

ПЕРАПРАЦОЎКА І ЗАХАВАННЕ СЕЛЬСКАГА СПАДАРЧАЙ ПРАДУКЦЫІ
PROCESSING AND STORAGE OF AGRICULTURAL PRODUCTION

УДК 579.67:637.1.055(476)

Поступила в редакцию 04.10.2017
Received 04.10.2017

С. Л. Василенко, Н. Н. Фурик, А. Н. Казак

Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь

ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ БАКТЕРИОФАГОВ ЛАКТОКОККОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Аннотация: В производстве ферментированных молочных продуктов на территории Республики Беларусь чаще других используют молочнокислые бактерии, относящиеся к р. *Lactococcus*. Непрерывный фаговый мониторинг позволяет ограничить экономические потери от фаголизиса при производстве кисломолочных продуктов, а также снизить риск контаминации готовой продукции патогенной микробиотой. Для этого необходимо выделять, идентифицировать, определять свойства бактериофагов, циркулирующих на предприятиях, принимая во внимание, что на каждом отдельном предприятии присутствуют определенные виды (типы) фагов, что обусловлено ассортиментом выпускаемой продукции, применяемыми видами заквасок и соблюдением санитарно-гигиенических условий. В статье представлены исследования по выделению и характеристике бактериофагов лактококков. Из 51 фагосодержащего образца продукции, отобранного на территории Республики Беларусь, выделено 68 бактериофагов. Определен спектр их литической активности. На основании результатов ПЦР с видоспецифичными праймерами 39 бактериофагов отнесены к виду С2. Один бактериофаг по результатам ПЦР идентифицирован как вид Р335. Бактериофагов вида 936 среди выделенных вирусов не выявлено. Проведена дифференциация лактококкофагов вида С2. Проведен подбор рестриктаз, позволяющих различать фаги внутри вида С2. Разработана схема внутривидовой дифференциации бактериофагов лактококков с помощью ПДРФ-анализа. Использование ПДРФ-анализа позволило разделить 39 лактофагов вида С2 на шесть групп. **Благодарности.** Работа выполнена в рамках исследований по заданию 9.5.50 «Изучение видового разнообразия молочнокислых бактерий, выделенных из природных источников, изменчивости фагов лактококков, выделенных на молокоперерабатывающих предприятиях, в зависимости от сезонности и региональности» ГПНИ «Инновационные технологии в АПК».

Ключевые слова: бактериофаги, лизаты, ПЦР, рестрикция, ПДРФ-анализ

Для цитирования: Василенко, С. Л. Изучение разнообразия бактериофагов лактококков, выделенных из ферментированных молочных продуктов, с использованием молекулярно-генетических методов / С. Л. Василенко, Н. Н. Фурик, А. Н. Казак // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. аграр. навук. – 2018. – Т. 56, № 1. – С. 109–121.

S. L. Vasylenko, N. N. Furyk, A. N. Kazak

The Institute of Meat and Dairy Industry, the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

STUDYING THE DIVERSITY OF LACTOCOCCI BACTERIOPHAGES OBTAINED FROM FERMENTED DAIRY PRODUCTS USING MOLECULAR GENETIC METHODS

Abstract: For production of fermented milk products in the territory of the Republic of Belarus, lactic acid bacteria related to р. *Lactococcus* are used more often. Continuous phage monitoring makes it possible to limit economic losses due to phagolysis at production of fermented milk products, as well as to reduce the risk of contamination of finished products with pathogenic microbiota. It is necessary to identify and determine the properties of bacteriophages for that circulating at enterprises, considering that at each individual enterprise there are no specific types (kinds) of phages, which is due to the assortment of products, types of ferments used and hygiene conditions. The article dwells on studies on isolation and characterization of lactococci bacteriophages. Of the 51 phagocontaining samples of products selected in the territory of the Republic of Belarus, 68

bacteriophages have been isolated. The spectrum of their lytic activity was determined. Based on the results of PCR with species specific primers, 39 bacteriophages are classified as C2 type. One bacteriophage was identified as P335 according to PCR results. 939 type bacteriophages were not detected among the isolated viruses. Differentiation of C2 type lactococcal phages was carried out. A selection of the restriction enzymes allowing to distinguish phages inside the C2 type is carried out. A scheme of intraspecific differentiation of lactococci bacteriophages was developed using RFLP analysis. RFLP-analysis allowed to divide 39 lactophages of type C2 into six groups. **Acknowledgements.** The work was carried out within the framework of research under task 9.5.50 “Study of species diversity of lactic acid bacteria obtained from natural sources, variability of lactococci phages obtained at milk processing plants, depending on season and region” of GPNI “Innovative technologies in agro-industrial complex”.

Keywords: bacteriophages, lysates, PCR, restriction, RFLP analysis, dairy products, lytic activity

For citation: Vasylenko S. L., Furyk N. N., Kazak A. N. Studying the diversity of lactococci bacteriophages obtained from fermented dairy products using molecular genetic methods / *Vestsi Natsyyanal'nay akademii navuk Belarusi. Seryya agrarnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian series*, 2018, vol. 56, no 1, pp. 109–121. (in Russian)

Введение. 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 для молочной промышленности [4–6]. 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. 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 [8, 10–13].

Бактериофаги широко распространены в природе, а мезофильные лактококки и другая технически важная микрофлора молока являются для них естественной экологической нишей [12, 13]. Фаги попадают в молоко сразу же после доения – после окончания бактерицидной фазы молока, при поступлении его на молочные заводы их количество может достигать 10^6 и более фаговых частиц в 1 мл сырого молока [10, 12, 13].

Особенностью фаговой инфекции является то, что она может протекать скрыто и достаточно долго существовать 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 резко повыситься, что приводит к вспышкам фаголизиса на внешне достаточно благополучных предприятиях [12, 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 [10, 12, 13]. При этом на каждом отдельном предприятии выделяются фаги определенных видов, различающихся по вирулентности и спектру литической активности. Высоковирулентные фаги, как правило, имеют широкий спектр литической активности [12, 13]. При этом опасность фаголизиса выше на крупных предприятиях, что обусловлено большими объемами переработки молока, получаемого из многих источников. Все это создает уникальные условия для их изменчивости, в результате чего появляются новые формы фагов [10–13].

Следовательно, необходимо постоянно контролировать фаговую ситуацию на молокоперерабатывающих предприятиях, а при производстве бактериальных заквасок учитывать их фагоустойчивость. Для этого необходимо выделять, идентифицировать, определять свойства бактериофагов, циркулирующих в настоящее время на предприятиях, принимая во внимание, что на каждом отдельном предприятии присутствуют определенные типы фагов, что обусловлено асортиментом выпускаемой продукции, применяемыми видами заквасок, соблюдением санитарно-гигиенических условий и работами по мониторингу бактериофагов [14–17].

Для подбора производственных штаммов с высокой фагоустойчивостью в первую очередь нужно иметь коллекцию диагностических бактериофагов. Все новые заквасочные культуры должны тестироваться с помощью набора типовых бактериофагов для выявления чувствительных к бактериофагам молочнокислых микроорганизмов [17–21].

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 сем. *Siphoviridae*, лишь некоторые – к *Podoviridae* [12, 14, 20]. С применением молекулярно-генетических методов (ДНК-ДНК-гибридизации, секвенирование генома) установлено, что фаги *L. lactis* подразделяются на 10 различающихся групп [14]. 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 [15, 16]. На территории Республики Беларусь распространены фаги видов С2 и 936, а также вида P034 сем. *Podoviridae* [17, 18]. В этой связи актуальным является изучение принадлежности фагов к наиболее значимым группам с помощью ПДРФ-анализа для проведения мониторинга циркуляции лактофагов на молокоперерабатывающих производствах с применением новых молекулярно-генетических подходов.

Материалы и методы исследований. Объектами исследований являлись 68 изолятов лактококкофагов, выделенных из 51 фагосодержащего образца молочной продукции, рассолов из соляных бассейнов, сыворотки подсырной и творожной и т.п., а также производственные, индикаторные и фагочувствительные культуры лактококков из Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов РУП «Институт мясо-молочной промышленности».

Культивирование микроорганизмов осуществляли в среде МРС [22]. Агаризованные плотные среды содержали 1,5 % агара, полужидкие среды – 0,6 % агара. Инкубировали микроорганизмы в термостате при $30 \pm 1^\circ\text{C}$. SB-буфер готовили согласно прописям, приведенным в [23].

Для получения изолированных негативных колоний бактериофагов готовили десятичные разведения подготовленной фагосодержащей пробы продукции. Получение и характеристика фагосодержащих проб продукции приведены в [24]. Индикаторную культуру выращивали в жидкой МРС среде при $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 16 ± 2 ч, после чего 0,3 мл выросшей культуры смешивали с 5 мл той же среды, содержащей 0,6 % агара, предварительно расплавленной и охлажденной до 45°C , и 1 мл подготовленного фагосодержащего образца из соответствующего десятичного разведения. Смесь равномерно распределяли по поверхности агаризованной среды, предварительно разлитой по 20 ± 5 мл в чашки Петри и подсушенной. После застывания верхнего слоя посеы инкубировали в термостате при $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 16 ± 2 ч. Для дальнейшей работы использовали чашки Петри с изолированными негативными колониями, различающимися по морфологии.

При получении лизата изолятов лактококкофагов использовали изолированные негативные колонии вирусов, отобранные из чашек Петри. В пробирку с $(1,0 \pm 0,01)$ мл жидкой среды МРС вносили бактериологической петлей индикаторную культуру и аккуратно вырезали негативную колонию бактериофага. Тщательно ресуспендировали и выдерживали в течение (45 ± 5) мин, после чего 0,3–0,5 мл инфицированного бульона вносили в пробирку со средой МРС, содержащей 0,6 % агара, и заливали в чашки Петри методом агаровых слоев. При получении на чашке Петри сплошной зоны лизиса в чашку добавляли 5–7 мл жидкой питательной среды и тщательно ресуспендировали верхний слой в добавленной среде. Полученный фаголизат очищали от бактериальных клеток и остатков агара путем центрифугирования при 3000–3600 об/мин в течение 30 мин.

Для проведения ПЦР использовали праймеры, обладающие специфичностью по отношению к лактофагам видов с2 (с2А (5' CAGGTGTAAGAGTTCGAGAACT 3') и с2С (5' TCAGATAATGCACCTGAATC 3')), P335 (P335А (5' GAAGCTAGGCGAATCAGTAA3') и P335В (5' GATTGCCATTTGCGCTCTGA3')) и 936 (936А (5' TCAATGGAAGACCAAGCGGA 3') и 936В (5' GTAGGAGACCAACCCAAGCC 3')).

При проведении ПЦР реакционная смесь (20 мкл) содержала 2 мкл 10X реакционного буфера (Праймтех, Беларусь), 1,5мМ $MgCl_2$, по 0,2 мМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, по 2 мкМ каждого из праймеров, 1 единицу Bio Taq – полимеразы (Праймтех, Беларусь). В качестве матрицы использовали 0,5 мкл лизата.

ПЦР проводили на термоциклере “MJ MINI CYCLER, 48-WELL” (Bio-Rad, USA). Реакцию начинали инкубированием смеси при 94 °С в течение 5 мин, затем следовало 35 циклов, состоящих из инкубаций: 94 °С – 45 с, 55 °С – 1 мин, 72 °С – 1 мин, а завершали выдерживанием смеси при 72 °С в течение 5 мин. Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле, содержащем этидиум бромид, в SB-буфере при напряжении 30В на начальном этапе (выход образцов из лунки) и дальнейшем повышении до 70 В. Гели фотографировали с помощью системы гель-документирования GelDoc XR System Image Lab (Bio-Rad, USA).

Рестрикцию ампликонов бактериофагов проводили согласно рекомендациям производителя Fermentas (Литва). Рестрикционная смесь содержала 5 мкл продукта амплификации, 1 мкл 10X буфера для рестрикции, 4 мкл деионизированной воды, 0,1–0,2 мкл (1–2 Ед) рестриктазы *Alu I* или *Taq I*. Рестрикционную смесь выдерживали в течение 4 ч при 37 °С (для рестриктазы *Alu I*) или при 65 °С (для рестриктазы *Taq I*). Для визуализации полученных в ходе рестрикции ДНК-фрагментов электрофорез проводили в 2%-ном агарозном геле, содержащем этидиум бромид, и SB-буфере при напряжении 30 В. Гели фотографировали с помощью системы гель-документирования GelDoc XR System Image Lab (Bio-Rad, USA).

Результаты и их обсуждение. Как было показано ранее, из 169 образцов молочной продукции (сметана и сметанный продукт, творог, сыр, ряженка, йогурт и йогуртный продукт, молоко сырое), приобретенной в торговой сети, а также образцов сыворотки творожной и подсырной, рассолов из соляных бассейнов, луж с пола цеха, проб воздуха и т.п., отобранных на молокоперерабатывающих предприятиях страны, 94 образца продукции содержали бактериофаги лактококков. По результатам анализа воздействия бактериофагосодержащей молочной продукции на индикаторные культуры установлено, что большая часть образцов, выделенных в различные периоды года (62 % зимой и летом, 70 % весной, 80 % осенью), содержала вирусы, лизирующие от 1 до 5 индикаторных культур [24]. Для выделения изолятов бактериофагов использовали 51 фагосодержащий образец продукции, содержащий вирусы, лизирующие наибольшее количество индикаторных культур, и произведенной на молокоперерабатывающих предприятиях всех шести областей Республики Беларусь в течение года. Среди зимних образцов для выделения вирусов использовали 5 вариантов творога и творожной сыворотки, 4 вида сметан и 7 сыра и подсырной сыворотки; из весенних образцов – 6 вариантов творога и творожной сыворотки, 6 видов сметан и 11 образцов сыра и подсырной сыворотки; из образцов летнего периода – 8 вариантов творога и творожной сыворотки, 5 видов сметан и 9 образцов сыра и подсырной сыворотки. Получено 68 чистых линий бактериофагов.

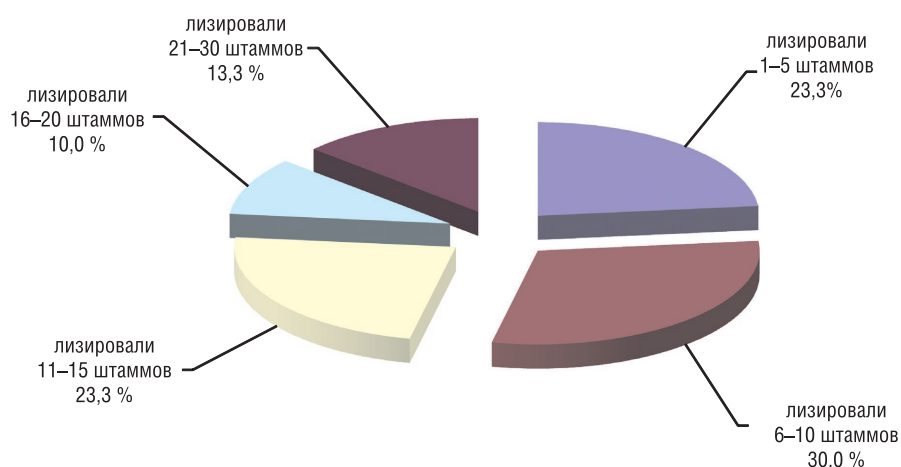


Рис. 1. Характеристика выделенных бактериофагов лактококков по спектру литической активности
Fig. 1. Characteristic of the obtained lactococci bacteriophages according to lytic activity spectrum

Для выделенных 68 бактериофагов получены лизаты, содержащие не менее 1×10^8 БОЕ/мл. Проведено определение спектра их литической активности. Для этого использовали 62 штаммов лактококков: 36 фагочувствительных и индикаторных культур, используемых для определения фагочувствительности, и 26 коллекционных штаммов, используемых для изготовления на их основе бактериальных заквасок (рис. 1).

Как видно на рис. 1, все 68 выделенных лактофагов лизировали до 30 из 62 исследованных культур: 23,3 % вирусов лизировали от 1 до 5 штаммов, 30 % – от 6 до 10 штаммов, 23,3 % – от 11 до 15 штаммов, 10 % – от 16 до 20 штаммов, 13,3 % – от 21 до 30 штаммов.

Проведена идентификация 68 бактериофагов лактококков с помощью видоспецифичной полимеразной цепной реакции, для чего использовали праймеры, видоспецифичные к бактериофагам видов С2, 936, Р335. В качестве негативного контроля использовали ПЦР смесь без добавления матрицы.

В результате амплификации с использованием С2 видоспецифичных праймеров синтезирован фрагмент гена *msc* (основного белка капсида), который является консервативной областью фагов вида С2. Для 39 бактериофагов (в7/1, в13/1, в13/2, в14/1, в15/1, в17/1, в17/2, в17/3, в19/1, в20/1, в21/2, в22/2, в23/4, в26/1, в27/2, в28/1, в31/1, в31/2, в39/2, в46/1, в46/2, л2/1, л16/1, л16/2, л18/1, л18/2, л23/1, л23/2, л24/1, л24/2, л25/1, л25/2, л25/3, з18/3, з19/2, з38/1, з40/1, з40/2, о42/1) получены ампликоны с размером около 475 п.о.

Для 29 фагов (в9/1, в14/2, л15/1, л15/2, л19/1, л30/1, л31/1, л31/3, л36/1, л36/2, л37/1, л37/2, л38/1, л38/2, л40/1, л42/1, л43/1, л43/2, л54/1, з11/1, з15/1, з15/2, з15/3, з19/1, з29/1, з32/1, з38/2, з38/3, о42/2), принадлежность которых к виду С2 не была установлена, проводили полимеразную цепную реакцию с праймерами, специфичными для видов Р335 и 936

По результатам проведения видоспецифичной ПЦР с праймерами для вида Р335 в образце л40/1 синтезирован фрагмент длиной около 672 п.о, что соответствует размеру консервативной области фагов вида Р335. Бактериофагов вида 936 среди выделенных вирусов не обнаружено.

Как видно из полученных результатов, особый интерес для наших исследований представляют фаги вида С2, как наиболее распространенные на молокоперерабатывающих предприятиях Республики Беларусь. Еще в 1988 г. Pillidge и Jarvis сообщили о построении рестрикционной карты фага С2 [25], а в настоящее время проведено секвенирование и анализ структурных генов данного фага. Установлено, что размер генома фага С2 составляет 22163 п.о. Идентифицировано 39 открытых рамок считывания, «ранний» и «поздний» промоторы, терминатор транскрипции. Составлена детальная транскрипционная карта фага С2 [26, 27].

При анализе генома еще одного фага данной группы – bIL 67 – установлено, что его структура на 80 % сходна со структурой фага С2 [28]. Секвенирование геномов нескольких представителей фагов данной группы позволило выявить консервативные последовательности для каждой из них и подобрать праймеры, позволяющие проводить идентификацию вновь изолированных фагов [29–31]. Метод ПДРФ-анализа позволяет выявлять различия внутри консервативной области геномов лактофагов вида С2 и проводить внутривидовую дифференциацию коллекционных и вновь выделенных лактофагов.

Для дифференциации бактериофагов лактококков внутри вида разработали схему проведения ПДРФ-анализа. В настоящее время в открытом доступе содержатся сведения о строении геномов около 20 лактококкофагов. Для работы выбраны бактериофаги вида С2, для которых известны нуклеотидные последовательности их консервативных областей: bIL67(L33769), Q38(AF152411), Q44(AF152412), c2(L48605), eb1(AF152410), GR6 (DQ110948), CB17 (DQ110947). Для разработки схемы дифференциации лактококкофагов использовали нуклеотидные последовательности консервативных областей гена, кодирующего основной белок капсида. Для фагов вида С2 это участок гена длиной 475 п.о.

С помощью программы MEGA 5.1 проведен анализ схожести нуклеотидных последовательностей фагов внутри консервативных областей для семи фагов вида С2 (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Различие в нуклеотидных последовательностях консервативных областей фагов вида C2, %
 T a b l e 1. Difference in nucleotide sequences of conservative areas of C2 type phages, %

Фаг	bIL67	Q44	c2	CB17	eb1	GR6	Q38
bIL67	–	9,302	8,759	8,743	8,759	8,743	8,984
Q44		–	6,165	6,416	6,165	6,416	5,023
c2			–	5,727	0,000	5,727	5,601
CB17				–	5,727	0,000	6,004
eb1					–	5,727	5,601
GR6						–	6,004
Q38							–

Как видно из табл. 1, для фагов вида C2 варибельность генных последовательностей составляет около 5–9 %.

Данные исследований позволяют предположить наличие рестриктаз, с применением которых будут получены рестрикционные фрагменты различной длины, что позволит дифференцировать фаги внутри вида. Для проведения рестрикционного анализа продуктов амплификации поиск ферментов осуществляли с помощью программы Biosequence editor. Установлено, что для дифференциации фагов вида C2 наиболее оптимально использовать рестриктазы *Mwo* I, *Alu* I, *Taq* I.

С помощью программы MapDraw (DNASar Inc.) составлены рестрикционные карты исследуемых фагов (рис. 2).

Как видно на рис. 2, известные фаги вида C2 можно разделить на 5 групп: C2, eb1; CB17, GR6; Q38; Q44; bIL67.

Таким образом, для дальнейшей работы выбраны рестриктазы *Alu* I и *Taq* I, позволяющие достоверно различать фаги между собой.

Для 39 штаммов лактофагов, отнесенным к виду C2 по результатам видоспецифичной ПЦР, проведена внутривидовая дифференциация с использованием ПДРФ-анализа консервативных областей бактериофагов лактококков данного вида.

Полученные в результате проведения ПЦР ампликоны подвергали воздействию ферментов рестрикции *Alu* I и *Taq* I в двух независимых реакциях. Результаты рестрикции представлены на рис. 3, 4 и в табл. 2.

Анализ табл. 2 и рис. 3, 4 показал, что лактофаги, отнесенные к виду C2, при обработке ферментами рестрикции дают различные рестрикционные профили, что позволяет дифференцировать их на группы внутри вида.

Учитывая результат воздействия двух рестриктаз на продукты амплификации – *Alu* I и *Taq* I, у исследованных бактериофагов лактококков выделили 6 различных ПДРФ-профилей и, соответственно, 6 различных внутривидовых групп:

– *группа 1*: при обработке рестриктазой *Alu* I дают видимые фрагменты длиной около 330 и 110 п.о., и при обработке рестриктазой *Taq* I дают видимые фрагменты длиной около 430 и 30 п.о. (16 фагов);

– *группа 2*: при обработке рестриктазой *Alu* I дают видимые фрагменты длиной около 290 и 170 п.о., и при обработке рестриктазой *Taq* I дают видимый фрагмент длиной около 460 п.о. (1 фаг);

– *группа 3*: при обработке рестриктазой *Alu* I дают видимые фрагменты длиной около 330 и 110 п.о., и при обработке рестриктазой *Taq* I дают видимые фрагменты длиной около 460 п.о. (13 фагов);

– *группа 4*: при обработке рестриктазой *Alu* I дают видимые фрагменты длиной около 290 и 110 п.о., и при обработке рестриктазой *Taq* I дают видимые фрагменты длиной около 460 п.о. (6 фагов);

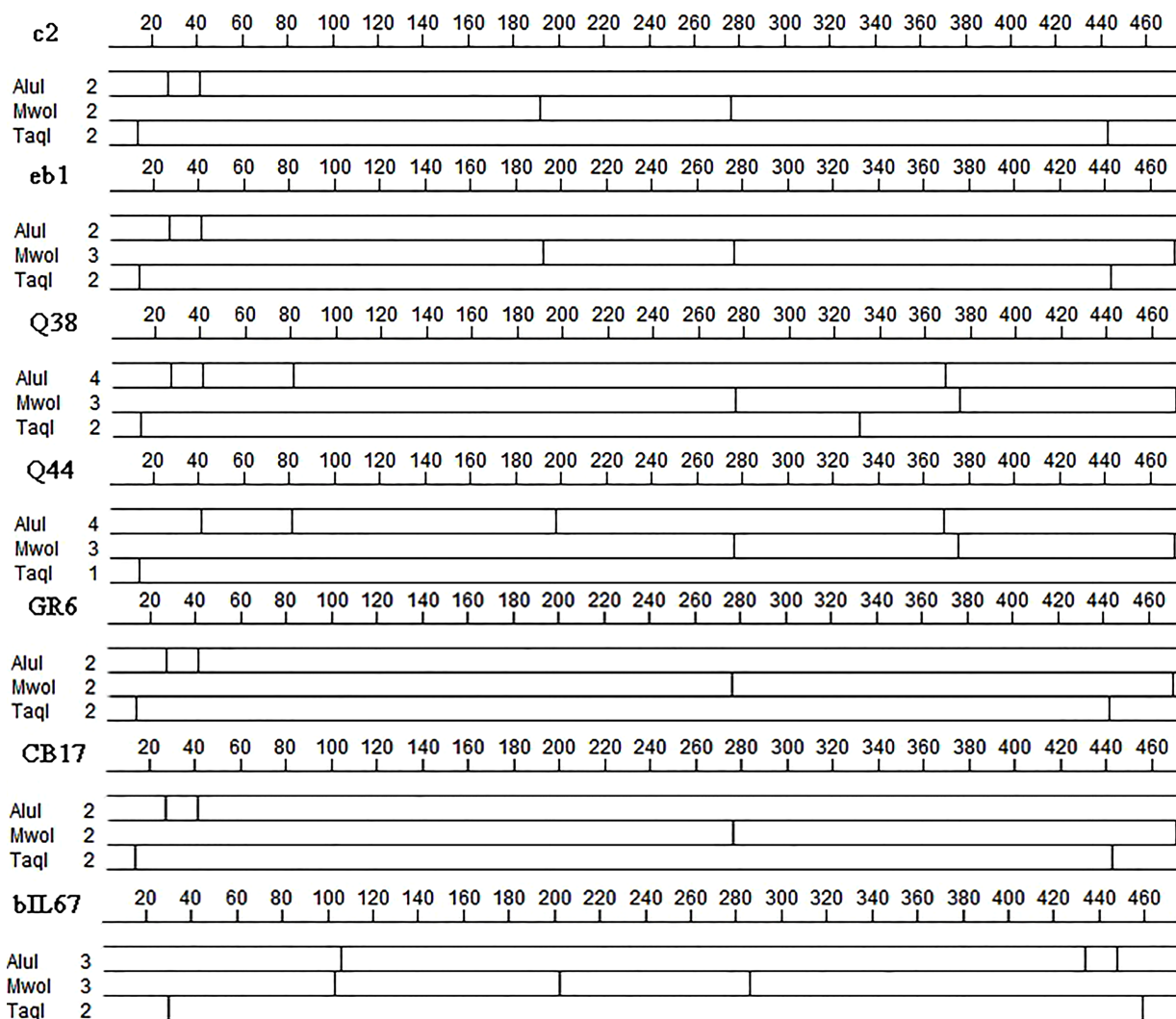


Рис. 2. Рестрикционный анализ консервативных последовательностей лактофагов вида C2. В верхней части каждой рестрикционной карты представлена длина исследуемой последовательности (п.о) и показаны места рестрикции исследуемой последовательности каждым ферментом

Fig. 2. Restriction analysis of conservative sequences of C2 type lactophages. At the top of each restriction map the length of the examined sequence is presented; the restriction points of the sequence studied by each enzyme are shown

– группа 5: при обработке рестриктазой *Alu* I дают видимые фрагменты длиной около 170 и 110 п.о., и при обработке рестриктазой *Taq* I дают видимый фрагмент длиной около 460 п.о. (2 фага);

– группа 6: при обработке рестриктазой *Alu* I дают видимые фрагменты длиной около 170 и 110 п.о., и при обработке рестриктазой *Taq* I дают видимые фрагменты длиной около 430 и 30 п.о. (1 фаг).

Таким образом, среди лактококкофагов вида C2, выделенных на территории Республики Беларусь, преобладают вирусы, для которых рестрикционный анализ продукта амплификации *тср*-гена эндонуклеазой *Alu* I позволяет визуализировать фрагменты размером около 330 и 110 п.о. – подвиды 1 и 3, различающиеся между собой размером рестрикционных фрагментов, получаемых с использованием фермента *Taq* I (рис. 5).

Среди чистых линий бактериофагов, выделенных из образцов продукции, изготовленной в зимний период, идентифицировать удалось лишь 35,7 % вирусов, в весенний период – 91,3 % вирусов, в летний – 48,3 %, в осенний – 50 % выделенных лактококкофагов.

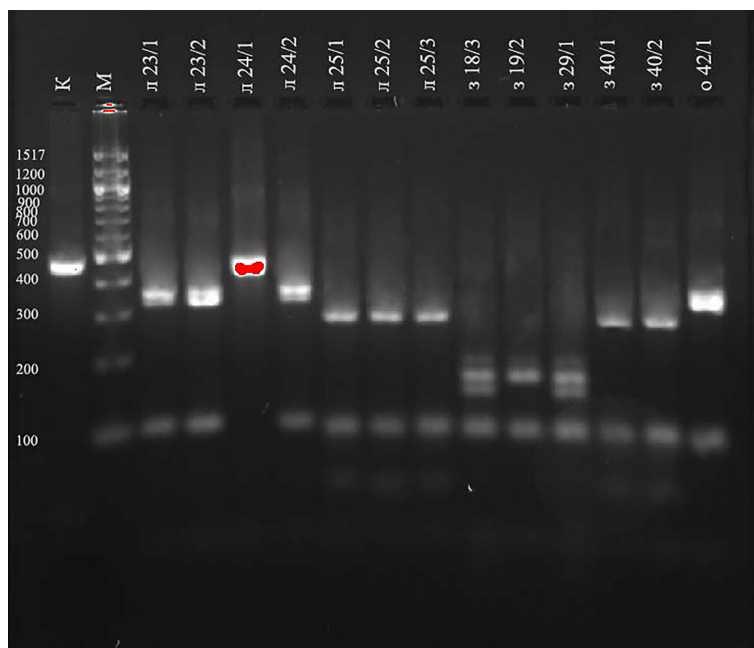


Рис. 3. Электрофоретический анализ продуктов обработки ампликонов ДНК рестриктазой *Alu* I. Дорожка 1 – продукт амплификации, не подвергнутый рестрикции; дорожка 2 – молекулярный маркер 100 bp DNA Ladder (Biolabs); дорожки 3–15 – продукты амплификации чистых линий лактофагов, подвергнутые рестрикции ферментом *Alu* I
 Fig. 3. Electrophoretic analysis of DNA amplicons sample products treated with restriction enzyme *Alu* I. Lane 1 – unrestricted amplification product, lane 2 – molecular marker 100 bp DNA Ladder (Biolabs), lanes 3–15 – amplification products of the pure lactophage lines that were restricted by *Alu* I enzyme

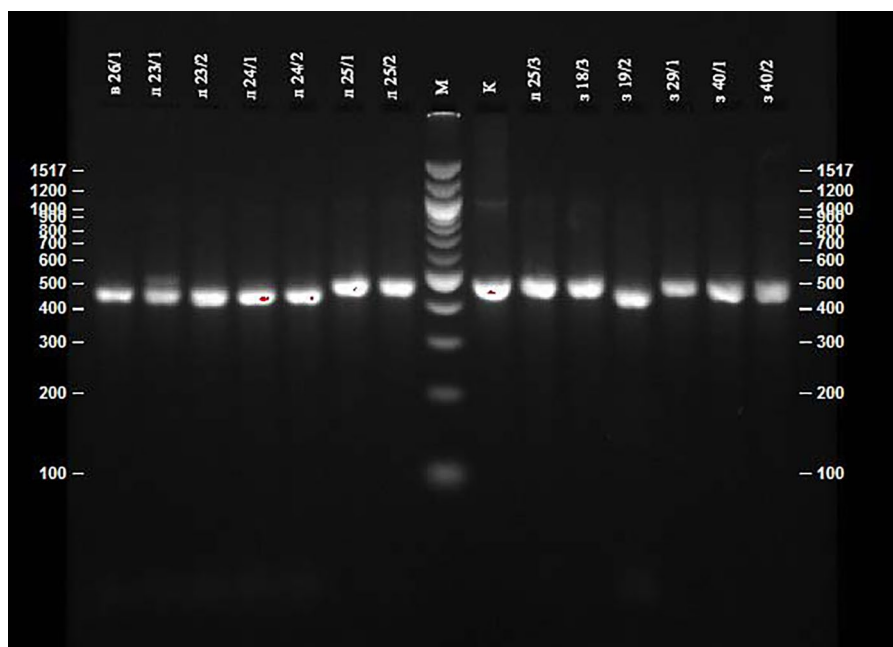


Рис. 4. Электрофоретический анализ продуктов обработки ампликонов ДНК рестриктазой *Taq* I. Дорожки 1–7, 10–15 – продукты амплификации чистых линий лактофагов, подвергнутые рестрикции ферментом *Taq* I, дорожка 8 – молекулярный маркер 100 bp DNA Ladder (Biolabs), дорожка 9 – продукт амплификации, не подвергнутый рестрикции
 Fig. 4. Electrophoretic analysis of DNA amplicons sample products treated with restriction enzyme *Taq* I. Lanes 1–7, 10–15 – amplification products of the pure lactophage lines that were restricted by *Taq* I enzyme, lane 8 – molecular marker 100 bp DNA Ladder (Biolabs), lane 9 – unrestricted amplification product).

Т а б л и ц а 2. Д л и н а р е с т р и к ц и о н н ы х ф р а г м е н т о в п о с л е о б р а б о т к и п р о д у к т о в П Р Ц ф е р м е н т а м и р е с т р и к ц и и

T a b l e 2. L e n g t h o f r e s t r i c t i o n f r a g m e n t s a f t e r p r o d u c t s t r e a t m e n t b y P C R r e s t r i c t i o n e n z y m e s

Лактофаги	Длина фрагментов рестрикции после обработки рестриктазой <i>Alu</i> I, п.о.					Длина фрагментов рестрикции после обработки рестриктазой <i>Taq</i> I, п.о.			Тип ПДРФ-профиля
	~475 п.о.	~330 п.о.	~290 п.о.	~170 п.о.	~110 п.о.	~460 п.о.	~430 п.о.	~30 п.о.	
в 7/1, в 13/1, в 13/2, в 15/1, в 26/1, в 27/2, в 28/1, в 31/1, в 31/2, л 16/1, л 16/2, л 23/1, л 23/2, л 24/1, о 42/1, л 24/2	–	+	–	–	+	–	+	+	1
в 14/1	–	–	+	+	–	+	–	–	2
в 17/1, в 17/2, в 17/3, в 19/1, в 20/1, в 21/2, в 22/2, в 23/4, в 46/1, в 46/2, л 2/1, л 18/1, л 18/2	–	+	–	–	+	+	–	–	3
в 39/1, л 25/1, л 25/2, л 25/3, з 40/1, з 40/2	–	–	+	–	+	+	–	–	4
з 18/3, з 29/1	–	–	–	+	+	+	–	–	5
з 19/1	–	–	–	+	+	–	+	+	6

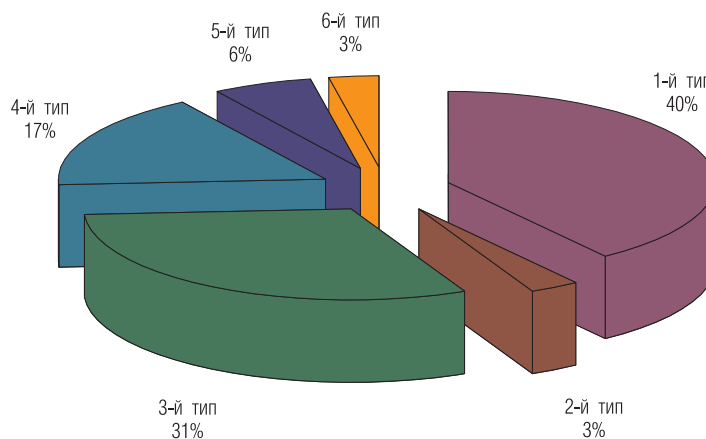


Рис. 5. Дифференциация лактококкофагов вида С2 установленная на основании ПДРФ-анализа

Fig. 5. Differentiation of C2 type lactococci phages based on RFLP analysis

Среди лактококкофагов, выделенных в зимний период года, выявлены лактококкофаги только трех типов: 4-го, 5-го и 6-го типа. Для всех идентифицированных бактериофагов зимнего периода при рестрикционном анализе продукта амплификации, обработанного ферментом *Alu* I, характерно образование фрагмента длиной около 110 п.о. Среди фагов, выделенных в летний период, преобладали вирусы 1-го и 3-го типа, в то же время не регистрировали наличия фагов 5 и 6 групп. Среди летних бактериофагов регистрировали бактериофаги вида С2, относящиеся к 1, 3 и 4 группам. Таким образом, бактериофаги вида С2 типов 5 и 6 встречаются только в продукции, изготовленной в зимний период; бактериофаги вида С2 тип 2 выявлены только в летний период, бактериофаги 4-го типа выявлены в образцах продукции, отобранных в зимний, весенний и летний периоды (рис. 6).

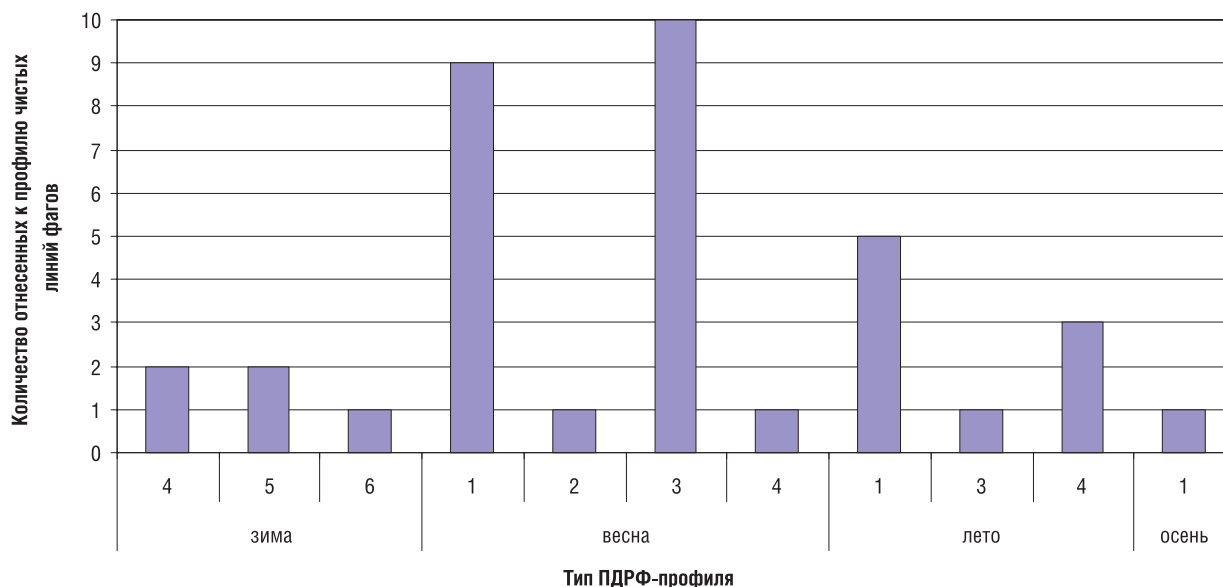


Рис. 6. Анализ внутривидовой принадлежности вновь выделенных лактофагов в зависимости от сезонности.

Fig. 6. Analysis of intraspecific affiliation of newly obtained lactophagi depending on season

Выводы

1. Из 51 фагосодержащих образцов продукции выделено 68 чистых линий бактериофагов, для которых получены фаголизаты содержащие не менее 1×10^8 БОЕ/мл. Определен спектр литической активности вновь выделенных бактериофагов с использованием 36 культур, используемых для определения фагочувствительности, и 26 производственных коллекционных штаммов.

2. С использованием имеющихся данных о генетическом строении консервативных областей 7 лактококкофагов, относящихся к виду С2, и программного обеспечения проведен подбор рестриктаз, позволяющих различать фаги внутри видов. Разработана схема внутривидовой дифференциации бактериофагов лактококков с помощью ПДРФ-анализа.

3. На основании результатов ПЦР с видоспецифичными праймерами 39 бактериофагов отнесены к виду С2. 1 бактериофаг по результатам ПЦР идентифицирован как вид Р335. Бактериофагов вида 936 среди выделенных вирусов не выявлено. 28 бактериофагов с использованием видоспецифичной ПЦР отнести к видам С2, 936 и Р335 не удалось. Установлено, что среди промышленных бактериофагов преобладают лактококкофаги вида С2.

4. Показана дифференцирующая способность рестриктаз *Alu I* и *Taq I*. Проведена дифференциация лактококкофагов внутри вида С2 с применением видоспецифичной ПЦР, а также путем сравнения длин рестрикционных фрагментов, полученных в результате обработки продуктов ПЦР ферментами рестрикции.

5. Использование ПДРФ-анализа позволило разделить 39 лактофагов вида С2 на шесть групп, из которых наиболее распространенными оказались 1 и 3, для которых рестрикционный анализ продукта амплификации *msr*-гена эндонуклеазой *Alu I* позволяет визуализировать фрагменты размером около 330 и 110 п.о. – подвиды 1 и 3, различающиеся между собой рестрикционным профилем, получаемым с использованием фермента *Taq I*. Установлено, что бактериофаги вида С2 типов 5 и 6 встречаются только в продукции, изготовленной в зимний период; бактериофаги вида С2 2-го типа выявлены только в продукции летнего периода, бактериофаги 4-го типа выявлены в образцах продукции, отобранных в зимний, весенний и летний периоды, а 1-го типа – в весенний, летний и осенний периоды.

6. Установлено, что при выделении бактериофагов из образцов молочной продукции вне зависимости от места и времени отбора продукции вирусы обладают различным спектром литической активности. Фаги, выделенные в зимнее время, лизировали, в среднем, 13,3 % индикаторных и фагочувствительных культур, выделенные весной – 22,2 % культур, летом – 22,8 % культур, осенью – 16,6 %. Максимальную литическую активность регистрировали для вирусов,

выделенных из образцов сыра, изготовленных в Гродненской обл.: отобранного зимой л32/1 (лизировал 61,1 % культур) и отобранного летом л32/2 (лизировал 63,9 % культур), а также творога, изготовленного в Брестской области, в20/1 (лизировал 61,1 % культур).

Благодарности. Работа выполнена в рамках исследований по заданию 9.5.50 «Изучение видового разнообразия молочнокислых бактерий, выделенных из природных источников, изменчивости фагов лактококков, выделенных на молокоперерабатывающих предприятиях, в зависимости от сезонности и региональности» ГПНИ «Инновационные технологии в АПК».

Список использованных источников

1. Кувалдина, Н. Как «обезопасить» молочную продукцию / Н. Кувалдина, Н. Сорокина // Сфера: мир продуктов. – 2005. – № 3. – С. 22–25.
2. Species and type phages of lactococcal bacteriophages / A. W. Jarvis [et al.] // Intervirology. – 1991. – Vol. 32, N 1. – P. 2–9. DOI: 10.1159/000150179
3. Ackermann, H. W. Phage multiplication / H.-W. Ackermann, M. S. DuBow // Viruses of prokaryotes / H. W. Ackermann, M. S. DuBow. – Boca Raton, 1987. – Vol. 1 : General Properties of Bacteriophages. – P. 49–85.
4. Основы бактериофагии : учеб. пособие / под общ. ред. И. М. Габриловича. – Изд. 2-е. – Минск : Выш. шк., 1973. – 224 с.
5. Сельсков, А. Н. Биологическая характеристика и классификация бактериофагов молочнокислых стрептококков : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07 / А. Н. Сельсков ; Акад. наук БССР, Ин-т микробиологии. – Минск, 1979. – 22 с.
6. Hammes, W. P. The Genera Lactobacillus and Carnobacterium / W. P. Hammes, N. Weiss, W. Holzapfel // The Prokaryotes : a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications / ed.: A. Balows [et al.]. – Heidelberg, 1992. – Vol. 2. – P. 1535–1594.
7. Cluzel, P.-J. Interactions of Lactobacillus bulgaricus temperature bacteriophage 0448 with host strains / P.-J. Cluzel, J. Serio, J.-P. Accolas // Appl. a. Environmental Microbiology. – 1987. – Vol. 53, N 8. – P. 1850–1854.
8. Гудков, А. В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты / А. В. Гудков ; под ред. С. А. Гудкова. – М. : ДеЛи принт, 2003. – 799 с.
9. Bacteriophages of the genus Lactobacillus / T. Sozzi [et al.] // Intervirology. – 1981. – Vol. 16, N 3. – P. 129–135. DOI: 10.1159/000149259
10. Состояние фагового фона на отечественных молочных предприятиях / В. И. Ганина [и др.] // Молоч. пром-сть. – 2005. – № 10. – С. 20–21.
11. Скотт, Р. Производство сыра: научные основы и технологии / Р. Скотт, Р. К. Робинсон, Р. А. Уилби ; пер. с англ. 3-го изд. ; под общ. ред. К. К. Горбатовой. – СПб. : Профессия, 2005. – 460 с. DOI: 10.1007/978-1-4615-5819-4
12. Brussow, H. Phages of dairy bacteria / H. Brussow // Annu. Rev. of Microbiology. – 2001. – Vol. 55. – P. 283–303. DOI: 10.1146/annurev.micro.55.1.283
13. Снятковский, М. В. Бактериофаги в молочном производстве и борьба с ними / М. В. Снятковский, Р. З. Карычев, Г. П. Шаманова // Перераб. молока. – 2006. – № 5. – С. 20–21.
14. Characterization of lactococcal bacteriophages from Quebec cheese plants / S. Moineau [et al.] // Canad. J. of Microbiology. – 1992. – Vol. 38, N 9. – P. 875–882. DOI: 10.1139/m92-143
15. Biodiversity and classification of lactococcal phages / H. Deveau [et al.] // Appl. a. Environmental Microbiology. – 2006. – Vol. 72, N 6. – P. 4338–4346. DOI: 10.1128/aem.02517-05
16. Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the United States / S. Moineau [et al.] // J. of Dairy Science. – 1996. – Vol. 79, N 12. – P. 2104–2111. DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(96)76584-0
17. Фенотипическая характеристика лактофагов молочных продуктов / А. Райский [и др.] // Наука и инновации. – 2008. – № 4. – С. 36–40.
18. Коллекция бактериофагов и индикаторных культур молочнокислых бактерий / Н. Фурик [и др.] // Наука и инновации. – 2008. – № 1. – С. 31–33.
19. Raiski, A. Biodiversity of Lactococcus lactis bacteriophages in the Republic of Belarus / A. Raiski, N. Belyasova // Intern. J. of Food Microbiology. – 2009. – Vol. 130, N 1. – P. 1–5. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.024
20. Райский, А. П. Биоразнообразие и идентификация распространенных на молочных комбинатах Беларуси лактофагов / А. П. Райский, С. Н. Шпилевский, Н. А. Белясова // Тр. БГТУ. Сер. IV, Химия и технология орган. веществ. – 2008. – Вып. 16. – С. 166–168.
21. Biodiversity of Lactococcus lactis bacteriophages in Polish dairy environment / A. K. Szczepańska [et al.] // Acta Biochimica Polonica. – 2007. – Vol. 54, N 1. – P. 151–158.
22. De Man, J. C. A medium for the cultivation of lactobacilli / J. C. de Man, M. Rogosa, M. E. Sharpe // J. of Appl. Bacteriology. – 1960. – Vol. 23, N 1. – P. 130–135. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x
23. Brody, J. R. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis / J. R. Brody, S. E. Kern // BioTechniques. – 2004. – Vol. 36, N 2. – P. 214–216.
24. Казак, А. Н. Изучение распространенности бактериофагов в ферментированных молочных продуктах / А. Н. Казак, С. Л. Василенко, Н. Н. Фурик // Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья : сб. науч. тр. / Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по продовольствию, Ин-т мясо-молоч. пром-сти ; редкол.: А. В. Мелешня [и др.]. – Минск, 2014. – Вып. 8. – С. 117–129.

25. Pillidge, C.J. DNA restriction maps and classification of the lactococcal bacteriophages c2 and sk1 / C.J. Pillidge, A. W. Jarvis // *New Zealand J. of Dairy Science a. Technology.* – 1988. – Vol. 23. – P. 411–416.
26. Sequencing and analysis of the prolate-headed lactococcal bacteriophage c2 genome and identification of the structural genes / M. W. Lubbers [et al.] // *Appl. a. Environmental Microbiology.* – 1995. – Vol. 61, N 12. – P. 4348–4356.
27. Transcription analysis of the prolate-headed lactococcal bacteriophage c2 / M. W. Lubbers [et al.] // *J. of Bacteriology.* – 1998. – Vol. 180, N 17. – P. 4487–4496.
28. Schouler, C. Sequence and organization of the lactococcal prolate-headed bIL67 phage genome / C. Schouler, S. D. Ehrlich, M. C. Chopin // *Microbiology.* – 1994. – Vol. 140, N 11. – P. 3061–3069. DOI: 10.1099/13500872-140-11-3061
29. Ackermann, H. W. Curated list of prokaryote viruses with fully sequenced genomes / H. W. Ackermann, A. M. Kropinski // *Research in Microbiology.* – 2007. – Vol. 158, N 7. – P. 555–566. DOI: 10.1016/j.resmic.2007.07.006
30. Labrie, S. Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages / S. Labrie, S. Moineau // *Appl. a. Environmental Microbiology.* – 2000. – Vol. 66, N 3. – P. 987–994. DOI: 10.1128/aem.66.3.987-994.2000
31. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk / B. del Rio [et al.] // *Food Microbiology.* – 2007. – Vol. 24, N 1. – P. 75–81. DOI: 10.1016/j.fm.2006.03.001

References

1. Kuvaldina N., Sorokina N. How to "secure" dairy products. *Sfera: mir produktov* [Sphere: the world of products], 2005, no. 3, pp. 22–25 (in Russian).
2. Jarvis A. W., Fitzgerald G. F., Mata M., Mercenier A., Neve H., Powell I. B., Ronda C., Saxelin M., Teuber M. Species and type phages of lactococcal bacteriophages. *Intervirology*, 1991, vol. 32, no. 1, pp. 2–9. DOI: 10.1159/000150179
3. Ackermann H.-W., DuBow M. S. Phage multiplication. *Viruses of prokaryotes. Vol. 1. General properties of bacteriophages.* Boca Raton, 1987, pp. 49–85.
4. Gabrilovich I. M. (ed.) *Bases of bacteriophagy.* 2nd ed. Minsk, Vysheishaya shkola Publ., 1973. 224 p. (in Russian).
5. Sel'skov A. N. *Biological characteristics and classification of bacteriophages of lactic streptococci.* Abstract of doctoral thesis in biology Minsk, 1979. 22 p. (in Russian).
6. Hammes W. P., Weiss N., Holzapfel W. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. The *Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Heidelberg, 1992, vol. 2, pp. 1535–1594.
7. Cluzel P.-J., Serio J., Accolas J.-P. Interactions of *Lactobacillus bulgaricus* temperature bacteriophage 0448 with host strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, vol. 53, no. 8, pp. 1850–1854.
8. Gudkov A. V., Gudkov S. A. (ed.) *Cheese-making: technological, biological and physicochemical aspects.* Moscow, DeLi print Publ., 2003. 799 p. (in Russian).
9. Sozzi T., Watanabe K., Stetter K., Smiley M. Bacteriophages of the genus *Lactobacillus*. *Intervirology*, 1981, vol. 16, no. 3, pp. 129–135. DOI: 10.1159/000149259
10. Ganina V. I., Volkova I. R., Kalinina L. V., Borisova L. A. State of phage background at domestic dairy enterprises. *Molochnaya promyshlennost'* [Dairy Industry], 2005, no. 10, pp. 20–21 (in Russian).
11. Scott R., Robinson R. K., Wilbey R. A. *Cheesemaking practice.* 3rd ed. Gaithersburg, Aspen Publishers Inc., 1998. 449 p. DOI: 10.1007/978-1-4615-5819-4
12. Brussow H. Phages of dairy bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 2001, vol. 55, pp. 283–303. DOI: 10.1146/annurev.micro.55.1.283
13. Snyatkovskii M. V., Karychev R. Z., Shamanova G. P. Bacteriophages in dairy production and their control. *Pererabotka moloka* [Processing of milk], 2006, no. 5, pp. 20–21 (in Russian).
14. Moineau S., Fortier J., Ackermann H. W., Pandian S. Characterization of lactococcal bacteriophages from Quebec cheese plants. *Canadian Journal of Microbiology*, 1992, vol. 38, no. 9, pp. 875–882. DOI: 10.1139/m92-143
15. Deveau H., Labrie S. J., Chopin M. C., Moineau S. Biodiversity and classification of lactococcal phages. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, vol. 72, no. 6, pp. 4338–4346. DOI: 10.1128/aem.02517-05
16. Moineau S., Borckaev M., Holler B. J., Walker S. A., Kondo J. K., Vedamuthu E. R., Vandenberg P. A. Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the United States. *Journal of Dairy Science*, 1996, vol. 79, no. 12, pp. 2104–2111. DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(96)76584-0
17. Raiskii A., Bataev A., Novik G., Belyasova N. Phenotypic characteristics of lactococcal phages of dairy products. *Nauka i innovatsii* [Science and Innovation], 2008, no. 4, pp. 36–40 (in Russian).
18. Furik N., Safronenko L., Dudko N., Kononovich E. Collection of bacteriophages and indicator cultures of lactic acid bacteria. *Nauka i innovatsii* [Science and Innovation], 2008, no. 1, pp. 31–33 (in Russian).
19. Raiski A., Belyasova N. Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in the Republic of Belarus. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, vol. 130, no. 1, pp. 1–5. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.024
20. Raiskii A. P., Shpilevskii S. N., Belyasova N. A. Biodiversity and identification of prevalent lactophages at dairy plants of Belarus. *Trudy BGTU. Seriya IV. Khimiya i tekhnologiya organicheskikh veshchestv* [Proceedings of the Belarusian State Technological University. Series IV. Chemistry and Technology of Inorganic substances], 2008, no. 16, pp. 166–168 (in Russian).
21. Szczepańska A. K., Hejnowicz M. S., Kołakowski P., Bardowski J. Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in Polish dairy environment. *Acta Biochimica Polonica*, 2007, Vol. 54, no. 1, pp. 151–158.
22. De Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 1960, vol. 23, no. 1, pp. 130–135. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x

23. Brody J. R., Kern S. E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *BioTechniques*, 2004, vol. 36, no. 2, pp. 214–216.
24. Kazak A. N., Vasilenko S. L., Furik N. N. Study of bacteriophages occurrence in fermented dairy products. *Aktual'nye voprosy pererabotki myasnogo i molochnogo syr'ya: sbornik nauchnykh trudov* [Topical issues of processing of meat and milk raw materials: a collection of research papers]. Minsk, 2014, no. 8, pp. 117–129 (in Russian).
25. Pillidge C. J., Jarvis A. W. DNA restriction maps and classification of the lactococcal bacteriophages c2 and sk1. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 1988, vol. 23, pp. 411–416.
26. Lubbers M. W., Waterfield N. R., Beresford T. P., Le Page R. W., Jarvis A. W. Sequencing and analysis of the prolate-headed lactococcal bacteriophage c2 genome and identification of the structural genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, vol. 61, no. 12, pp. 4348–4356.
27. Lubbers M. W., Schofield K., Waterfield N. R., Polzin K. M. Transcription analysis of the prolate-headed lactococcal bacteriophage c2. *Journal of Bacteriology*, 1998, vol. 180, no. 17, pp. 4487–4496.
28. Schouler C., Ehrlich S. D., Chopin M. C. Sequence and organization of the lactococcal prolate-headed bIL67 phage genome. *Microbiology*, 1994, vol. 140, no. 11, pp. 3061–3069. DOI: 10.1099/13500872-140-11-3061
29. Ackermann H. W., Kropinski A. M. Curated list of prokaryote viruses with fully sequenced genomes. *Research in Microbiology*, 2007, vol. 158, no. 7, pp. 555–566. DOI: 10.1016/j.resmic.2007.07.006
30. Labrie S., Moineau S. Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, vol. 66, no. 3, pp. 987–994. DOI: 10.1128/aem.66.3.987-994.2000
31. Del Rio B., Binetti A. G., Martín M. C., Fernández M., Magadán A. H., Alvarez M. A. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiology*, 2007, vol. 24, no. 1, pp. 75–81. DOI: 10.1016/j.fm.2006.03.001

Информация об авторах

Василенко Светлана Леонидовна – канд. биологических наук, заведующая лабораторией микробиологических исследований и коллекции промышленных микроорганизмов отдела биотехнологий, Институт мясо-молочной промышленности, Национальная академия наук Беларуси (Партизанский пр., 172, 220075, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vasylenko@tut.by

Фурик Наталья Николаевна – кандидат технических наук, заместитель директора по научной работе, Институт мясо-молочной промышленности, Национальная академия наук Беларуси (Партизанский пр., 172, 220075, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: furik_nn@tut.by

Казак Анна Николаевна – инженер лаборатории микробиологических исследований и коллекции промышленных микроорганизмов отдела биотехнологий, Институт мясо-молочной промышленности, Национальная академия наук Беларуси (Партизанский пр., 172, 220075, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: yellowpooh@mail.ru

Information about authors

Vasilenko Svetlana L. – Ph.D. (Biological). The Institute of Meat and Dairy Industry, the National Academy of Sciences of Belarus (172 Partizansky Ave., Minsk 220075, Republic of Belarus). E-mail: vasylenko@tut.by

Furyk Natallia N. – Ph.D. (Engineering), The Institute of Meat and Dairy Industry, the National Academy of Sciences of Belarus (172 Partizansky Ave., Minsk 220075, Republic of Belarus). E-mail: furik_nn@tut.by

Kazak Anna N. – The Institute of Meat and Dairy Industry, the National Academy of Sciences of Belarus (172 Partizansky Ave., Minsk 220075, Republic of Belarus). E-mail: yellowpooh@mail.ru