

УДК 578.81:578.282:578.323 (045.31)

*Н.Н. Фурик¹, Д.П. Бажанов², К.К. Яцевич², Е.А. Касперович¹,
С.Л. Василенко¹, Г.В. Машиковская²*

¹РУП «Институт мясо-молочной промышленности»

²ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФАГОВ ЛАКТОКОККОВ ВИДА С2 ДЛЯ РАЗРАБОТКИ МЕТОДА ИХ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ

(Поступила в редакцию 14.04.2011)

Проведена характеристика 8 фагов вида с2 по устойчивости к физическим, химическим факторам и спектру литической активности. Установлено, что диапазон изменчивости фенотипических свойств фагов вида с2 очень широк, что определяет необходимость их типирования с использованием молекулярно-генетических методов. Показано, что внутривидовая дифференциация фагов с2 возможна с помощью ПДРФ-анализа участка гена тсr, амплифицируемого при использовании видоспецифичных праймеров.

В современных экономических условиях проблема получения гарантированно высококачественной продукции является центральной на любом молокоперерабатывающем предприятии. Для ее решения необходим системный подход к организации и контролю всех этапов производства, включая контроль его санитарно-гигиенического состояния, основного и вспомогательного сырья, технологического процесса и готовой продукции [1–3]. В этой связи требуется разработка комплекса мероприятий, направленных на предотвращение фаголизиса заквасочной микрофлоры как на молокоперерабатывающих предприятиях, так и на предприятиях – изготовителях бактериальных заквасок и концентратов для молочной промышленности [4–6]. Обширная и постоянно пополняющаяся информация в этой области свидетельствует о том, что проблема фаголизиса в молокоперерабатывающей отрасли достаточно остра и обусловлена особенностями биотехнологического процесса [3, 7–9]. Производство кисломолочных продуктов и сыров основано на внесении в пастеризованное молоко заквасок, содержащих чистые культуры молочнокислых бактерий, непосредственно сквашивающих молоко. Но во время этого биотехнологического процесса возникает угроза разрушения клеток молочнокислых бактерий вирусами – фагами, что приводит к

торможению или полной остановке сквашивания. В результате качество производимых продуктов резко ухудшается [10–13].

Бактериофаги широко распространены в природе, а мезофильные лактококки и другая технически важная микрофлора молока являются для них естественной экологической нишей [13]. Фаги попадают в молоко сразу же после доения – после окончания бактерицидной фазы молока, при поступлении его на молочные заводы они часто содержатся уже в значительном количестве: 10^6 и более фаговых частиц в 1 мл сырого молока [11, 13].

Особенностью фаговой инфекции является то, что она может протекать скрыто и достаточно долго персистировать на предприятии, оставаясь не выявленной. Умеренное заражение заквасочных культур фагом может пройти для сквашивания молока незаметно. Однако при длительном применении отдельных партий бактериальных заквасок и концентратов вирулентность фага может одновременно резко повыситься, что приводит к вспышкам фаголизиса на внешне достаточно благополучных предприятиях [13]. Так как молочнокислые бактерии вида *Lactococcus lactis* чаще всего используются при производстве различных групп молочных продуктов (сметаны, творога, сыров), то на молочных комбинатах именно лактофаги распространены в наибольшей степени [11, 13]. При этом на каждом отдельном предприятии выделяются фаги определенных видов, групп и форм, различающихся по вирулентности и спектру литической активности. Высоковирулентные фаги, как правило, имеют широкий спектр литической активности [13]. При этом опасность фаголизиса выше на крупных предприятиях, что обусловлено большими объемами переработки молока, получаемого из многих источников, а чем их больше, тем выше опасность инфицирования различными фагами. Все это создает уникальные условия для их изменчивости, в результате чего появляются новые формы фагов [11, 13].

Исследования, проведенные в 70-е годы XX века, показали, что выделенные фаги не обладали высокой вирулентностью и широким спектром литической активности. Они в основном относились к моновалентным, т.е. лизировали один вид заквасочных микроорганизмов. Реже выделяли поливалентные бактериофаги, которые одновременно могли поражать несколько видов мезофильных лактококков [13]. Научные дан-

ные, полученные в 80–90-е годы, свидетельствуют уже о том, что большинство выделенных бактериофагов при производстве творога, сметаны, сыра, особенно на крупных комбинатах, относились к поливалентным, при этом бактериофаги, выделенные на одном предприятии из одного источника, могли иметь разный спектр литического действия. Это подтверждает, что инфицирование молока бактериофагами может происходить на любой стадии – и сразу после доения, и во время сбора, транспортировки молока, и непосредственно на самом молокоперерабатывающем предприятии. Изменение спектра литического действия фагов лактококков можно объяснить высоким уровнем изменчивости самих фагов, то есть мутабельностью, а также различными механизмами защиты клеток бактерий от фаголизиса [13].

В настоящее время известно более 700 фагов лактококков. Традиционно их систематизировали морфологически электронным микроскопированием. Все из огромного количества известных фагов молочнокислых лактококков относятся к порядку *Caudovirales*, который является чрезвычайно обширным и разнородным как генетически, так и морфологически. Он включает в себя три семейства: *Myoviridae*, *Siphoviridae* и *Podoviridae*. Большинство фагов молочнокислых лактококков принадлежат к семейству *Siphoviridae*, лишь некоторые – к *Podoviridae* [14]. С применением молекулярно-генетических методов (ДНК-ДНК-гибридизации, секвенирования генома) установлено, что фаги *L. lactis* подразделяются на 10 различающихся групп [15]. В результате исследований, проведенных на территории США и Канады, было установлено, что подавляющее количество промышленно значимых фагов относятся к трем основным видам семейства *Siphoviridae*: 936, с2 и P335 [16, 17]. По данным коллег из Белорусского государственного технологического университета, на территории Республики Беларусь распространены фаги видов с2 и 936, а также вида P034 семейства *Podoviridae* [18]. Судя по представленности этих видов в выборке для исследования, в молочнокислых продуктах, произведенных белорусскими заводами, наиболее распространен вид с2, а встречаемость фагов вида P034 сопоставима с встречаемостью фагов вида 936. Исследование фенотипических и генотипических характеристик фагов позволило выявить их очень широкую изменчивость [19]. В этой связи перспективно определение принадлеж-

ности фагов к наиболее значимым группам с помощью ПДРФ-анализа. Существует возможность мониторинга циркуляции лактофагов на молокоперерабатывающих производствах с применением новых молекулярно-генетических подходов.

Особый интерес для наших исследований представляют фаги вида *c2*, как наиболее распространенные на молокоперерабатывающих предприятиях Республики Беларусь [20]. Еще в 1988 г. Pillidge и Jarvis сообщили о построении рестрикционной карты фага *c2* [21]. В настоящее время проведено секвенирование и анализ структурных генов данного фага. Установлено, что размер генома фага *c2* составляет 22163 п.о. Идентифицировано 39 открытых рамок считывания, «ранний» и «поздний» промоторы, терминатор транскрипции. Составлена детальная транскрипционная карта фага *c2* [22, 23].

При анализе генома еще одного фага данной группы – bIL67 установлено, что его структура на 80% сходна со структурой фага *c2* [24]. Секвенирование геномов нескольких представителей фагов данной группы позволило выявить консервативные последовательности для каждой из них и подобрать праймеры, позволяющие проводить идентификацию вновь изолируемых фагов [25–27]. Метод ПДРФ-анализа позволит выявить различия внутри консервативной области геномов лактофагов вида *c2* и провести внутривидовую дифференциацию коллекционных и вновь выделенных лактофагов.

Цель работы – анализ фенотипических и генетических свойств фагов лактококков вида *c2* и определение возможности их типирования по этим свойствам.

Объектами исследования являлись 8 фагов лактококков вида *c2* разных групп – 56, 61, 77, 82, 83, 87, 90, 107 из коллекции бактериофагов молочнокислых бактерий РУП «Институт мясо-молочной промышленности». Лизаты бактериофагов получали на индикаторных культурах мезофильных лактококков: фага 56 – на культуре Cr 106, фага 61 – на культуре 32, фага 77 – на культуре 83, фагов 82 и 83 – на культуре 119у, фагов 90 и 107 – на культуре 606/1. Для определения литической активности данных фагов были использованы 32 индикаторных штамма *Lactococcus lactis subsp. lactis, cremoris, diacetylactis* – d193/2, 520/3, Cr106, 33, 119у, 75, 57/8, 81, 27у, 129у, 34, 84, 606/4, 616/8, 105/1, L224/1,

524/2, Т7/9, 24, 586/10, d43/1, L83/5, 575/5, 79, 21у, 91, 569/13, 509у, 32, 10у, 631/9, d43/1. Все используемые в работе культуры получены из Централизованной отраслевой коллекции промышленных штаммов молочнокислых бактерий РУП «Институт мясо-молочной промышленности».

Материалы и методы исследования. Для фенотипической характеристики выбранные фаги были протестированы по ранее разработанным методикам. Определены чувствительность фагов молочнокислых бактерий к действию физических (УФ-облучение и нагревание) и химических (цитрат натрия) факторов и спектр их литического действия на индикаторных культурах.

Для выявления чувствительности фагов лактококков вида с2 к УФ-облучению фаголизаты облучали на индикаторных культурах, выращенных в течение 16–20 ч в 0,6%-ном (верхний слой) и 1,5%-ном (в качестве нижнего слоя) гидролизате молока (ГО) в чашках Петри при температуре (30 ± 1) °С. Фаголизаты разводили физиологическим раствором до концентрации 10^6 частиц/мл. Разведенные фаголизаты в объеме 3 мл помещали на газон индикаторной культуры в чашке Петри и облучали при постоянном встряхивании. Источником УФ-излучения служила лампа БУВ-15б (мощность дозы $2,3$ эрг/мм²/с), облучение фага проводили под прямым углом на фиксированном расстоянии. Дозу облучения учитывали по времени воздействия. Чтобы избежать фотореактивации фагов, все манипуляции проводили в темноте или в желтом свете. Титр выживших фагов (БОЕ/мл) определяли по числу изолированных негативных колоний, образованных на газоне индикаторной культуры. Выживаемость бактериофагов определяли по формуле: отношение числа образовавшихся негативных колоний после воздействия УФ-облучения к исходному числу колоний:

$$W = \lg N / \lg N_0, \quad (1)$$

где W – выживаемость бактериофагов, %; N – титр фаговых частиц после облучения, N_0 – исходный титр фага.

Чувствительность фагов лактококков вида с2 к нагреванию определяли по степени денатурации фаговых частиц после термообработки. Для этого готовили очищенную суспензию каждого фага. Фаголизат подвергали двум циклам дифференциального центрифугирования –

8000 об/мин в течение 20 мин и 17000 об/мин в течение 90 мин. Осадок ресуспендировали в фосфатном буфере и центрифугировали при 8000 об/мин, затем добавляли трипсин в соотношении 1:10 и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Очищенную суспензию фага выдерживали при 72 °С в течение 15 и 60 мин на водяной бане, после чего исследовали изменение величины поглощения фаговых частиц на спектрофотометре SHIMADZU UV-2401 PC (Япония).

Граничную концентрацию цитрата натрия устанавливали методом «стекающей» капли. Готовили газоны индикаторных культур в 0,6%-ном (верхний слой) и 1,5%-ной (второй слой) среде ГО с добавлением цитрата натрия в концентрациях – от 0,1 до 1,2% в чашках Петри. Каплю исследуемого фаголизата наносили на газон чувствительной культуры и инкубировали 16–18 ч при (30±1) °С. Отмечали наличие или отсутствие лизиса, при этом устанавливали граничную концентрацию цитрата натрия для каждого фага.

Спектр литической активности фагов вида c2 установили на 32 тест-культурах методом «стекающей» капли. Готовили газоны чувствительных культур в 0,6%-ной (верхний слой) и 1,5%-ной (в качестве подложки) среде ГО в чашках Петри. Каплю фаголизата наносили на газон тест-культуры и инкубировали 16–18 ч при (30±1) °С. Отмечали наличие или отсутствие лизиса. Материалы исследования обрабатывали статистически с применением *t*-критерия Стьюдента.

*Молекулярно-генетические исследования заключались в подборе дифференцирующих рестриктаз для ПДРФ-анализа участка гена *тср**. Поиск дифференцирующих рестриктаз и моделирование ПДРФ-анализа консервативного участка гена *тср* (major capsid protein) осуществляли в программе Vector NTI 7.1. (InforMax, Inc).

Результаты и их обсуждение. При определении чувствительности фагов разных групп к УФ-облучению установлено, что их выживаемость при 5 и при 50-минутном воздействии повреждающего фактора достоверно отличалась и в среднем была в пределах 56,1±3,9% и 32,1±2,7% ($P<0,01$) соответственно. Выживаемость фага 107 была самой низкой и составила после 5 мин облучения 19,6%, а после 50 мин – 16,3%. Самой высокой выживаемостью после УФ-облучения отличался фаг 61 – после 5 мин облучения этот показатель был равен 74,7%, а после

50-минутного – 56,5%. Были выявлены различия и в степени изменения спектральных характеристик у исследуемых фагов молочнокислых бактерий после воздействия на них высокой температурой – 72 °С (как при пастеризации) в течение 15 и 60 мин. Микробиологические исследования подтвердили 100% инактивацию исследуемых фагов только после 60 мин нагревания. Самым высоким показателем оптической плотности был у фага 83 – 33,6%, а самым низким – у фага 90 – 3,1%.

Для адсорбции и репродукции многих фагов необходимым условием является наличие в среде ионов Ca^{+} , а добавление в систему фаг-бактерия цитрата натрия приводит к связыванию ионов Ca^{+} , в результате чего происходит остановка репродукции фага. Для каждого выбранного фага была установлена пограничная концентрация цитрата натрия. Самой высокой устойчивостью к данному химическому фактору отличался фаг 61, для него граничная концентрация цитрата натрия в питательной среде составила 1,2%, а самой низкой – фаг 87 (0,3%).

Показатель литической активности у исследуемых фагов также колебался в очень широких пределах. Самым поливалентным был фаг 90, он лизировал 27–84,4% используемых индикаторных культур. Только две тест-культуры были чувствительны к фагу 77, показатель литической активности которого составил 3,1%.

По совокупной устойчивости к действию физических и химических факторов можно выделить фаг 61, который также обладал широким спектром литической активности – 53,1%. Однако в отношении остальных фагов корреляционные связи между устойчивостью к физическим, химическим факторам и спектром литической активности не выявлены.

Результаты исследований представлены в табл. 1.

Как видно из полученных данных, диапазон фенотипических свойств фагов вида *s2* очень широк, поэтому представляло интерес исследование возможности генетического типирования фагов вида *s2* для отбора типовых представителей данной группы фагов по совокупности фенотипических и генетических свойств. В связи с этим оценивали степень вариабельности нуклеотидных последовательностей гена *msr*.

Таблица 1 – Фенотипическая характеристика фагов лактококков вида *s2* по устойчивости к действию физических и химических факторов и спектру литического действия.

№ фага	№ группы	Место выделения	Выживаемость после УФ-облучения, %		Изменение оптической плотности после нагревания, %	Граничная концентрация цитрата натрия, %	Показатель литической активности, %	Лизируемые культуры
			5 мин	50 мин				
56/Cr106	3	Поставы	69,1*	44,1*	13,5	0,95	78,1	520/3 Cr106 33 75 57/8 81 27y 129y 34 84 606/4 24 586/10 d43/1 616/8 L85/3 575/5 79 21y 91 d134 L224/1 631/9 589/13 524/2 32
61/32	6	Брест	74,7*	56,5*	31,6	1,2	53,1	Cr106 33 75 57/8 27y 129y 84 24 586/10 616/8 575/5 79 21y 91 d134 L164/2 L224/1 32
77/83	9	Осиповичи	49,0*	43,3**	30	1,05	3,1	509y 83
82/119y	7	Толочин	64,7*	21,2*	23,1	0,4	37,5	520/3 Cr106 33 119y 75 57/8 129y 84 606/4 616/8 T7/9
83/119y	8	Толочин	58,8*	16,6*	33,6	0,45	15,6	Cr106 119y 129y 84
87/81	2	Лепель	59,1*	22,9*	19,7	0,3	56,3	d193/2 520/3 Cr106 33 119y 75 57/8 81 27y 129y 34 84 606/4 616/8 105/1 L224/1 524/2
90/606/1	5	Полоцк	55,5*	35,9*	3,1	0,55	84,4*	d193/2 520/3 Cr106 33 119y 75 57/8 81 27y 129y 34 84 606/4 24 586/10 d43/1 616/8 L85/3 575/5 105/1 79 21y 91 T7/9 L224/1 569/13 524/2
107/606/1	4	Лида	19,6**	16,3**	17,5	0,5	28,1	520/3 Cr106 33 119y 57/8 27y 129y 84

* $P < 0,01$.

** $P < 0,05$.

На сегодня известны нуклеотидные последовательности гена *tcp* семи лактофагов вида *c2*: *c2* (номер доступа в GenBank – L48605), *bIL67* (L33769), *eb1* (AF15210), *CB17* (DQ110947), *GR6* (DQ110948), *Q38* (AF152411), *Q44* (AF152412). В табл. 2 представлены результаты попарного сравнения нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *tcp* длиной 475 п.о.

Таблица 2 – Сходство (%) нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *tcp* (475 п.о.) у лактофагов вида *c2*.

Лактофаг (номер доступа в GenBank)	<i>c2</i>	<i>eb1</i>	<i>bIL67</i>	<i>CB17</i>	<i>GR6</i>	<i>Q38</i>	<i>Q44</i>
<i>c2</i> (L48605)	100	100	94,5	92,9	92,9	91,6	91,0
<i>eb1</i> (AF15210)		100	94,5	92,9	92,9	91,6	91,0
<i>bIL67</i> (L33769)			100	93,5	93,5	91,6	91,4
<i>CB17</i> (DQ110947)				100	100	90,8	90,4
<i>GR6</i> (DQ110948)					100	90,8	90,4
<i>Q38</i> (AF152411)						100	94,7
<i>Q44</i> (AF152412)							100

Как видно из табл. 2, уровень внутривидовых различий нуклеотидных последовательностей сравниваемого участка гена *tcp* составляет 5–9%, что позволяет надеяться на успешный поиск рестриктаз для ПДРФ-анализа с целью дифференциации лактофагов вида *c2*.

Из всего перечня рестриктаз, сайты рестрикции которых были представлены в нуклеотидных последовательностях гена *tcp* у семи представителей лактофагов вида *c2*, были отобраны четыре: *AluI*, *TaqI*, *MaeII*, и *MwoI*. На рис. 1 представлены полученные с помощью компьютерного моделирования результаты ПДРФ-анализа лактофагов вида *c2* после обработки отобранными рестриктазами фрагмента (475 п.о.) гена *tcp*. Как видно из представленной схемы, использование полного набора выбранных рестриктаз в ПДРФ-анализе позволяет разделить известные фаги вида *c2* на пять отдельных генотипических подгрупп: первую подгруппу образуют лактофаги *c2* и *eb1*; вторую – *CB17* и *GR6*; третью – *bIL67*; четвертую – *Q38* и пятую – *Q44*.



Рисунок 1 – Модельный ПДРФ-анализ фрагмента гена *tcr* лактофагов *c2* в полиакриламидном геле

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей консервативного участка гена *tcr* показал, что анализируемые фаги образуют в дендрограмме четыре ветви (рис. 2). Устойчивые пары были образованы фагами *c2* и *eb1*, *CB17* и *GR6*, *Q38* и *Q44*. Фаг *bIL67* занимал обособленное положение. Принимая во внимание значительную дивергенцию фагов *Q38* и *Q44*, можно утверждать, что результаты филогенетического анализа консервативного участка гена *tcr* лактофагов вида *c2* хорошо согласуются с результатами модельного ПДРФ-анализа. В связи с этим для внутривидового типирования лактофагов вида *c2* вполне можно применить менее дорогой и трудоемкий метод ПДРФ-анализа.

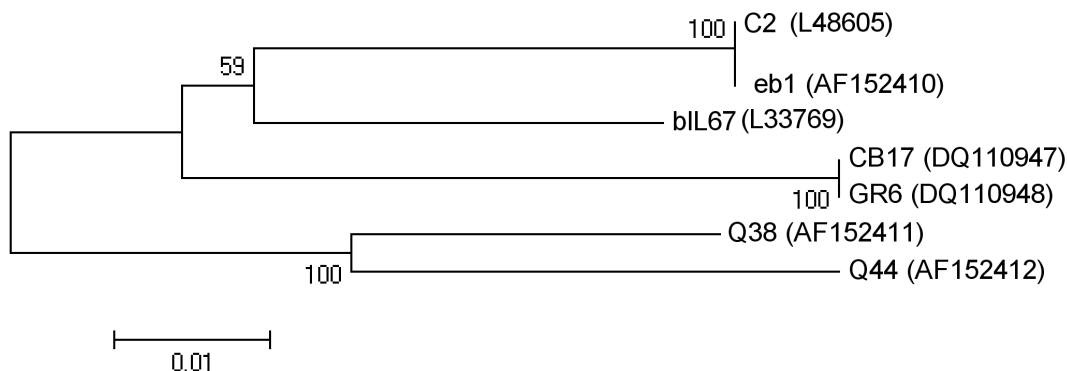


Рисунок 2 – Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей консервативного участка гена *tcr*

Заключение. Для разработки метода генотипирования лактофагов вида с2 объектом анализа может быть участок гена *тср* длиной 475 п.о. Амплификация данного фрагмента возможна с помощью полимеразной цепной реакции при использовании видоспецифичных праймеров. Обработка продукта амплификации дифференцирующими рестриктазами, электрофоретическое разделение полученных фрагментов в акриламидном геле и сравнительный анализ полученных фингерпринтов позволит провести внутривидовую дифференциацию лактофагов вида с2.

Литература

1. Кувалдина, Н. Как «обезопасить» молочную продукцию / Н. Кувалдина, Н. Сорокина // Сфера. Мир технологий. – 2005. – № 3. – С.22–25.
2. Species and type phages of lactococcal bacteriophages / A.W. Jarvis [et.al.] // Intervirology. – 1991. – N 32. – P.2–9
3. Ackermann, H.-W. Viruses of procariotes – volume I general properties of bacteriophages / H.-W. Ackermann, M.S. DuBow. – Boca Raton: CRC Press, 1987.
4. Основы бактериофагии / под ред. И.М. Габриловича. – Минск: Вышэйшая школа, 1973. – 221 с.
5. Сельсков, А.Н. Биологическая характеристика и классификация бактериофагов молочнокислых стрептококков. – автореф. дис. канд. биол. наук / А.Н. Сельсков. – Минск, 1979. – 22 с.
6. Hammes, W.P. The Genera Lactobacillus and Carnobacterium. The Procariotes VII / W.P. Hammes, N. Weiss, W. Holzapfel // Springer-Verlag. – New-Jork; Berlin, 1992. – P. 1571–1573.
7. Interactions of Lactobacillus bulgaricus temperature bacteriophage 0448 with host strains / P.J. Cluzel [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – Vol. 53. – P. 1850–1854.
8. Гудков, А.В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты / А.В. Гудков. – М.: ДеЛи принт, 2003. – 800 с.
9. Bacteriophages of the genus Lactobacillus / T. Sozzi [et al.] // Intervirology. – 1981. – N 16. – P. 129–135.
10. Раутенштейн, Я.И. Бактериофаги и актинофаги. Жизнь растений / Я.И. Раутенштейн. – М.: Просвещение, 1974. – Т. 1. – С. 445–459.

11. Состояние фагового фона на отечественных молочных предприятиях / В.И. Ганина [и др.]. // Молочная промышленность. – 2005. – № 10. – С. 29-30.
12. Скотт, Р. Производство сыра: научные основы и технологии / Р. Скотт, Р.К. Робинсон, Р.А. Уилби. – СПб.: Профессия, 2005. – 464 с.
13. Снятковский, М.В. Бактериофаги в молочном производстве и борьба с ними / М.В. Снятковский, Р.З. Карычев, Г.П. Шаманова // Переработка молока. – 2006. – № 5. – С. 20–21.
14. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта [и др.]. – М.: Мир, 1984. – 378 с.
15. Characterization of lactococcal bacteriophages from Quebec cheese plants / S. Moineau [et al.]. // Can. J. Microbiol. – 1992. – Vol.38. – P. 875–882.
16. Biodiversity and classification of lactococcal phages / Deveau H. [et. al.] // Appl. Environ Microbiol. – 2006. – Vol. 72. – P. 4338–4346.
17. Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the United States / S. Moineau [et al.]. // J. Dairy Sci. – 1996. – Vol. 79. – P. 2104–2111.
18. Фенотипическая характеристика лактофагов молочнокислых продуктов / А.П. Райский [и др.]. // Наука и инновации. – 2008. – Т. 62, №4. – С. 36–40.
19. Raiski, A. Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in the Republic of Belarus / A. Raiski, N. Belyasova // Int. J. Food Microbiol. – 2009. – Vol. 130. – P. 1–5.
20. Райский А.П., Биоразнообразие и идентификация распространенных на молочных комбинатах Беларуси лактофагов / А.П. Райский, С.Н. Шпилевский, Н.А. Белясова // Химия и технология органических веществ : труды Белорус. гос. техн. ун-та. Сер. IV// Бел. гос. технолог. ун-т. – Минск, 2008. – Вып. 16. – С. 166–168.
21. Pillidge, C.J. DNA restriction maps and classification of the lactococcal bacteriophages c2 and sk1 / C.J Pillidge, A.W. Jarvis // N.Z.J. Dairy Sci. Technol. – 1988. – Vol. 23. – P. 411–416.
22. Sequencing and analysis of the prolate-headed lactococcal bacteriophage c2 genome and identification of the structural genes / M.W.

Lubbers [et al.]. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – Vol. 61, N 12. – P. 4348–4356.

23. Transcription analysis of the prolate-headed lactococcal bacteriophage c2 / M.W Lubbers [et al.]. // *J. Bacteriol.* – 1998. – Vol. 180, N 17. – P. 4487–4496.

24. Schouler, C. Sequence and organization of the lactococcal prolate-headed bIL67 phage genome/ C.Schouler, S.D.Ehrlich, M-C.Chopin // *Microbiol.* – 1994. – Vol. 140. – P. 3061–3069.

25. Ackermann, H.-W. Curated list of prokaryote viruses with fully sequenced genomes / H.-W Ackermann, A.M Kropinski // *Res. Microbiol.* – 2007. – Vol. 158. – P. 555–566.

26. Labrie, S. Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages/ S. Labrie, S., S. Moineau // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66. – P. 987–994.

27. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk / B.Del Rio [et al.]. // *Food Microbiol.* – 2007. – Vol. 24. – P. 75–81

*N. Furik, D. Bazhanov, K. Yatsevich, E. Kasperovich, S. Vasilenko,
G. Mashkovskaya*

PHENOTYPIC AND GENETIC CHARACTERIZATION OF LACTO-COCCAL PHAGES C2 FOR WORKING OUT METHOD OF THEIR GENOTYPING

Summary

Eight lactococcal phages c2 were characterized by their resistance to physical and chemical factors and lytic spectra. It was found that phenotypic variability of the phages c2 was wide, thus molecular techniques seemed to be essential for their typ-ing. It was demonstrated that intraspecies differentiation of c2 phages is possible by RFLP analysis of mcp gene fragment, amplified by PCR with species-specific prim-ers.