

УДК 578.347:578.522(047.31)(476)

*И.В. Кирик, С.Л. Василенко, к.б.н., Н.Н. Фурик, к.т.н.
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь*

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБОВ ХРАНЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ

(Поступила в редакцию 7 апреля 2016 г.)

Проведен анализ способов получения и хранения лизатов бактериофагов. Установлены и охарактеризованы факторы, оказывающие наиболее значительное влияние на сохранность бактериофагов при хранении.

Ключевые слова: бактериофаги, молочнокислые бактерии, фаголизис, лизаты, питательные среды, концентрация фагов.

Введение. Лактофаги — вирусы бактерий рода *Lactococcus* — представляют собой весьма обширную и достаточно хорошо изученную группу вирулентных и умеренных фагов. Они вызывают неослабевающий интерес исследователей, прежде всего из-за экономических издержек, которые несут предприятия молочной промышленности в результате фаголизиса. Поскольку в производстве ферментированных молочных продуктов на территории Республики Беларусь чаще других используют молочнокислые бактерии, относящиеся к роду *Lactococcus*, то и фаги, вирулентные по отношению к данным бактериям, распространены на молочных комбинатах наиболее широко. По оценкам зарубежных коллег, до 2/3 всех процессов ферментации осуществляется молочнокислыми бактериями *Lactococcus lactis* [1], и именно лактофаги являются причиной большинства неудачных технологических процессов при выработке кисломолочных продуктов, как в нашей стране, так и за ее пределами [2–4].

Универсальных способов борьбы с фаголизисом до сих пор не существует. Предлагается ряд мероприятий, способных лишь ограничить это явление или научиться распознавать его признаки на ранних стадиях ферментации молока. Наиболее действенная мера – использование фагоустойчивых штаммов заквасочных бактерий, которые приходится селективировать или конструировать практически постоянно, поскольку известно, что уже в течение 2–3 технологических процессов по отношению к этим бактериям появляются способные инфицировать и лизировать их фаги [5].

В настоящее время бактериофаги молочнокислых бактерий активно применяются производителями заквасок для селекции штаммов бактерий, устойчивых к вирусной инфекции. Для проведения эффективной селекционной работы создаются производственные коллекции бактериофагов.

При создании подобных депозитариев неизменно ставится вопрос о длительном хранении вирусов. Также важно в процессе выделения и особенно последующего хранения сохранить генетические и физиологические свойства полученных бактериофагов для наиболее достоверного выбора фагоустойчивых молочнокислых бактерий, входящих в состав заквасок. Длительное поддержание вирусов в коллекции необходимо также и для использования их при проведении научно-исследовательских работ.

Все предлагаемые на данный момент способы длительного хранения бактериофагов имеют определенные недостатки. К тому же универсального метода

хранения вирусов не существует. Разные лактофаги могут переносить один и тот же способ хранения по-разному [6]. Возможно, это связано с различиями на генетическом уровне (разный вид лактофагов).

На основании морфологии, ДНК-ДНК-гомологии, а также по данным сравнительного анализа геномов составлена классификация, как для вирулентных так и для умеренных фагов лактококков. На современном этапе фаги бактерий *Lactococcus lactis* дифференцируют на 10 видов. Изучение фаговой ситуации на молочных предприятиях во всем мире показало, что чаще всего встречаются представители видов 936, P335, с2 [7, 8], которые принадлежат к семейству *Siphoviridae* отряда *Caudovirales*. Для видов 936 и с2 известны только вирулентные представители, а для вида P335 выделены как вирулентные, так и умеренные фаги.

Согласно литературным данным в мире фаголизис на производстве в большинстве случаев вызывают фаги принадлежащие к виду 936 – они составляют обычно до половины всех выделяемых изолятов, четверть выделяемых изолятов, как правило, относится к виду с2, а среди остальных преобладают фаги вида P335, и в редких случаях – фаги семейства *Podoviridae* [9, 10].

На территории Республики Беларусь распространены фаги видов с2 и 936, а также вида P034 семейства *Podoviridae* [11, 12]. Судя по представленности этих видов в образцах, отобранных на молокоперерабатывающих предприятиях, наиболее распространен вид С2, а встречаемость фагов вида P034 сопоставима с встречаемостью фагов вида 936 [12]. Особый интерес представляют фаги вида С2, как наиболее распространенные в последние годы на молокоперерабатывающих предприятиях Республики Беларусь, обладающие вирулентными свойствами в отношении лактококков – основной заквасочной микрофлоры, используемой для производства традиционных кисломолочных продуктов (творога, сметаны, сыров) [12].

Для предотвращения распространения в производственных условиях фаговой инфекции необходимо знать типы и свойства бактериофагов, циркулирующих на предприятиях. Это позволяет разрабатывать меры защиты производств от фаговой инфекции и проводить подбор фагорезистентных культур молочнокислых бактерий, используемых для ферментации молока. Для реализации данных защитных мер необходимо создание коллекций бактериофагов, в которых будет храниться различные виды бактериофагов для проведения необходимых исследований.

Целью исследования являлось изучение способов хранения разных видов вирусов и определение факторов, влияющих на изменение их выживаемости и свойств при хранении.

Результаты и их обсуждение. Существует несколько основных способов хранения бактериофагов: в жидком, замороженном и лиофилизированном виде. Известно, что наиболее оптимальным способом сохранения бактериофагов является их лиофильное высушивание. При использовании метода лиофилизации удается сохранять в жизнеспособном состоянии до 20 лет и более лет многие физиологически разнородные виды как микроорганизмов так и бактериофагов [13, 14]. Однако основным недостатком данного метода является высокий риск возникновения генетических нарушений на этапе высушивания под вакуумом [15, 16], что может привести к искажению результатов по определению фагоустойчивости заквасочных культур и их комбинаций. К тому же данный метод требует определенных затрат, наличия специального оборудования и навыков. В то же время не всегда удобно использовать сухую форму фагов, так как для проведения тестирования культур необходима стадия дополнительного получения жидкого лизата с высоким титром лактофагов.

Более оптимальными способами хранения в плане удобства последующего применения являются хранение лизатов с высоким титром в жидкой или

замороженной форме. Данные формы хранения более удобны при практическом применении, по сравнению с использованием лиофильно высушенного фага, т.к. при их непосредственном применении нет необходимости в дополнительном приготовлении лизата.

При хранении лизатов фагов лактококков в жидком виде при комнатной температуре фаги могут храниться не более одной – двух недель; как правило, при дальнейшем хранении в указанных условиях происходит значительное снижение количества вирусных частиц и их вирулентных свойств [17].

При хранении лизатов фагов лактококков в условиях холодильника (при температуре $4\pm 2^{\circ}\text{C}$) или морозильной камере (при температуре не выше -18°C) концентрация вирусов в лизате незначительно снижается в течение каждого месяца хранения [17]. Однако на сегодняшний день нет данных о том, как долго можно осуществлять хранение вирусных частиц в указанных условиях, чтобы сохранялось как количество заложенных на хранение вирусных частиц, так и не снижались вирулентность фагов.

Таким образом, методы хранения фагов в жидком и замороженном виде также имеют недостаток – уменьшение количества вирулентных фагов со временем, что также ведет к искажению результатов по определению фагоустойчивости заквасочных культур и их комбинаций и может привести к потере фагов для коллекции.

Совершенствование методов хранения идет по путям оптимизации существующих методов, применения комбинированных методов, а также поиска новых подходов. Так, в настоящее время предлагаются различные модификации упоминавшихся ранее методов.

Сравнительно простым и недорогим способом хранения микроорганизмов и вирусов является их высушивание на полосках или дисках стерильной фильтровальной бумаги [13, 14, 18]. Этот метод идеален для обеспечения контроля качества вирусов. В общей пробирке или в пузырьке с закручивающейся крышкой можно хранить много дисков, содержащих одну и ту же вирусную культуру. При необходимости диск достают стерильным пинцетом и в стерильных условиях вносят его в соответствующую питательную среду с индикаторной культурой. Этот метод, заключающийся в насыщении стерильных кругов фильтровальной бумаги фаголизатом с последующим высушиванием, пригоден для длительного хранения бактериофагов молочнокислых бактерий. Однако данный метод не обеспечивает удовлетворительного уровня выживаемости бактериофагов, а также их генетической стабильности [18].

Известен способ низкотемпературного замораживания лизатов бактериофагов лактококков с последующим хранением в морозильной камере. Для этого фаголизат раскапывают по стерильным пробиркам объемом 1 мл, после чего замораживают при температуре -70°C . Данный температурный режим обеспечивает высокую скорость охлаждения. Замороженные образцы хранятся в морозильной камере при температуре -18°C . Однако данный способ имеет существенные недостатки: температурный режим замораживания и хранения бактериофагов обеспечивает выживаемость фагов не более 25%; также отсутствуют данные о сохранении литической активности бактериофагов в отношении хозяев [19].

Оптимизировать существующие методы хранения бактериофагов можно путем использования различных факторов, влияющих на выживаемость лактофагов.

На хранение лизатов фагов лактококков влияет вид питательной среды, на которой он был получен, так как от вида питательной среды зависит изначальная концентрация вирусов в лизате и физико-химические свойства самого лизата. Чем выше концентрация фага в лизате, тем дольше может снижаться концентрация фагов в образце до критической точки, а, следовательно, увеличится и срок хранения.

Некоторые среды могут содержать вещества, которые будут выступать в качестве криопротекторов и, таким образом, способствовать наибольшей выживаемости бактериофагов.

Так, одним из способов получения фаголизатов лактококков является использование в качестве среды для накопления вирусов 10% восстановленного обезжиренного молока. По мнению W.M.A. Mullan некоторые фаги производят гораздо больше вирусных частиц в молоке, по сравнению с другими средами [17]. В качестве сред для приготовления лизатов с высокой концентрацией лактофагов он также рекомендует использовать среды M17 и модифицированную среду MRS. Данные среды требуют обогащение ионами кальция перед использованием, однако они более удобны в использовании по сравнению с 10% восстановленным молоком, так как не требуют очистки от белков в процессе получения фаголизата [17].

Фаги «размножаются» в клетке-хозяине, поэтому оптимальной средой для их накопления будет среда, являющаяся благоприятной для инкубирования культуры молочнокислых бактерий. Для культивирования молочнокислых бактерий могут использоваться различные питательные среды: 48А, ГО, ПГС, ПГК. Проведенные в РУП «Институт мясо-молочной промышленности» исследования показали, что при выращивании в течении 16 часов на всех средах индикаторных культур лактококков их концентрация отличалась незначительно (составила более 10^8 КОЕ/см³). Наибольшее количество бактериофагов (при получении лизата двухслойным методом Грация) получали при использовании среды ГО, на остальных питательных средах титр был немного ниже. Также было исследовано влияние концентрации ионов Ca^{2+} или Mg^{2+} в среде ГО на увеличение выхода вирусных частиц. Было установлено отсутствие значительного повышения количества наращиваемых фаговых частиц при увеличении концентрации ионов Ca^{2+} или Mg^{2+} в среде [20].

И.Р. Волкова для получения культур в логарифмической стадии роста и обнаружения фагов лактококков бактерий рекомендует использовать среды M17, MRS и ГМК-2, на которых были получены лизаты с наибольшим количеством вирусных частиц [21].

Еще одним фактором, оказывающим влияние на сохранность бактериофагов, является концентрация фагов в суспензии, подвергающейся замораживанию.

На сегодняшний день существуют различные точки зрения о влиянии концентрации сохраняемого объекта в суспензии на сохранение жизнеспособности. Например, при изучении корреляции между плотностью популяции и выживанием после лиофилизации микроорганизмов *Lactococcus cremoris* установлено, что с увеличением концентрации с 10^6 до 10^9 клеток/мл процент выживаемости также увеличивается [22]. Это же характерно и для многих бактериальных видов [23]. С другой стороны, увеличивающаяся концентрация приводит к межклеточным контактам, продукции токсических метаболитов и т.д., что уменьшает жизнеспособность [22]. Для большинства коллекций микробных культур рекомендуется использовать исходные концентрации 10^8 – 10^{10} клеток/мл при закладке их на хранение [14, 24]. С одной стороны высокая начальная концентрация жизнеспособных клеток увеличивает шанс на сохранение клеток даже на низком уровне их выживания после консервации, с другой – лизированные клетки и клеточные компоненты могут действовать как криопротекторы для целых клеток.

В работе J. Nyiendo и соавт. указывается на тенденцию увеличения выживаемости фагов молочнокислых бактерий при увеличении их концентрации в замораживаемой суспензии (-22°C) [25]. Для концентрирования предлагается использовать низкоскоростное центрифугирование с осаждением суспензии бактериофагов в двухфазной системе полиэтиленгликоль – натрия хлорид. При использовании данного метода около 99,9% фаговых частиц осаждаются из лизата.

При криоконсервировании бактериофагов молочнокислых бактерий в

ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси» для замораживания (в жидком азоте) использовали свежий лизат фага лактококков, а также концентрированную суспензию с концентрацией вирусных частиц 10^6 и 10^{10} БОЕ/мл, соответственно [26]. Помимо чистых лизата и суспензии бактериофагов, использовали лизат и суспензию с добавлением в качестве криопротектора стерильной сахарозы до конечной концентрации 10%. Титр выживших после криоконсервации бактериофагов исследовали стандартным методом агаровых слоев (таблица 1).

Таблица 1 – Выживаемость бактериофагов молочнокислых бактерий в зависимости от концентрации вирусных частиц в консервируемой среде

Вариант опыта	Лизат фага, исходный титр – ($3,90 \pm 0,13$) $\times 10^6$ БОЕ/мл		Концентрированная суспензия, исходный титр – ($2,62 \pm 0,19$) $\times 10^{10}$ БОЕ/мл	
	Количество выживших фагов, БОЕ/мл	Выживаемость, %	Количество выживших фагов, БОЕ/мл	Выживаемость, %
Без добавления криопротектора	($2,40 \pm 0,29$) $\times 10^6$	61,54	($2,09 \pm 0,21$) $\times 10^{10}$	82,61
При добавлении криопротектора	($3,48 \pm 0,24$) $\times 10^6$	89,23	($2,48 \pm 0,14$) $\times 10^{10}$	94,66

Как видно из таблицы 1, при замораживании в жидком азоте суспензии с высоким титром вирусных частиц достигается более высокий уровень выживаемости в сравнении с лизатом, имеющим меньшую концентрацию лактофагов.

Еще одним значительным фактором, оказывающим влияние на сохранность бактериофагов, является скорость заморозки суспензии фагов.

Оптимизация температурных режимов криоконсервирования также позволяет добиться более высокого уровня выживаемости бактериофагов, также обеспечивается сохранение их вирулентности.

В качестве модификации метода быстрой заморозки (замораживание до температуры -70°C) бактериофагов молочнокислых бактерий предложен метод медленного замораживания (со скоростью $4^\circ\text{C}/\text{мин}$) суспензии с высоким количеством вирусных частиц (10^9 – 10^{10} БОЕ/мл), а также с использованием 10% сахарозы в качестве криопротектора [26].

Из фаголизата готовят концентрированную суспензию вирусов максимально достижимым количеством жизнеспособных вирусов. Обычно количество фагов в подобных случаях достигает 10^9 – 10^{10} БОЕ/мл. Образцы суспензии бактериофагов в стерильных криопробирках охлаждаются в холодильнике до 0°C , после чего помещаются в морозильную камеру (-20°C) и жидкий азот (-196°C). Данные условия замораживания обеспечивают соответственно скорости охлаждения 4 и 100–400 $^\circ\text{C}/\text{мин}$. Дальнейшее длительное хранение лактофагов осуществляется в жидком азоте.

При консервировании вирусов с помощью описанного метода наблюдается потеря жизнеспособности фагов около 5% непосредственно после замораживания, а также 5% в течение 4 месяцев хранения. Суммарная потеря жизнеспособности не превышает 10%. Предложенный метод, помимо высокой выживаемости бактериофагов, также обеспечивает сохранение их вирулентности [26].

Существенным недостатком метода является то, что использование жидкого азота для длительного хранения образцов обходится очень дорого. Однако некоторые данные последних лет об успешном хранении в жидком азоте физиологически разнородных организмов (бактерий, вирусов, эукариотических клеточных культур)

свидетельствуют о том, что его использование в некоторых случаях оптимально, несмотря на относительно высокую стоимость такого хранения [27].

Еще одним важным фактором, оказывающим значительное влияние на сохранность бактериофагов, является температура, при которой осуществляется длительное хранение.

Длительное хранение культур микроорганизмов без утраты их свойств обычно проводится методами, обеспечивающими существенное торможение протекающих у них жизненных процессов.

Известно, что пониженные значения температуры может служить фактором, способствующим замедлению различных физиологических процессов в живых объектах и таким образом способствующим их длительному хранению.

Для длительного хранения фаголизатов лактококков, полученных на среде M17, W.M.A. Mullan с сотрудниками рекомендуют температуру не выше -18°C . Для увеличения выживаемости фагов следует использовать более низкие температуры – от -30°C и ниже. В то же время хранение вирусов при температуре -196°C , с использованием жидкого азота, может быть необходимо для очень небольшого количества лактофагов [17].

В опыте Д.В. Рахуба и Г.И. Новик для определения оптимальной температуры хранения замороженные образцы хранили в жидком азоте при температуре -196°C , а также в морозильной камере при температуре -20°C . При хранении в жидком азоте обеспечивалась выживаемость бактериофагов лактококков, близкая к 100%. При хранении при температуре -20°C выживаемость вирусов составила около 60% от начальной (исследования проводились в течение 4 месяцев) [26]. В то же время данных об изменении вирулентности фагов получено не было.

Важным фактором, также оказывающим влияние на сохранность бактериофагов, является наличие/отсутствие веществ, обладающих криопротекторными свойствами.

Криопротекторы – вещества, снижающие воздействие множества повреждающих факторов в процессе замораживания биологических структур (в том числе и бактериальных или вирусных культур).

Криопротекторы бывают двух типов. К первому относятся глицерин и диметилсульфоксид (ДМСО), которые легко проходят через клеточную мембрану и обеспечивают как внутриклеточную, так и внеклеточную защиту от замораживания. Ко второму виду криопротекторов относятся такие вещества, как сахароза, лактоза, глюкоза, маннит, сорбит, декстран, поливинилпирролидон и полиэтиленгликоль, которые обеспечивают защитное действие на наружной поверхности клеточной мембраны. Наиболее часто используемыми криопротекторами при криоконсервации микроорганизмов, а также других биологических объектов являются ДМСО и глицерин в концентрациях 5–10% [28].

Однако в силу огромного разнообразия встречающихся в природе микроорганизмов двумя криопротекторами в практической работе не обходятся. Поэтому при криоконсервации новых видов микроорганизмов следует предварительно проверять действие на них различных типов криопротекторов и выбрать подходящий как для данного типа микроорганизмов, так и для условий их последующего хранения.

При консервации бактериофагов молочнокислых бактерий замораживанием и последующим хранением при -22°C в качестве криопротектора J. Nyiendo и соавт. использовали глицерин в концентрации 15%. Срок хранения лизатов в данном случае составлял как минимум два года [25].

Также добавление в качестве криопротектора сахарозы в концентрации 10% при замораживании фаголизатов лактококков в жидком азоте приводило к значительному увеличению выживаемости и сохранению лизирующей способности

бактериофагов *Lactococcus lactis* (таблица 2) [26].

Таблица 2 – Влияние добавления сахарозы в концентрации 10% к суспензии фагов лактококков при криоконсервировании

Вариант опыта	Лизат фага, исходный титр – $(3,90 \pm 0,13) \times 10^6$ БОЕ/мл	
	Количество выживших фагов (БОЕ/мл)	Выживаемость (%)
Замораживание без добавления криопротектора	$(2,40 \pm 0,29) \times 10^6$	61,54
Замораживание с добавлением криопротектора	$(3,48 \pm 0,24) \times 10^6$	89,23

Значимым фактором, также оказывающим влияние на сохранность некоторых бактериофагов, является состояние замораживаемого объекта.

Все наиболее распространенные методы хранения лизатов фагов, содержащих непосредственно фаговые частицы, имеют свои недостатки. К тому же выживаемость фагов и сохранение их физиологических свойств во многом зависит от свойств конкретного фага. Для преодоления данных недостатков Р. Golec и соавт. предложили метод хранения вирулентных бактериофагов не самостоятельно в качестве одного из компонентов суспензии (т.е. отдельно от клетки), а в адсорбированном состоянии на инфицированных ими клетках [29].

В опыте проводили сравнение выживаемости фагов при замораживании фагов отдельно от клеток и в адсорбированном на клетках состоянии. Для чего проводили заражение бактериальных культур в логарифмической либо ранней стационарной стадии роста с множественностью заражения 0,1 – 0,5 и выдерживали в течение 5–15 минут. Времени 15 минут оказалось достаточно для адсорбции от 72 до 99% тестируемых фагов. Далее часть суспензии отбирали для определения количества адсорбированных фагов. Для этого бактериальные клетки отделяли центрифугированием. Супернатант использовали для определения количества неадсорбированных фагов. Количество адсорбированных фагов определяли вычитанием количества неадсорбированных фагов из общего начального количества фагов используемых для инфицирования. Оставшуюся часть суспензии либо промывали для удаления неадсорбированных фагов и добавляли глицерин до концентрации 15%, либо сразу добавляли глицерин (без стадии предварительного удаления неадсорбированных фагов). Образцы замораживали в жидком азоте и помещали на хранение при -80°C . В конце обозначенного срока хранения определяли концентрацию фагов [29].

При сравнении выживаемости вирулентных фагов различных микроорганизмов при замораживании непосредственно фаговых частиц в суспензии и фаговых частиц, адсорбированных на бактериальных клетках, оказалось что она либо равна, либо в большинстве случаев более высока при хранении фагов в адсорбированном на инфицированных клетках состоянии. В случае фагов *L. lactis* при сравнении выживаемости в течение 6 месяцев оказалось, что снижение концентрации в обоих случаях не произошло. Более длительных исследований не проводили [29].

Данный метод авторы рекомендуют для хранения вирусов с хрупкой структурой вириона [29].

Закключение. В ходе исследования установлены факторы, оказывающие наиболее значительное влияние на сохранность бактериофагов при их консервировании и хранении:

– питательная среда, на которой получен лизат бактериофага, – необходимо экспериментальным путем определить наиболее оптимальную среду культивирования индикаторной культуры, позволяющую накапливать наибольшее количество вирусных частиц (на разных средах их количество может различаться в 10-100 раз);

– концентрация фагов в суспензии – чем выше исходное количество вирусных частиц, тем выше выживаемость фагов при хранении.

– скорость замораживания (медленная или быстрая заморозка) – чем быстрее произошло замораживание (например, быстрая заморозка с использованием жидкого азота), тем выше выживаемость фагов;

– температура хранения фаголизатов – чем ниже температура хранения консервированных лизатов бактериофагов, тем выше их выживаемость;

– наличие или отсутствие протекторных веществ – использование защитных сред позволяет увеличить сохранность вирусных частиц в 1,2 – 1,5 раза независимо от того, какое их количество заложено на хранение;

– состояние замораживаемого объекта: свободное или адсорбированное на стенках бактериальной клетки.

Список использованных источников

1. Brussow, H. Phages of dairy bacteria / H. Brussow // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2001. – Vol. 55. – P. 283-303.

2. Sanlibaba, P. Classification of virulent lactococcal bacteriophages based on protein composition and restriction endonuclease analysis / P. Sanlibaba, M. Akcelik // *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* – 2005. – P. 865-871.

3. Szczepanska, A.K. Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in Polish dairy environment / A.K. Szczepanska, M.S. Hejnowicz, P. Kolakowski, J. Bardowski // *J. Acta Biochim.* – 2007. – P. 151-158.

4. Moineau, S. Control of bacteriophages in industrial fermentation. / S. Moineau, C. Levesque // In: *Bacteriophages: biology and applications* E. Kutter, A. Sulakvelidze (Eds) – CRC Press. – 2005. – P. 286-296.

5. Teuber, M. Genetic engineering techniques in food microbiology and enzymology / M. Teuber // *Food Rev. Int.* – 1993. – №3. – P. 389-409.

6. Ackermann, H.W. Long-term bacteriophage preservation / H.W. Ackermann, D. Tremblay, S. Moineau // *World Fed. Cult. Collect. Newslett.* – 2004. – Vol. 38. – P. 35-40.

7. Casey, C.N. Characterization and classification of virulent lactococcal bacteriophages, isolated from Cheddar cheese plant / C.N. Casey, E. Morgan, C. Daly, G. F. Fitzgerald // *J. Appl. Bacteriol.* – 1992. – Vol. 74. – P. 268-275.

8. Dupont, K. Identification of the receptor-binding protein in 936-species lactococcal bacteriophages / K. Dupont, F.K. Vogensen, H. Neve, J. Bresciani, J. Josephsen // *J. Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – P. 5801- 5807.

9. Brussow, H. Phages of dairy bacteria / H. Brussow // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2001. – Vol. 55. – P. 283-303.

10. Deveau, H. Biodiversity and classification of lactococcal phages / H. Deveau, S.J. Labrie, M.C. Chopin, S. Moineau // *J. Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – Vol. 72. – P. 4338–4346.

11. 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.

12. Райский, А.П. Биоразнообразие и идентификация распространенных на молочных комбинатах Беларуси лактофагов / А.П. Райский, С.Н. Шпилевский, Н.А. Беясова // *Химия и технология органических веществ : труды Белорус. гос. техн. ун-та. Сер. IV*// Белорусский государственный технологический университет. – Минск,

2008. – Вып. 16. – С. 166-168.

Rajskij, A.P. Bioraznoobrazie i identifikacija rasprostranennyh na molochnyh kombinatah Belarusi laktofagov [Biodiversity and identification of bacteriophages that circulated in Belarus dairy plant] / A.P. Rajskij, S.N. Shpilevskij, N.A. Beljasova // *Himija i tehnologija organicheskih veshhestv: trudy Belorus. gos. tehn. un-ta. Ser. IV*// Belorusskij gosudarstvennyj tehnologičeskij universitet. – Minsk, 2008. – Вып. 16. – С. 166-168.

13. Герна, Р. Хранение микроорганизмов. Методы общей бактериологии /пер. с англ. Р. Герна; под ред. Ф. Герхардта [и др.]. // М.: Изд. Мир. 1983. – С. 512-534.

Gerna, R. Hranenie mikroorganizmov. Metody obshhej bakteriologii [Storage of microorganisms. Methods of general bacteriology] / per. s angl. R. Gerna; pod red. F. Gerhardta [i dr.]. // М.: Изд. Мир. 1983. – С. 512-534.

14. Lapage, S.P. Culture collections and the preservation of bacteria / S.P. Lapage, J.E. Shelton, T.G. Mitchell, A.R. Mackenzie // *Meth. Microbiol.* –1970. – Vol. 3A. – P. 135-228.

15. Ohnishi, T. Deoxyribonucleic acid strand Breaks during freeze-drying and their repair in *Escherichia coli* / T. Ohnishi, Y. Tanaka, M. Yoh, Y. Takeda, T. Miwatani // *J. Bacteriol.*– 1977. – Vol. 130. – P. 1393-1396.

16. Tanaka, Y. Induction of mutation in *Escherichia coli* by Freeze-drying / Y. Tanaka, M. Yoh, Y. Takeda, T. Miwatani // *J. Appl. Environ. Microbiol.* – 1979. – Vol. 37. – P. 369-372.

17. [Электронный ресурс]. – Режим доступа:

<https://www.dairyscience.info/index.php/preparation-and-storage-of-high-titre-lactococcal-lysates.html> .

Jelekturnyj resurs. – Rezhim dostupa:

<https://www.dairyscience.info/index.php/preparation-and-storage-of-high-titre-lactococcal-lysates.html>.

18. Prouty, C.C. Storage of the bacteriophage of lactic acid streptococci in the desiccated state with observations on longevity / C.C. Prouty // *J. Appl. Microbiol.* – 1953. – Vol. 1, № 5. – P. 250-251.

19. Keogh, B.P. Long-term storage of bacteriophages of lactic streptococci / B.P. Keogh, G. Pettingill// *J. Appl. Microbiol.* – 1966. – Vol. 14, № 3. – P. 421-424.

20. Фурик, Н.Н. Биологические свойства бактериофагов молочнокислых бактерий / Н.Н.Фурик, Е.М. Кононович, Н.В.Образцова // *Матер. межд. науч. конф. «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии».* – 2008. – Раков, Беларусь.

Furik, N.N. Biologicheskie svojstva bakteriofagov molochnokislyh bakterij [Biological properties of lactic acid bacteria bacteriophages] / N.N.Furik, E.M. Kononovich, N.V.Obrazcova // *Mater. mezhd. nauch. konf. «Sovremennoe sostojanie i perspektivy razvitija mikrobiologii i biotehnologii».* – 2008. – Rakov, Belarus'.

21. Волкова, И.Р. Разработка метода индикации бактериофагов, лизирующих молочнокислые бактерии: дис. канд. техн. наук. МГУПБ. / И.Р. Волкова // Москва. – 2007. – 127 с.

Volkova, I.R. Razrabotka metoda indikacii bakteriofagov, lizirujushhih molochnokislye bakterii: dis. kand. tehn. nauk. MGUPB. [Development of method for indication of lytic bacteriophages of lactic acid bacteria] / I.R. Volkova // Москва. – 2007. – 127 s.

22. Uzunova-Doneva, T. Anabiosis and conservation of microorganisms / T. Uzunova-Doneva, T. Donev // *J. Cult. Coll.* – 2004-2005. – Vol. 4.– P. 1728.

23. Цуцаева, А.А. Криобиология и биотехнология / А.А. Цуцаева, В.Г. Попов, К.М. Сыткин [и др.]; под общ. ред. А.А. Цуцаевой. – Киев: Нав. думка. – 1987. – 216 с.

Cucaeva, A. A. Kriobiologija i biotehnologija [Cryobiology and biotechnology] /

A.A. Cucaeva, V.G. Popov, K.M. Sytkin [i dr.]; pod obshh. red. A.A. Cucaevoj.– Kiev: Nav. dumka. – 1987. – 216 s.

24. Heckly, R. J. Preservation of microorganisms / R. J. Heckly // Adv. Appl. Microbiol. – 1978. – Vol. 24. – P. 1-53.

25. Nyiendo, J. Preparation and storage of high-titer lactic streptococcus bacteriophages / J. Nyiendo, J. Ramon, W.E. Seidler, P.R. Elliker // J. Appl. Microbiol. – 1974. – P. 72-77.

26. Патент ВУ 16698 С1. Способ криоконсервирования бактериофагов молочнокислых бактерий. Заявлено: 22.07.2010. Опубликовано: 30.12.2012.

Patent ВУ 16698 С1. Sposob kriokonservirovanija bakteriofagov molochnokislyh bakterij [The cryopreservation method of lactic acid bacteria phages]. Zayavleno: 22.07.2010.

Opublikovano: 30.12.2012.

27. Похиленко, В.Д. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития / В.Д. Похиленко, А.М. Баранов, К.В. Детушев // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – №4.

Pohilenko, V.D. Metody dlitel'nogo hranenija kollekcionnyh kul'tur mikroorganizmov i tendencii razvitija [Methods for long-term storage of collection cultures of microorganisms and development trends] / V.D. Pohilenko, A.M. Baranov, K.V. Detushev // Izvestija vysshih uchebnyh zavedenij. Povolzhskij region. Medicinskie nauki.– 2009. – №4.

28. Hubalek, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms / Z. Hubalek // J. Cryobiol. – 2003. – Vol. 46, № 3. – P. 205-229.

29. Golec, P. A reliable method for storage of tailed phages. / P Golec, K. Dąbrowski, S. Hejnowicz, A. Gozdek [et al.] // J. Microbiol. Meth. – 2011. – Vol. 84. – Vol. 3. – P. 486-489.

I. Kirik, S. Vasylenko, N. Furik

Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus

RESEARCH OF BACTERIOPHAGE STORAGE METHODS

Summary

The methods for obtaining and storage of bacteriophage lysates were analyzed. The factors that have the most significant effect on the bacteriophage maintenance in storage process were established and characterized.

Keywords: bacteriophage, lactic acid bacteria, phage lysis, lysates, nutrition media, phage concentration.