

ЛИТЕРАТУРА

1. Олейник, К.Н. Оптимизация мониторинга мелких членистоногих садовых агроценозов / К.Н. Олейник // Агро XXI. - 1998. - № 10. - С. 16-17.
2. Гричанов, И.Я., Овсянникова, Е.И. Феромоны для фитосанитарного мониторинга

вредных чешуекрылых /СПб: Всерос. ин-т защиты растений, 2005. - 244 с.

3. Васильев, В.П. Вредители плодовых культур / В.П. Васильев, И.З. Лившиц. - М.: Колос, 1984. - 399 с
4. <http://plantprotection.ru/raznoe/vrediteli-kashtana>

Herasimovich A.D.

Magister of Biol. sci., junior researcher

Institute of Microbiology Belarus National Academy of Sciences,

Novik G.I.

Candidate of Biol. Sci., head of laboratory

Institute of Microbiology Belarus National Academy of Sciences,

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PHAGE RESISTANCE OF LACTIC ACID BACTERIA *LACTOCOCCUS LACTIS*

Герасимович Александра Демьяновна

Магистр биологических наук, младший научный сотрудник

Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси

Новик Галина Ивановна

Кандидат биологических наук, заведующий лабораторией

Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ФАГОУСТОЙЧИВОСТИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ *LACTOCOCCUS LACTIS*

Summary. 12 strains of lactic acid bacteria were isolated from natural sources. Cultures were identified using classical microbiological and molecular-genetic (sequencing, based on analysis of nucleotide sequences of 16SrRNA genes) methods. Five cultures identified as *Lactococcus lactis* were selected, and the phage resistance of these strains was studied. It was found that all these strains are sensitive to the *Lactococcus lactis* specific bacteriophages. The *Lactococcus lactis* БИМ В-1366 strain is characterized by the highest phage resistance among isolated bacteriophage-sensitive lactococci, whereas *Lactococcus lactis* БИМ В-1365 is sensitive to the widest range of studied lactophages and can be used as an indicator culture for the detection of bacteriophages in the environment.

Аннотация. Из природных источников выделено 12 штаммов молочнокислых бактерий. Культуры идентифицированы с помощью классических микробиологических и молекулярно-генетических (секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей генов 16SrRNA) методов. Отобрано 5 культур, идентифицированных как *Lactococcus lactis*, изучена фагоустойчивость данных штаммов. Установлено, что все штаммы данного вида обладают чувствительностью к бактериофагам, активным в отношении бактерий *Lactococcus lactis*. Культура *Lactococcus lactis* БИМ В-1366 характеризуется наибольшей фагоустойчивостью среди выделенных чувствительных к бактериофагам культур лактококков. Штамм *Lactococcus lactis* БИМ В-1365 обладает чувствительностью к наиболее широкому спектру исследуемых лактофагов и может быть использован в качестве индикаторной культуры для обнаружения бактериофагов в окружающей среде.

Key words: *Lactic acid bacteria, Lactococcus lactis, molecular-genetic identification, bacteriophages, phage typing, phage resistance.*

Ключевые слова: *Молочнокислые бактерии, Lactococcus lactis, молекулярно-генетическая идентификация, бактериофаги, фаготипирование, фагоустойчивость.*

Введение. Молочнокислые бактерии представляют собой одну из наиболее распространенных в природе групп микроорганизмов, которые сбраживают углеводы с образованием молочной кислоты, и благодаря этому широко используются в процессе ферментации таких продуктов, как мясо, овощи, фрукты и молоко, а также при хлебопечении и в виноделии [1].

Штаммы бактерий *Lactococcus lactis* являются основным компонентом заквасок, используемых в

молочной промышленности, участвуя в процессах формирования аромата, цвета и консистенции ферментированных продуктов. Кроме того, в результате молочнокислого брожения происходит снижение pH, что тормозит развитие патогенных микроорганизмов и способствует длительному хранению конечного продукта. Однако бактериальные закваски, применяемые на молокоперерабатывающих предприятиях, являются благоприятной средой для развития вирулентных бактериофагов. В результате фаговой

инфекции происходит торможение или полное прекращение процесса ферментации молочного сырья, что приводит к снижению качества кисломолочных продуктов [2].

В настоящее время, с целью контроля фаговой инфекции на предприятиях молочной промышленности, выделено и охарактеризовано большое количество вирулентных и умеренных лактофагов, обитающих в окружающей среде [3,4,5,6]. Тем не менее, высокая генетическая изменчивость бактериофагов, их способность при репродукции «захватывать» часть генома клетки-хозяина и наличие определенного мутагенного фона приводят к накоплению на производстве высоковирулентных штаммов фагов с широким спектром литического действия. Вследствие этого, заквасочные культуры, характеризовавшиеся устойчивостью к определенному набору фагов с течением времени становятся чувствительными к данным вирусам. В связи с этим, ведется непрерывная работа по обновлению и расширению коллекции молочнокислых бактерий, устойчивых к бактериофаговой инфекции. При создании таких коллекций необходимо, чтобы отобранные штаммы были чувствительны к наименьшему числу фагов из разных литических групп и принадлежали к различным группам штаммов, чувствительным к одним и тем же бактериофагам [7]. Для получения и оценки фагоустойчивости культур требуется использование набора фагов разных литических групп с определенными свойствами. С целью обнаружения таких лактофагов создаются коллекции индикаторных культур лактококков, чувствительных к широкому спектру бактериофагов. В целом, выделение и идентификация фагочувствительных культур бактерий *Lactococcus lactis* способствует обнаружению новых штаммов бактериофагов на предприятиях молочной промышленности, а также в окружающей среде, что позволяет изучать механизмы взаимодействия и устойчивости бактерий к фаговой инфекции и, как следствие, совершенствовать методы борьбы с ними.

В связи с этим **целью исследования** явилось выделение молочнокислых бактерий из различных природных источников, определение видовой принадлежности полученных культур классическими микробиологическими и молекулярно-генетическими методами, а также изучение фагоустойчивости бактерий, идентифицированных как *Lactococcus lactis*.

Объектами исследования являлись 12 штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из пищевых продуктов домашнего производства. Бактериальные культуры выращивали при 30 °С в течение 24 ч в жидкой и агаризованной среде МРС (Conda).

Материалы и методы. Для выделения бактерий 5 г исследуемого материала, измельчали и смешивали со стерильным физиологическим раствором, после чего делали ряд десятикратных разведений. Бактериальную суспензию (100 мкл) из

разведений 10^{-3} – 10^{-7} высевали на агаризованную питательную среду МРС и культивировали при 30°С в течение 24 – 48 ч. Изолированные колонии рассеивали до получения монокультур (не менее трех пассажей). Чистоту культуры контролировали визуально и микроскопически.

Морфологию клеток изучали методом световой микроскопии препаратов, окрашенных по методу Грама [8], используя микроскоп Nikon Eclipse (Nikon), при увеличении 1×1000 . Продукцию каталазы, исследовали по общепринятой методике [8]. Для определения продукции оксидазы и пирролидонилариламидазы использовали наборы OXItest и PYRAtest (Erba Lachema) согласно прилагаемой инструкции. Способность к ферментации различных углеводов и спиртов исследовали с помощью наборов Anaero-test и Encoccus-test (Erba Lachema) в соответствии с инструкцией производителя.

При фаготипировании бактерий 0,5 мл исследуемой бактериальной культуры, находящейся в логарифмической стадии роста добавляли к 3 мл 0,6% мягкого агара, аккуратно перемешивали и выливали в чашку с плотной питательной средой. Чашки подсушивали и наносили по 5 мкл исследуемого бактериофага, предварительно сделав прокол верхнего слоя агара. Культуры инкубировали в термостате при 30°С в течение суток. Бактериофаги добавляли в критическом тест-разведении, т. е. в наибольшем разведении, при котором наблюдался сплошной лизис бактерии-хозяина [9]. В исследовании использовали 13 штаммов бактериофагов из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов: *Lactococcus phage* БИМ BV-33, BV-36, BV-37, BV-40, BV-41, BV-42, BV-43 (бактерия-хозяин *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* БИМ В-424), BV-34, BV-35, BV-38, BV-39 (бактерия-хозяин *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* БИМ В-425), BV-77 (бактерия-хозяин *Lactococcus lactis* БИМ В-1024), BV-78, (бактерия-хозяин *Lactococcus lactis* БИМ В-1029); а также 5 штаммов бактериофагов, выделенных нами из природных источников – Lc-1 (БИМ BV-95), Lc-2, Lc-3, Lc-4 (БИМ BV-96), Lc-5 (бактерия-хозяин *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* БИМ В-493).

Хромосомную ДНК культур выделяли с помощью коммерческого набора Bacteria DNA Preparation Kit (Jena Bioscience) согласно прилагаемой инструкции. Для амплификации нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК использовали универсальные зубактериальные праймеры 8f (5'-agagtttgatcctggctcag-3') и 1492r (5'-ggttacctgttagcactt-3'). Температурно-временной профиль составлял 95°С – 5 мин (1 цикл); 95°С – 20 сек, 55°С – 20 сек, 72°С – 90 сек (30 циклов); 72°С – 5 мин (1 цикл). Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1 % агарозном геле с использованием 1X ТАЕ-буфера при напряженности электрического поля – 5 В/см. Визуализацию ДНК осуществляли с помощью окрашивания раствором бромистого этидия (0,05

мкг/мл). В качестве стандартов для определения размера продуктов ПЦР применяли маркер молекулярной массы фрагментов Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). Для очистки амплифицированных фрагментов гена 16S рНК использовали коммерческий набор PCR Purification Kit (Jena Bioscience).

Реакцию секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рНК проводили на автоматическом секвенаторе AE3000 с использованием набора реагентов для секвенирования DNA Cycle Sequencing Kit (Jena Bioscience) согласно прилагаемой инструкции. Разделение и анализ продуктов секвенирования осуществляли с помощью анализатора Li-COR 4300 DNA Analyzer (США). Компьютерную обработку результатов секвенирования и редактирование последовательностей осуществляли с помощью программы eSeq. Сравнительный анализ гомологии секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рНК и референтных последовательностей проводили on-line с использованием баз данных GenBank и Ribosomal Database Project (RDP).

При оценке степени чувствительности бактерий *Lactococcus lactis* к фаговой инфекции была изучена эффективность бляшкообразования (ЕОР) и определен процент адсорбированных частиц бактериальных вирусов. Исследуемые бактерии, находящиеся в логарифмической стадии роста заражали соответствующим бактериофагом и определяли количество бляшкообразующих единиц (БОЕ/мл) методом агаровых слоев (метод Грация) [10,11]. Контролем служили титры фагов, лизировавших бактерио-хозяина. Показатель ЕОР рассчитывали путем отношения количества бляшкообразующих единиц на газоне исследуемой культуры к количеству БОЕ фага на газоне бактерии-хозяина [12]. Фаговую адсорбцию определяли путем смешивания экспоненциально растущих культур бактерий с суспензиями фагов при множественности инфекции 0,01-0,001. После 10 мин инкубации при 30 °С образцы центрифугировали и определяли титр фагов супернатанта на газоне бактерии-хозяина методом агаровых слоев. Процент адсорбции определяли следующим образом:

$$\left(1 - \left(\frac{\text{Титр фагов после адсорбции}}{\text{Титр лизата без клеток}}\right)\right) \times 100 \text{ [13].}$$

Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Статистический анализ результатов

осуществляли, используя пакет программ Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение.

Физиолого-биохимические свойства. Из образцов молока и кисломолочных продуктов домашнего производства, а также квашеных овощей выделено 12 штаммов, предположительно относящихся к группе молочнокислых бактерий: из квашеной капусты выделено 2 изолята (КБ, К95); из соленых огурцов – изолят О2; из творога домашнего – 3 изолята (ТТ1, ТТ2, Т2-2); из молока – 2 изолята (ММ3, МБ); из сливок – изолят СП; из молочной сыворотки – изолят ЕИ1; из сыра адыгейского – 2 изолята (СА1, СА2). Установлено, что одиннадцать культур являлись грамположительными, каталазо- и оксидазоотрицательными кокками, клетки которых располагаются одиночно, попарно, либо в коротких цепочках, что характерно для представителей группы молочнокислых бактерий. Изолят О2 представлял собой грамположительные каталазо- и оксидазоотрицательные палочки, располагающиеся одиночно или в группах, что свидетельствует о наиболее вероятной принадлежности бактерий к роду *Lactobacillus*. На поверхности твердой среды бактерии образовывали мелкие (1-2 мм), круглые, выпуклые, блестящие колонии с ровным краем, гладкой поверхностью, белого или кремово-белого цвета.

Исследование диапазона температур роста выделенных культур показало, что оптимум роста бактерий составляет 30°C – 37 °С. При этом, семь культур способны расти при 10 °С, девять культур – при 40 °С. При культивировании бактерий при 45 °С наблюдался рост штаммов МБ, КБ и К95. Установлено, что семь изолятов способны расти в кислой среде при рН 4,5, а 3 штамма в щелочной среде – при рН 9,6. Способность бактерий к росту в присутствии 4% NaCl выявлена у всех анализируемых культур, кроме изолята ММ3; тогда, как изоляты МБ, КБ и К95 способны расти при 6,5% NaCl (табл 1).

На основании отсутствия способности расти при 45 °С и добавления в среду 6,5% NaCl к родам *Lactococcus*, *Pediococcus* и *Leuconostoc* отнесено 8 исследуемых изолятов (СП, ТТ1, ТТ2, ЕИ1, Т2-2, СА1, СА2, ММ3). Штаммы МБ, КБ и К95 характеризовались наличием пирролидонилариламидазной активности, а также были способны расти при 45 °С и в присутствии 6,5% NaCl, что позволило отнести данные бактерии к роду *Enterococcus*.

РОСТ ИЗОЛЯТОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ РАЗНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ, ЗНАЧЕНИЯХ pH И КОНЦЕНТРАЦИЯХ NaCl

Изолят	Температура, °C					Значение pH среды		Концентрация NaCl, %	
	10 °C	30 °C	37 °C	40 °C	45 °C	pH 4,5	pH 9,6	4% NaCl	6,5% NaCl
СП	+	+	+	+/-	-	+	-	+	-
МБ	-	+	+	+	+	-	+	+	+
КБ	-	+	+	+	+	-	+	+	+
К95	-	+	+	+	+	-	+	+	+
ТТ1	+	+	+	+	-	-	-	+	-
ТТ2	-	+	+	+/-	-	+	-	+	-
О2	-	+	+	+	-	+	-	+	-
ЕИ1	+	+	+	+	-	+	-	+	-
Т2-2	+	+	+	-	-	+/-	-	+	-
СА1	+	+	+	+	-	+	-	+	-
СА2	+	+	+	-	-	+	-	+	-
ММ3	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-

Условные обозначения: «+» – наличие роста; «-» – отсутствие роста; «+/-» – слабый рост

При исследовании способности выделенных культур к ферментации углеводов и спиртов установлено, что все изоляты сбраживали глюкозу, сахарозу, трегалозу, лактозу, маннозу, галактозу, фруктозу, салицин и мальтозу. Максимальным спектром ферментативной активности обладал изолят О2. Способность к сбраживанию аргинина и маннозы и неспособность ферментировать сорбитол, раффинозу и мелибиозу является типичным свойством для представителей рода *Lactococcus*, в то время как отсутствие способности сбраживать аргинин характерно для представителей рода *Leuconostoc*. Полученные данные позволили отнести культуры СА1, СА2, ТТ1, ТТ2, ЕИ1 и Т2-2 к роду *Lactococcus*, а изоляты СП и ММ3 - к роду *Leuconostoc* (табл 2). Необходимо отметить, что особенностью бактерий *Enterococcus* является существование групп видов

в пределах данного рода. Члены таких групп проявляют сходные фенотипические характеристики, что затрудняет осуществление видовой идентификации [14]. На основании физиолого-биохимических признаков изоляты МБ, КБ и К95 отнесены к группе видов *Enterococcus faecium*, которая включает в себя такие виды, как *Enterococcus durans*, *Enterococcus canis*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus ratti* и *Enterococcus villorum*. Наиболее вероятным является принадлежность данных изолятов к видам *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae* или *Enterococcus faecium*. В связи с этим, на следующих этапах наших исследований для установления точной видовой принадлежности штаммов использовали фаготипирование и молекулярно-генетические методы идентификации.

**СПЕКТР УГЛЕВОДОВ И СПИРТОВ, ФЕРМЕНТИРУЕМЫХ ИЗОЛЯТАМИ
МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

Углевод/спирт	Изоляты											
	СП	МБ	КБ	O2	ТТ1	ТТ2	ЕИ1	T2-2	K95	CA1	CA2	ММ3
Глюкоза	+*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Лактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Маннитол	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Раффиноза	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+
Арабиноза	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Фруктоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Мальтоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Мелибиоза	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Сахароза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Трегалоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ксилоза	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Рамноза	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Мелецитоза	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+/-
Сорбитол	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Целлобиоза	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Аргинин	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Сорбоза	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Манноза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Галактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Салицин	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*Условные обозначения: «+» – положительная реакция; «-» – отрицательная реакция; «+/-» – слабо-положительная реакция

Фаготипирование. Бактериофаги используются в целом ряде различных методик определения и дифференциации бактериальных штаммов, поскольку рецепторы клеточных стенок, которые могут значительно различаться по химической структуре у разных видов и штаммов являются ключевыми факторами, определяющими специфическое взаимодействие фагов с бактериями-хозяевами [15, 16]. Фаготипирование является одним из первых методов практического применения бактериальных вирусов, где набор фагов используется для того, чтобы по их способности лизировать исследуемые культуры и образовывать на поверхности бактериального газона негативные колонии, различать роды и виды (а также штаммы одного вида) бактерий. Благодаря простоте применения данный метод в настоящее время остается в числе самых широко используемых способов дифференциации многих бактерий [17]. Результаты фаготипирования выделенных культур показали, что изоляты СП, МБ, КБ, K95, CA2 и ММ3 являются устойчивыми к воздействию всех используемых лактофагов. Культуры CA1, T2-2, ТТ1 и ТТ2 были чувствительны к бактериофагам *Lactococcus lactis subsp. lactis* БИМ В-425. Штамм ЕИ1 проявлял чувствительность к фагам, активным в отношении штаммов бактерий *Lactococcus lactis subsp. lactis* БИМ В-425, *Lactococcus lactis subsp. lactis* БИМ В-493 и *Lactococcus lactis subsp. cremoris* БИМ В-424. Полученные данные позволили отнести 5 культур

(CA1, T2-2, ТТ1, ТТ2, ЕИ1) к виду *Lactococcus lactis*.

На основании изучения морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств выделенных культур молочнокислых бактерий в соответствии с определителем Bergey, а также в результате фаготипирования бактерий, 3 изолята отнесены к роду *Enterococcus* (МБ, КБ и K95 – *Enterococcus sp.*), изолят O2 – к роду *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum*), 6 изолятов – к роду *Lactococcus* (CA2 – *Lactococcus sp.*; CA1, ЕИ1, T2-2, ТТ1, ТТ2, – *Lactococcus lactis*), 2 изолята – к роду *Leuconostoc* (ММ3 – *Leuconostoc citreum*, СП – *Leuconostoc mesenteroides*).

Молекулярно-генетическая идентификация. Идентификация бактериальных культур только на основании морфологических и физиолого-биохимических признаков в настоящее время является недостаточной, так как многие виды молочнокислых бактерий обладают высоким уровнем фенотипической изменчивости под воздействием различных факторов [18]. Кроме того, штаммы одного и того же вида, выделенные из различных источников могут обладать различными биохимическими характеристиками. В связи с этим, для подтверждения родовой и видовой принадлежности изолятов, проведен анализ нуклеотидной последовательности генов 16S рРНК 12 исследуемых культур. В результате амплификации с универсальными эубактериальными праймерами 8f и 1492g на матрице геномной ДНК штаммов получены ПЦР-

продукты размером ~1500 п.н., что соответствует полной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. С помощью секвенирования определены нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов генов 16S рРНК бактерий, проведен их сравнительный анализ с референтными нуклеотидными последовательностями из баз данных GenBank и Ribosomal Database Project (RDP). Установлен высокий (99–99,9%) уровень гомологии нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК с референтными последовательностями штаммов соответствующих видов. Исследуемые культуры отнесены к царству *Bacteria*, отделу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, порядку *Lactobacillales*; семействам *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*

и *Leuconostocaceae*; родам *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, а также *Leuconostoc*. По результатам проведенного анализа секвенсов переменных участков генов, кодирующих 16S рРНК, подтверждена принадлежность 6 штаммов к видам, идентифицированным на основании морфологических и физиолого-биохимических методов. Культура *Lactobacillus plantarum* (O2) реидентифицирована как *Lactobacillus paraplantarum*, а *Leuconostoc citreum* (MM3) – как *Lactococcus raffinolactis*. Штамм *Lactococcus* sp. (CA2) отнесен к виду *Lactococcus chungangensis*, а штамм *Enterococcus* sp. (K95) – к виду *Enterococcus durans*. Полученные данные представлены в таблице 3.

Таблица 3

РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР

Изолят	Сходство с референтными последовательностями (по GenBank)	Сходство с референтными последовательностями (по Ribosomal Database Project (RDP))	Результаты секвенирования	Регистрационный номер в коллекции (БИМ)
СП	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (99,01%)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (99,1%)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	БИМ В-1399
МБ	<i>Enterococcus faecium</i> (99,52%)	<i>Enterococcus durans</i> (99,7%) <i>Enterococcus hirae</i> (99,7%) <i>Enterococcus ratti</i> (99,7%)	<i>Enterococcus</i> sp.	БИМ В-1397
КБ	<i>Enterococcus durans</i> (99,67%)	<i>Enterococcus durans</i> (99,3%) <i>Enterococcus hirae</i> (99,3%) <i>Enterococcus ratti</i> (99,3%)	<i>Enterococcus</i> sp.	БИМ В-1396
К95	<i>Enterococcus faecium</i> (99,58%) <i>Enterococcus durans</i> (99,58%)	<i>Enterococcus durans</i> (99,3%)	<i>Enterococcus durans</i>	БИМ В-1398
ТТ1	<i>Lactococcus lactis</i> (99,36 %)	<i>Lactococcus lactis</i> (99,5 %)	<i>Lactococcus lactis</i>	БИМ В-1364
ТТ2	<i>Lactococcus lactis</i> (99,72 %)	<i>Lactococcus lactis</i> (99,7 %)	<i>Lactococcus lactis</i>	БИМ В-795
O2	<i>Lactobacillus plantarum</i> (99,44%) <i>Lactobacillus paraplantarum</i> (99,44%)	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> (99,4%)	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	БИМ В-1400
ЕИ1	<i>Lactococcus lactis</i> (99,76 %)	<i>Lactococcus lactis</i> (99,7 %)	<i>Lactococcus lactis</i>	БИМ В-1365
Т2-2	<i>Lactococcus lactis</i> (99,76 %)	<i>Lactococcus lactis</i> (99,6%)	<i>Lactococcus lactis</i>	БИМ В-1366
СА1	<i>Lactococcus lactis</i> (99,6 %)	<i>Lactococcus lactis</i> (99,7%)	<i>Lactococcus lactis</i>	БИМ В-794
СА2	<i>Lactococcus chungangensis</i> (99,84%)	<i>Lactococcus chungangensis</i> (99,8%)	<i>Lactococcus chungangensis</i>	БИМ В-1369
ММ3	<i>Lactococcus raffinolactis</i> (99,87%)	<i>Lactococcus raffinolactis</i> (99,9%)	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	БИМ В-1368

Согласно литературным данным, метод анализа нуклеотидной последовательности генов 16S рРНК в большинстве случаев используется для идентификации рода и группы видов энтерококков, так как сходство последовательностей гена 16S рРНК между видами может достигать 99,8% (для *Enterococcus faecium* и *Enterococcus durans* – 99,7%) [14]. Поскольку нуклеотидные последовательности

штаммов МБ и КБ максимально сходны с последовательностью гена 16S представителей нескольких видов бактерий *Enterococcus*, целесообразно использование дополнительных молекулярно-генетических методов (таких как ДНК-ДНК гибридизация, анализ цельноклеточных белковых профилей, полученных с помощью SDS-PAGE, групп-специфическая ПЦР и др.) для

установления точной видовой принадлежности изолятов МБ и КБ [14]. Штаммы выделенных молочнокислых бактерий депонированы по форме «Гарантийное хранение» в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов.

Фагоустойчивость. На следующем этапе работы исследовали фагоустойчивость 5 штаммов бактерий, отнесенных к виду *Lactococcus lactis*. При фаготипировании установлено, что все выделенные штаммы *L. lactis* чувствительны к бактериофаговой инфекции. Отобраны 10 бактериофагов, способных лизировать культуры СА1, Т2-2, ТТ1, ТТ2 и ЕИ1 и изучена эффективность бляшкообразования (ЕОР) данных вирусов на газоне бактериальных культур. В результате исследований установлено, что штамм Т2-2 характеризуется наибольшей фагоустойчивостью среди выделенных фагочувствительных культур *L. lactis*. Способность лизировать данную культуру обнаружена лишь у 3 из 18 испытуемых бактериальных вирусов. Штаммы СА1, ТТ1 и ТТ2 характеризовались чувствительностью к 4 из 18 фагов, однако эффективность бляшкообразования бактериофагов,

лизирующих культуру ТТ2 была значительно снижена и составляла 0,001-0,003, хотя вирусы были способны образовывать характерные прозрачные негативные колонии. Наибольшей чувствительностью к лактофагам обладал штамм ЕИ1. Способность лизировать данные бактерии отмечена у 10 из 18 фагов, используемых в данном исследовании. Бактериофаги, лизирующие культуру ЕИ1 можно разделить на 3 группы: с высоким (0,9-0,95 для фагов BV-34, BV-35 и BV-39), средним (0,04-0,06 для фагов BV-33, BV-38 и BV-40) и низким (0,002-0,008 для фагов BV-36, BV-41, Lc-1 и Lc-4) значением ЕОР (табл. 4). В целом, вирусы бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* БИМ В-425 обладали более широким спектром литической активности, по отношению к испытуемым бактериальным культурам в сравнении с фагами *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* БИМ В-424 и фагами *Lactococcus lactis* БИМ В-493, *Lactococcus lactis* БИМ В-1024 и *Lactococcus lactis* БИМ В-1029. Наиболее высокой активностью в отношении исследуемых культур обладал бактериофаг *Lactococcus phage* БИМ BV-35 (показатель ЕОР составлял 0,22-1,05).

Таблица 4

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ШТАММОВ *LACTOCOCCUS LACTIS* К БАКТЕРИОФАГАМ

Штамм бактериофага (БИМ)	Эффективность бляшкообразования (ЕОР)					
	контроль	Культура бактерий				
		ТТ1	ТТ2	Т2-2	ЕИ1	СА1
BV-33	1.00 ± 0.00	0	0	0	0.05 ± 0.22	0
BV-34	1.00 ± 0.00	0.65 ± 0.08	0.001 ± 0.00	0.04 ± 0.37	0.89 ± 0.3	0.69 ± 0.08
BV-35	1.00 ± 0.00	0.78 ± 0.05	0.032 ± 0.05	0.22 ± 0.24	0.95 ± 0.23	1.05 ± 0.11
BV-36	1.00 ± 0.00	0	0	0	0.002 ± 0.18	0
BV-38	1.00 ± 0.00	0.02 ± 0.04	0.001 ± 0.25	0	0.041 ± 0.09	0.15 ± 0.03
BV-39	1.00 ± 0.00	0.83 ± 0.12	0.001 ± 0.08	0.08 ± 0.09	0.9 ± 0.15	0.98 ± 0.17
BV-40	1.00 ± 0.00	0	0	0	0.062 ± 0.11	0
BV-41	1.00 ± 0.00	0	0	0	0.003 ± 0.04	0
BV-95	1.00 ± 0.00	0	0	0	(6,51 ± 0,16) × 10 ⁻³	0
BV-96	1.00 ± 0.00	0	0	0	(8,33 ± 0,01) × 10 ⁻⁴	0

Для более полного понимания механизмов устойчивости бактерий к фаговой инфекции исследовали процент адсорбции на бактериальных клетках тех вирусных частиц, чья эффективность образования негативных колоний была минимальной. Результаты исследований показали, что фаги BV-34, BV-38 и BV-39, лизирующие культуру ТТ2, а также фаги BV-36, BV-41, Lc-1 и Lc-4, лизирующие бактерии ЕИ1 характеризуются низким уровнем адсорбции по отношению к контрольным значениям. Процент

адсорбированных частиц составлял 34-59%, что на 33-64% ниже по сравнению с контролем. Таким образом, низкие значения ЕОР данных фагов связаны с низкой адсорбцией на бактериальных клетках, что может быть обусловлено ограниченным количеством рецепторов фага либо их доступностью для фаговых частиц на поверхности клетки.

Заключение. Из природных источников выделено 12 штаммов молочнокислых бактерий. Культуры идентифицированы с помощью

классических микробиологических методов, а также секвенирования на основе анализа нуклеотидных последовательностей генов 16SrRNA. В результате секвенирования 1 изолят отнесен к роду *Leuconostoc*, 1 изолят – к роду *Lactobacillus*, 3 изолята – к роду *Enterococcus* и 7 изолятов – к роду *Lactococcus*. С целью исследования устойчивости бактерий к лактофагам, отобраны 5 культур, идентифицированных как *Lactococcus lactis*. Результаты исследований показали, что все выделенные штаммы *L. lactis* обладают чувствительностью к бактериофаговой инфекции. Культура T2-2 является полностью устойчивой к фагам *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* БИМ В-424, а также к фагам *Lactococcus lactis* БИМ В-493, *Lactococcus lactis* БИМ В-1024 и *Lactococcus lactis* БИМ В-1029. Установлено, что снижение эффективности образования негативных колоний отдельных фагов связано с низким уровнем адсорбции вирусных частиц на бактериальных клетках. Штамм бактерий ЕИ1 обладает чувствительностью к наиболее широкому спектру исследуемых лактофагов и может быть использован в качестве индикаторной культуры для обнаружения бактериофагов в окружающей среде. Полученные результаты будут способствовать дальнейшей изоляции лактофагов из природных источников и расширению коллекции бактериальных вирусов, а также всестороннему изучению их физиологических и генетических свойств, необходимых для контроля фаговой инфекции на производствах молочной промышленности Республики Беларусь.

Список литературы:

1. Светлакова, Е.В. Использование молочнокислых бактерий в биотехнологических процессах / Е.В. Светлакова, Н.А. Ожередова, М.Н. Веревкина, А.Н. Кононов // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. – С. 559.
2. Atamer, Z. Review: elimination of bacteriophages in whey and whey products / Z. Atamer, M. Samtlebe, H. Neve, K.J. Heller, J. Hinrichs // Front Microbiol. – 2013. – Vol. 4. – P. 191.
3. Deveau, H. Biodiversity and classification of lactococcal phages. / H. Deveau, S.J. Labrie, M.C. Chopin, S. Moineau // Appl Environ Microbiol. – 2006. – Vol. 72, № 6. – P. 4338–4346.
4. Szczepańska, A.K. Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in Polish dairy environment / A.K. Szczepańska, M.S. Hejnowicz, P. Kołakowski, J. Bardowski // Acta Biochim Pol. – gv 2007. – Vol. 54, № 1. – P. 151-158.
5. Oliveira, J. Biodiversity of bacteriophages infecting *Lactococcus lactis* starter cultures / O. Joana, J. Mahony, L. Hanemaaijer, T. R.H.M. Kouwen, D. van Sinderen // Journal of Dairy Science – 2018. – Vol. 101, Iss. 1. – P. 96 – 105.
6. Spinelli, S. Cryo-electron microscopy structure of Lactococcal siphophage 1358 virion // S.

Spinelli, S. Bebeacua, I. Orlov, D. Tremblay, B. P. Klaholz, S. Moineau, C. Cambillau // J Virol. – 2014. – Vol. 88, № 16. – P. 8900–8910.

7. Одегов, Н.И. Изучение разнообразия ассоциаций фагов гомологичных молочнокислым бактериям / Н.И. Одегов, Р.В. Дорофеев, А.Н. Иркитова, И.А. Функ, Т.Н. Орлова, А.В. Мацора // Биол. вестник Б. Хмельницкого Мелитопольского гос. Пед. университета. – 2017. – Т. 7. – С. 197-206.

8. Нетрусов, А.И. .А. Егорова, Л.М. Захарчук. Практикум по микробиологии / Москва: Академия. 2005 – 608 с.

9. Paul-Satyaseela, M. Comparison of Capsular Typing of *Staphylococcus aureus* with Bacteriophage Typing: A Study in Gulbarga, India / M. Paul-Satyaseela, C.T. Shivannavar, S.M. Gaddad // Indian J Microbiol. – 2011. – Vol. 51, № 3. – P. 359-362.

10. Lavelle, K. Biodiversity of *Streptococcus thermophilus* Phages in Global Dairy Fermentations / K. Lavelle, I. Martinez, H. Neve, G. A. Lugli, C. M. A. P. Franz, M. Ventura, F. dal Bello, D. van Sinderen, J. Mahony // Viruses. – 2018. – Vol. 10, № 10. – P. 577.

11. Lillehaug, D. An improved plaque assay for poor plaque-producing temperate lactococcal bacteriophages / D. Lillehaug // J. Appl. Microbiol. – 1997. – Vol. 83. – P. 85-90.

12. Briggiler, M. M. Characterization of two virulent phages of *Lactobacillus plantarum* / M.M. Briggiler, J.E. Garneau, D. Tremblay, A. Quiberoni, S. Moineau // Appl Environ Microbiol. – 2012. – Vol. 78 № 24. – P. 8719-8734.

13. Roces, C. Isolation of *Lactococcus lactis* mutants simultaneously resistant to the cell wall-active bacteriocin Lcn972, lysozyme, nisin, and bacteriophage c2 / C. Roces, P. Courtin, S. Kulakauskas, A. Rodríguez, M.P. Chapot-Chartier, B. Martínez // Appl Environ Microbiol. – 2012. – Vol. 78, № 12. – P. 4157–4163.

14. Bergey's manual of Systematic Bacteriology: in 5 vol. / eds.: P. De Vos [et al.]. – Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 2009. – Vol.3. – 1422 p.

15. Chapot-Chartier, M.P. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria / M.P. Chapot-Chartier, S. Kulakauskas // Microb Cell Fact. – 2014. – Vol. 13, Suppl 1:S9.

16. Летаров, А.В. Адсорбция бактериофагов на клетках бактерий / А.В. Летаров, Е.Е. Куликов // Успехи биологической химии – 2017. – Т. 57. – С. 153-208.

17. Каттер, Э. Бактериофаги: биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе; науч. ред. А.В. Летаров. – М.: Научный мир, 2012. – 640 с.

18. Шурхно, Р.А. Скрининг природных штаммов молочнокислых бактерий и их таксономическая идентификация / Шурхно Р.А., Вологин С.Г., Гибадуллина Ф.С., Тагиров М.Ш // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2, Ч. 1. – С. 578.