.

## Выводы

Полученные данные характеризует фаговую обстановку на предприятии, как процесс, в котором и фаги, и молочнокислые бактерии находятся в постоянном динамическом взаимодействии, перманентно обеспечивающем, в конечном итоге, высокую интенсивность репродукции фаговых вирионов. Исследования вирулентности ФА по отношению к коллекционным бактериальным культурам показали значительную вариабельность литических свойств ФА, как по индексу литической активности (ИЛА), так и по спектру литического действия.

По результатам исследований не выявлено выраженной корреляции между изменением уровня интегральной литической активности исследуемых ФА, характеризуемого ИЛА, и мобильностью спектра лизируемых культур. Установлено, что величина предложенного расчетного коэффициента обновления лизотипа, позиционируемого как динамический параметр фагового пула предприятия, характеризующий скорость изменения спектра его интегральной литической активности и определяемого как доля культур, появившихся в лизотипе каждой последующей ФА по сравнению с предыдущей/предыдущими, варьировала (в «общем» ряду выборок культур и ФА) в диапазоне от 0,25 до 1,00.

Динамика тестируемых параметров фагового пула предприятия свидетельствует, что более высокий уровень интегральной литической активности отмечен для ФА «майско-июньских» МФС, затем он немного спадал и затем поднимался в «сентябрьских». Быстрая скорость вариабельности литических свойств бактериофагов является показателем их высокой эволюционной изменчивости.

## References

- Adams, M. (1961). Bakteriofagi. Moscow: Inostrannaya literatura (in Russian).
- Azeredo, J., Sutherland, I.V. (2008). The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 9, 261–266.
- Bannikova, L.A. (1975). Seleksiya molochnokislykh bakteriy i ikh primenenie v molochnoy promyshlennosti. Moscow: Pishchevaya Promyshlennost (in Russian).
- Berzhyunas, Z., Sukhotskene, I. (1976). Chuvstvitel'nost' molochnokislykh streptokokkov k fagam, rasprostranennym na nekotorykh syrodell'nykh zavodakh Litovskoy SSSR. *Nauchnye Trudy Lituianian Branch Research Institute of Cheese and Butter Making*, 11, 231–235 (in Russian).
- Berzhyunas, Z., Sukhotskene, I. (1973). Rasprostranennost' bakteriofagov pri vyrabotke syra. *Nauchnye Trudy Lituianian Branch Research Institute of Cheese and Butter Making*, 8, 169–174 (in Russian).
- Brussow, H. (2001). Phages of dairi bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55, 283–303.
- Capra, M.L. (2006). Characterization of a new virulent phage (MLC-A) of *Lactobacillus paracasei*. *J. Dairy Sci.*, 89, 2414–2423.
- Chopin, M.C. (1980). Resistance of 17 mesophilic lactic *Streptococcus* bacteriophages to pasteurization and spray-drying. *J. Dairy Res.*, 47, 131–139.
- Cleary, P.P. (1977). Studies of the receptor for phage a25 in group a streptococci: the role of peptidoglycan in reversible adsorption. *J. Exp. Med.*, 145, 578–593.
- Collins, E.B., Nelson, F.E., Parmelee, I.E. (1950). The relation of calcium and the constituents of a refined medium to proliferation of lactic streptococcus phages. *J. Bact.*, 60(6), 533–542.
- Cox, W.A. (1977). Characteristica and use of starter cultures in the manufacture of hard pressed cheese. *J. Soc. Dairi Thechnol.*, 30(1), 5–15.
- Deryabina, E.N. (1953). Poluchenie fagorezistentnykh shtammov molochnokislykh streptokokkov s tsennymi dlya proizvodstva svoystvami. *Mikrobiologiya*, 226(4), 452–455 (in Russian).
- Deveau, H., Labrie, S.J., Chopin, M. (2006). Biodiversity and classification of lactococcal phages. *Applied and Environmental Microbiology*, 338–346.
- Dokukin, V.M., Gudkov, A.V., Odegov, N.I. (1979). Vliyanie fagovoy infektsii na razvitie zakvasochnykh shtammov v syrodellii. In: Povyshenie kachestva i effektivnosti proizvodstva natural'nykh syrov v rayonakh Sibiri i Dal'nego Vostoka. Barnaul (in Russian).
- Erickson, R.J. (1980). Bacteriophage problems in the dairy industry. Their cause, characterization and cure. *J. Dairy Ind. Int.*, 3, 37–42.
- Mozzi, F.R., Graciela, R.M. (2010). *Vignolo Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*. Blackwell Publishing.
- Ganina, V.I. (2003). Vliyanie bakteriofagov na formirovanie organolepticheskikh svoystv molochnykh produktov. *Pererabotka moloka*, 7(45), 7–8 (in Russian).
- Ganina, V.I., Leshina, V.S., Molotova, N.O. (1991). Poluchenie i otbor kul'tur i zakvasok po pokazatelyu fagoustoychivosti. *Molochnaya i myasnaya promyshlennost'*, 3, 27–30 (in Russian).
- Ganina, V.I., Volkov, I.R. (2005). Fagovyy fon na predpriyatiyakh, vyrabatyvayushchikh kislomolochnye produkty. *Pererabotka moloka*, 7, 10 (in Russian).
- Garneau, J.E., Moineau, S. (2011). Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial Cell Factories*, 10(Suppl 1), 20. doi:10.1186/1475-2859-10-S1-S20.
- Gibshman, M.R., Belousova N.N. (1955). Bakteriofag v syrodellii i mery bor'by s nim. *Nauchnye Trudy Research Institute of Cheese and Butter Making*, 2, 41 (in Russian).
- Gibshman, M.R., Deryabina, E.N. (1998). Spetsifichnost' bakteriofagov molochnokislykh streptokokkov. *Molochnaya promyshlennost'*, 11, 38–39 (in Russian).
- Gol'dfarb, D.M. (1961). Bakteriofagi. Moscow. Medgiz (in Russian).
- GOST 32901-2014 (2014). Moloko i molochnaya produktsiya. Metody mikrobiologicheskogo analiza. Moscow. Standartinform (in Russian).
- Gudkov, A.V., Pak, V.B. (1973). Istochniki bakteriofagov molochnokislykh bakteriy na proizvodstvenno-eksperimental'nom zavode. *Nauchnye Trudy Research Institute of Cheese and Butter Making*, 11, 67–71. (in Russian).
- Gudkov, A.V. (2003). Syrodellie: tekhnologicheskie, biologicheskie i fiziko-khimicheskie aspekty. Moscow. DeLi print (in Russian).
- Gudkov, A.V., Dokukin, V.M., Samoylova L.N. (1979). Effektivnost' primeneniya dekal'tsinirovannoy sody dlya preduprezhdeniya reproduksii bakteriofagov mezofil'nykh molochneokislykh streptokokkov. *Nauchnye Trudy Lituianian Branch Research Institute of Cheese and Butter Making*, 30, 50–52 (in Russian).
- Gudkov, A.V., Dokunin, V.M., Fomichev, Yu.K. (1979). Ustoychivost' k vneshnim faktoram fagov mezofil'nykh molochnokislykh streptokokkov. *Nauchnye Trudy Research Institute of Cheese and Butter Making*, 30, 46–49 (in Russian).
- Gudkov, A.V., Dokunin, V.M., Fomichev, Yu.K. (1976). Vliyanie bakteriofaga na protsess vyrabotki syra. *Molochnaya promyshlennost'*, 5, 7–12 (in Russian).
- Karlikanova, S.N., Krapivina, V.A., Nikanorova, T.A. (1975). Izuchenie svoystv bakteriofagov, vydelennykh na predpriyatiyakh molochnoy promyshlennosti Stavropol'mkogo kraja: Ekspres-informatsiya, Ser: Tsel'nomolochnaya promyshlennost', 5, 10–12 (in Russian).
- Koka, M., Mikolaichik, E.M. (1967). Kinetics of thermal destruction of bacteriophage active against *Streptococcus cremoris*. *J. Dairy Sci.*, 50, 1025–1031.
- Krylova, V.P., Kononovich, N.G., Zykova, N.E. (1979). Fagoustoychivaya zakvaska. *Molochnaya promyshlennost'*, 3, 19–20 (in Russian).
- Kushkina, A.I., Tovkach, F.I. (2011). Lizogeniya u bakteriy i ee znachenie dlya biotekhnologiy. *Biotekhnologiya*, 4(1), 29–40 (in Russian).
- Lakhtin, A.V., Aleshkin, A.V., Lakhtin, M.V., Afanas'ev, S.S., Aleshkin, V.A. (2012). Bakteriofagi i molochnokislye bakterii. *Obzor. Byulleten' VSNTs SO RAMN*, 5(1), 382–385 (in Russian).
- Lakhtin, V.M. (2008). Strategicheskie aspekty konstruirovaniya probiotikov budushchego. *Vestnik Russian Academy of Medical Science*, 2, 33–44 (in Russian).

- Lawrence, R.C. (1978). Action of bacteriophage on lactic acid bacteria: consequences and protection. *J. of Dairy Sci. And Technol.*, 13(3), 129–36.
- Lawrence, R.C., (1973). J. Gilles Cheese starter under control. *Dairy Sci. and Technol.*, 18(3), 122–123.
- Lawrence, R.C., Thomas, T.D., Tersaqhi, B.E. (1976). Reviews of the progress of Dairy Science cheese starters. *J. Dairy Res.*, 43, 141–193.
- Limsowtin, G.K.Y., Heap, H.A., Lawrence, R.C. (1978). Heterogeneity among strains of lactic streptococci. *J. Dairy Scim and Technol.*, 13, 1–8.
- Lloid, G. (1976). The production of frozen concentrated cheese starters. *Food Thechnol. Austral.*, 28(1), 35–36.
- Madera, C., Garcia, P., Janzen, T. (2003). Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. *Int. J. Food microbial*, 86(3), 213–222.
- Marcy, M., Moineau, S., Quiberoni, A. (2012). Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage*, 2, 149–155.
- McGrath, S., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D. (2004). The impact of bacteriophage genomics. *Biotechnol. J.*, 2(4), 450–455.
- Mercanti, D.J. (2012). Resistance of two upon temperature *Lactobacillus paracasei* bacteriophages to high pressure homogenization, thermal treatments and chemical biocides of industrial application. *Food Microbiol*, 29, 99–104.
- Meyrand, M. (2007). Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylation decreases autolysis in *Lactococcus lactis*. *Microbiology*, 1(2), 66–85.
- Moineau, S. (2005). Control of bacteriophages in industrial fermentation. *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press, BocaRaton, Fla.
- MR 2.3.2.2327-08 (2008). Metodicheskie rekomendatsii po organizatsii proizvodstvennogo kontrolya na predpriyatiyakh molochnoy promyshlennosti. Uglich: Research Institute Cheese and Milk Making (in Russian).
- Mullan, W.M.A. (2002). Bacteriophages for lactic acid bacteria with particular emphasis on lactococci. Available from: <https://www.dairyscience.info/index.php/bacteriophages-for-lactic-acid-bacteria-with-particular-emphasis-on-lactococci.html/> Accessed on 20 September, 2017.
- Naumenko, O.V. (2015). Research of interaction between lactobacteria and phage. *Scinence Bulletin Lviv National University of Veterinary Medicine and Biochnology*, 17, 1-4(61), 68–72.
- Nepomnyashchaya, M.L., Medvedinskaya, L.Yu., Liberman, L.A. (1961). Bakteriofag molchnokislykh streptokokkov i bor'ba s nim v molochnoy promyshlennosti. Kiev: Academy of Sciences USSR (in Russian).
- Odegov, N.I., Tkachenko, V.V., Dorofeev, R.V., Irkitova, A.N., Belov, A.N. (2014). Variabel'nost' integral'nykh morfologicheskikh i liticheskikh svoystv fagovykh assotsiatsiy, tsirkuliruyushchikh na syrodel'nykh predpriyatiyakh. *Izvestiya Altayskogo gosudarstvennogo universiteta*, 3(2), 55–59 (in Russian).
- Quiberoni, A., Suarez, V.B., Reinheimer, J.A. (1999). Inactivation of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by thermal and chemical treatments. *J. Food Prot.*, 62, 894–898.
- Rayskiy, A.P., Belyasova, N.A., Lagonenko, A.L., Kul'ba, A.M., Evtushenkov, A.N. (2009). Molekulyarno-geneticheskie svoystva rasprostranennykh v Belarusi bakteriofagov laktokokkov. *Vestnik BGU*, 1(2), 70–73 (in Russian).
- Sacarai, T., Takahashi, T., Arai, H. (1970). Tempered phages of *Lactobacillus salivaris* and *Lactobacillus casei*. *Jap. J. Microbiol.*, 14(3-4), 333–336.
- Sanlibaba, P., Akcelic, M. (2005). Classification of virulent lactococcal bacteriophages based on protein composition and restriction endonuclease analysis. *Turk. J Anim Sci*, 865–871.
- Saxelin, M.L., Nurmiaho, E.L., Korhola, M.P., Sundman, V. (1979). Partial characterization of a new C3-type capsule-dissolving phage of *Streptococcus cremoris*. *Can. J. Microbiol.*, 25, 1182–1187.
- Sel'skov, A.N. (1976). Termoinaktivatsiya bakteriofagov molochnokislykh streptokokkov. *Vestnik Belorusskogo univesiteta, ser. 2: Khimiya, biologiya, geologiya, geografiya*, 2, 39–44 (in Russian).
- Snyatkovskiy, M.V., Karychev, R.Z., Shamanova, G.P. (2006). Bakteriofagi v molochnom proizvodstve i bor'ba s nimi. *Pererabotka moloka*, 5(79), 20–21 (in Russian).
- Sorokina, N.P., Perfil'ev, G.D. (2013). Aktivnost' zakvasochnoy mikroflory: prichiny snizheniya i sposoby povysheniya. *Metody predotvrashcheniya porazheniya molochnokislykh bakteriy bakteriofagami. Molochnaya promyshlennost'*, 11, 32–35 (in Russian).
- Sorokina, N.P., Perfil'ev, G.D., Polyanskaya, I.S. (2014). Bakteriofagi laktokokkov. *Syrodelie i maslodeliye*, 1, 36–37 (in Russian).
- Sozzi, T., Maret, R. (1975). Isolation and Characteristica of *S. thermophilus* and *L. helveticus* phage from Emmental starters. *Lait*, 55(545-546), 269–288.
- Sturino, J.M., Klaenhammer, T.R. (2004). Bacteriophage defense systems and strategies for lactic acid bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.*, 56, 331–338.
- Szczepanska, A.K., Hejnowicz, M.S., Kolakowski, P. (2007). Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in Polish dary environment. *Acta Biochimica polonica*, 151–158.
- The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria (2006). Vol. 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. M.Dworkin (Ed.). USA. Springer.
- Tkachenko, V.V., Odegov, N.I., Dorofeev, R.V. (2017). Prigotovlenie «steril'nykh» fagolizatorov. *Molochnaya promyshlennost'*, 1, 48–49 (in Russian).
- Verble, C.W. (1969). Concentrated dairy cultures. *Food Eng.*, 41(5), 104–105.

**Citation:**

Odegov, N.I., Dorofeev, R.V., Irkitova, A.N., Funk, I.A., Orlova, T.N., Matsyura, A.V. (2017). 2Diversity of phage associations homologous to lactic acid bacteria. *Ukrainian Journal of Ecology*, 7(4), 197–206.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0. License