

*О.В.Науменко, к.т.н., старший науковий співробітник
Інститут продовольчих ресурсів НААН*

МЕТОДИ СЕЛЕКЦІЇ ФАГОТОЛЕРАНТНИХ ШТАМІВ ЛАКТОБАКТЕРІЙ

*Стаття містить теоретичний огляд основних сучасних стратегій поліпшення штамів лактобактерій, зокрема методологічні підходи щодо створення фагостійких штамів. Основними об'єктами для розробки таких методологій є молочнокислі бактерії родів *Lactococcus*, *Streptococcus* і *Lactobacillus*, які традиційно використовують для ферментації тваринницької та рослинної сировини. На сьогоднішній день усі зусилля науковців зі вдосконалення штамів для промислового застосування спрямовані на використання класичних методів на основі природних стратегій поліпшення штамів, таких як: скринінг штамів «дикого типу» з природних джерел, рандомний (випадковий) мутагенез, направлена еволюція (адаптація) і домінантна селекція. Перераховані класичні методи можуть бути поєднані зтакими природними механізмами перенесення генів, як кон'югація, трансдукція і трансформація для створення промислових штамів з покращеними властивостями, і в тому числі фагостійких. Використання методів генної інженерії, які мають величезний потенціал для розвитку фагозахисних механізмів на основі конкретних точкових мутацій бактеріальної ДНК, а також створення фагостійких мутантів, на даний час обмежено через заборону промислового використання генетично модифікованих мікроорганізмів.*

Ключові слова: *скринінг, мутагенез, селекція, толерантність, фагостійкість.*

*O.V. Naumenko, Ph. D. Technics, sen.res.worker
Food Resources Institute of NAAS*

METHODS OF SELECTION OF PHAGE TOLERANT STRAINS LACTIC ACID BACTERIA

*The article contains the theoretical review of basic modern strategies of improvement of lactic acid bacteria strains LABs, in particular to methodological approaches to the creation of phage-resistant strains. Basic objects for development of such methodologies are lactic acid bacteria belonging to the genera of *Lactococcus*, *Streptococcus* and *Lactobacillus*, which are traditionally used for fermentation of animal and vegetable raw material. For today all efforts to improve strains for industrial application are based on natural strategies for strain improvement such as screening of wild-type strains from natural sources, random mutagenesis, directed evolution and dominant selection. The laid classic methods can be combined with natural mechanisms of gene transfer as conjugation, transduction and transformation to create industrial strains with improved properties including bacteriophage resistance. Use of methods of the genetical engineering, that have enormous potential for development of bacteriophage resistance mechanisms on the basis of concrete point mutations of bacterial DNA and also creation of phage-resistant mutants is now restricted because of prohibition of industrial application of genetically modified microorganisms.*

Key words: *screening, mutagenesis, selection, tolerance, bacteriophage resistance.*

*О.В. Науменко, к.т.н., старший научный сотрудник
Институт продовольственных ресурсов НААН*

МЕТОДЫ СЕЛЕКЦИИ ФАГОТОЛЕРАНТНЫХ ШТАММОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ

*В статье сделан теоретический обзор основных современных стратегий улучшения штаммов лактобактерий, в частности методологические подходы к созданию фагоустойчивых штаммов. Основными объектами для разработки таких методологий являются молочнокислые бактерии родов *Lactococcus*, *Streptococcus* и *Lactobacillus*, которые традиционно используются для ферментации животного и растительного сырья. На сегодняшний день все усилия ученых по усовершенствованию штаммов для промышленного использования направлены на применение классических методов на основе естественных стратегий улучшения штаммов, таких как: скрининг штаммов "дикого типа" из естественных источников, рандомный (случайный) мутагенез, направленная эволюция (адаптация) и доминантная селекция. Перечисленные классические методы могут быть соединены с такими естественными механизмами переноса генов, как конъюгация, трансдукция и трансформация для создания промышленных штаммов с улучшенными свойствами, в том числе фагоустойчивых. Использование методов генной инженерии, которые имеют огромный потенциал для развития фагозащитных механизмов на основе конкретных точечных мутаций бактериальной ДНК, а также создания фагоустойчивых мутантов, на данное время ограничено из-за запрета промышленного применения генетически модифицированных микроорганизмов.*

Ключевые слова: *скрининг, мутагенез, селекция, толерантность, фагоустойчивость.*

Перше повідомлення про негативний вплив бактеріофагів на молочну ферментацію датується ще серединою 30-х років ХХ століття. Незважаючи на застосування різноманітних профілактичних санітарних заходів, ротаційних програм і постійне створення нових фагостійких штамів лактобактерій, фаги залишаються однією з основних і найбільш серйозних причин невдалих ферментацій по всьому світу. Оскільки фаги характеризуються коротким латентним періодом розвитку, мають відносно великий вихід (кількість вірусних часток, що виходять з однієї лізованої клітини) і/або стійкість до пастеризації, їх дуже важко знищити [1]. Фаг-індукований бактеріальний лізис клітин спричинює уповільнення або зупинку процесу ферментації, зниження якості цільових молочних продуктів (наприклад, погіршуються харчова цінність, смак, текстура і т.д.), що веде до суттєвих економічних втрат. Велика кількість бактеріофагів, що інфікують бактерії родів *Lactococcus* і *Streptococcus*, зумовлює інтерес до них з боку біотехнологів і стимулює проведення досліджень біології фагів, способів запобігання фаголізу заквашувальної мікрофлори тощо [2].

На сьогодні відомо, що молочнокислі бактерії (МКБ) мають природні системи захисту проти бактеріофагів. Ці системи дозволяють МКБ виживати навіть в умовах фагової інфекції. Антифагові системи згруповано в п'ять груп залежно від способу їхньої дії: (I) інгібування адсорбції фага; (II) блокування ін'єкції ДНК фага; (III) система рестрикції/модифікації; (IV) система абортівної фагової інфекції і, нарешті, (v) система CRISPR/cas. Незважаючи на те, що природні механізми стійкості до бактеріофага присутні в МКБ, необхідно постійно покращувати цю властивість у зв'язку з високою адаптованістю та біорізноманітністю бактеріофагів [3-4].

Існує декілька підходів для створення фаготолерантних штамів лактобактерій. Це уточнені традиційні методи, такі як: ізоляція (виділення) спонтанних мутантів, стійких до бактеріофагів; кон'югативна передача плазмід, що кодують стійкість до бактеріофага, а також нові стратегії, засновані на розумінні фундаментальної біології фагової інфекції.

Класичні методи виділення толерантних штамів лактобактерій до вірулентних фагів з молочних підприємств

Для того щоб виділити фагостійкі мутанти, може бути використаний метод вторинної культури, в якому чутливі штами піддаються селективному тиску з боку специфічних фагів. Отримані бактеріальні ізоляти, які здатні нормально рости в присутності специфічного бактеріофага, вважають істинними фагостійкими мутантами [5].

Іншим способом природного добору фагостійких штамів є метод, розроблений *Viscardi* та ін. [6]. Підхід заснований на застосуванні проточної цитометрії, завдяки якій можна розпізнати та відібрати бактеріальні клітини, на яких не адсорбуються фаги, що були додані в середовище. Перевірка фагової адсорбції показала, що більшість виділених мутантів були стійкими до фагової інфекції на рівні адсорбції фага. Крім того, після проведення кількох циклів селекції з використанням суміші різних мічених фагів були виділені мульти-фагостійкі штами. Оскільки виникнення спонтанних фагостійких клітин є досить маловірогідним явищем за своєю природою, запропонований метод дозволяє підвищити рівень виявлення таких мутантів. Крім того, відібрані мутанти *S. thermophilus* були стійкими до фагової атаки впродовж декількох поколінь, що свідчило про стабільність цієї властивості.

Відомо, що капсульні полісахариди (CPS) можуть забезпечити захисний бар'єр проти інфекції бактеріофага [7]. Так, селекція за фагостійкістю у CPS позитивних штамів і, в той же час, екзополісахарид - продукуючих (EPS) штамів *S. thermophilus* дозволила відібрати мутанти зі збільшеною продукцією CPS і EPS, та поліпшеною текстурою ферментованого ними молока. Штам *S. thermophilus* CHCC11977 був виділений, як фагостійкий мутант галактозо-позитивного штаму *S. thermophilus*, і його реологічні властивості в молоці (виміряні як напруга зсуву і в'язкість) покращились на 20% у порівнянні з батьківським штамом [8].

Відбір бактеріофагнечутливих (Vims) мутантів

Система відбору Vims включає експозицію (витримку) чутливих штамів з літичними фагами, у результаті якої відбуваються спонтанні мутації в хромосомних або плазмідних генах бактерій. Це спосіб отримання фагостійких штамів без проведення будь-яких генетичних маніпуляцій. Однак такий підхід має свої недоліки, оскільки він базується виключно на виникненні випадкових потенційних мутацій в генах, що кодуєть рецептори.

Фагостійкість штамів *L. lactis* корелювала з втратою галактозо-асоційованих рецепторів на бактеріальній клітинній стінці. Це порушувало синтез компонентів бактеріальної стінки і, як наслідок, фагонечутливі штами часто втрачали свої промислові характеристики, такі як: здатність продукувати кислоти, слабкий ріст у порівнянні зі штамми «дикого типу». Крім зміни клітинного росту, дві інші функції - вузька фагоспецифічність і спонтанна реверсія до чутливого фенотипу, значно обмежували використання Vims мутантів у промислових цілях [9].

Проте, мутації в гені *rip*, що кодує специфічний білок фагової інфекції RIP – рецептор для фагів c2 виду, істотно не впливали на життєздатність клітин лактококів і отримані мутанти стабільно підтримувались [9-10].

Під час генерації c2 фагостійких мутантів промислових штамів *L. lactis* з використанням rGhost9:ISS1 системи інтеграції [11] було виділено фагостійкі мутанти, які не містили інтеграцію ISS1 в гені *rip*. Натомість, інтегрування було встановлено в гені *ujaE*, що кодує білок з невідомою функцією [12]. Було підтверджено, що інактивація гена *ujaE* надавала штамам повну стійкість до ряду бактеріофагів виду c2 а також до двох бактеріофагів 936 виду. Важливо відзначити, що інактивація гена *ujaE* не впливала на ферментаційний профіль промислових штамів *L. lactis*. Цей метод, таким чином, ідеально

підходить для створення нових культур стійких до бактеріофагів без шкоди для продуктивності культури під час промислового застосування [12].

Зазначимо, що методи генної інженерії мають величезний потенціал для створення фагостійких мутантів на основі конкретних точкових мутацій. Тим не менш, на даний час використання методів рекомбінантної ДНК обмежені через заборону промислового використання генетично модифікованих штамів.

Mills та ін. представили 3-ступінчастий підхід без залучення методів генної інженерії, для створення *Vims S. thermophilus*. Фаготолерантний фенотип спочатку пов'язували з неспецифічними мутаціями у генах рецепторів. Однак подальші дослідження показали, що стійкість до фага обумовлена зміною в хромосомному локусі CRISPR (кластери з регулярно повторюваними короткими паліндромними повторами) [13-16].

Плазмідна концепція генерації фагостійких штамів

Серед визнаних і широко застосовуваних методів отримання заквашувальних штамів стійких до фагової інфекції - є кон'югативне перенесення плазмід, які наділяють штами детермінантами стійкості до фага [15].

Більшість даних про такі кон'югативні плазмідні отримано з досліджень на *L. lactis*. У лактококів існує цілий ряд природних фагостійких систем, що кодуються плазмідними генами. Серед плазмід-закодованих систем стійкості до фага є такі захисні механізми, як рестрикція (обмеження)/модифікація (R/M) або абортівна (невдала) інфекція (Hsp+ або Abi+). У цього виду бактерій було ідентифіковано багато різних кон'югативних плазмід, що надають резистентність до фага, в тому числі pTN20, pNP40 і pCI1750 - носії детермінант кон'югативної передачі (TRA+) і абортівної інфекції (ABI+) та pAJ1106, що кодує Тра+ і Hsp+ фенотип.

Широкі дослідження різних дослідницьких груп показали, що створення фагостійких штамів за допомогою простого кон'югативного переносу є достатньо ефективним методом, деякі з цих штамів знайшли застосування в молочній промисловості [15-17].

Серед перших кон'югативних плазмід, виявлених у *L. lactis*, була pTR2030, виділена з штаму ME2. Було встановлено, що вона кодує термочутливу фагостійкість (Hsp+), систему рестрикції/модифікації (LlaIR/M) а також кон'югативну передачу (TRA+) генів. Її введення за допомогою кон'югації в інші штами *L. lactis*, включаючи *L. lactis subsp. cremoris*, призвело до появи штамів із фагостійким фенотипом [18].

Отже, було доведено, що застосування цих генетичних елементів є прийнятною альтернативою для створення стійких штамів на відміну від методів генної інженерії.

Sanders та ін. описали успішне введення плазміді pTR2030 за допомогою кон'югації від донора *L. lactis* в декілька промислових штамів-реципієнтів з обох підвидів *lactis* і *cremoris* [15]. Отримані в результаті транскон'юганти були стійкими до гомологічних фагів. Вивільнення плазміді pTR2030 з транскон'югантів відновлювало фагочутливий фенотип. Ти самим було доведено, що стійкість до фага передається плазмідною.

Звертає на себе увагу той факт, що відбір фагостійких транскон'югантів проводили у середовищі без антибіотиків, яке є найбільш прийнятним для проведення маніпуляцій зі штамми, призначеними для виробництва продуктів харчування. Іншою важливою перевагою цього підходу був той факт, що штамми-транскон'юганти зберегли свої кислотопродукувальні властивості. Цей аспект дуже важливий, оскільки він показує, що маніпуляції з кон'югативними плазмідами не змінювали промислово-привабливі риси стартових бактерій. Плазмідна pTR2030 зберігалась упродовж декількох поколінь, що свідчить про те, що стійкість до фага буде стабільною функцією при тривалому використанні транскон'югантів у промислових виробництвах.

Стійкість до бактеріофага у штамів *L. lactis* CHCC1915 і CHCC1916 була поліпшена за рахунок кон'югативної передачі плазміді pCI1750 (зі стійкістю до бактеріофага) від

штама *L. lactis* UC653, що мав систему стійкості AbiG. Цей механізм абортівної інфекції (ABI) (кодується двома генами *abiGi* і *abiGii*) надавав стійкість до бактеріофагів 936 виду, а також часткову стійкість до $\epsilon 2$ виду бактеріофагів [19]. Лактозо-негативний дериват (варіант) штама *L. lactis* MG1363, що містить *pC11750*, використовували як донор плазмиди. Транскон'юганти були селекціоновані шляхом відбору реципієнтів зі стійкістю до бактеріофагів, що було простежено при подальшому посіві на чашки з індикаторним лактозним агаром.

Транскон'югати *L. lactis* CHCC1915 і CHCC1916 були створені більше 20 років тому і до сьогодні працюють добре, хоча були виділені бактеріофаги, які резистентні до впливу системи стійкості AbiG.

Плазмідна концепція генерації фаготолерантних штамів лактобактерій має також свої обмеження. Перш за все, слід брати до уваги, що велику кількість промислових штамів важко трансформувати. Крім того, існує велика ймовірність того, що введення нових плазмід може дестабілізувати промислово-привабливі властивості штаму, які є також закодованими на плазмідах (частина плазмід - несумісні).

Введення плазмід, що переносять фагостійкість, у хромосому бактерії може бути способом стабілізації цієї функції. Але, з іншого боку, ця процедура буде вимагати схвалення відповідних органів. Крім того, деякі види промислових молочнокислих бактерій несуть кілька плазмід (в тому числі кон'югативних плазмід). Це може бути перешкодою для отримання нових фагостійких штамів через потенційні загрози наслідків кон'югації.

Проте, дослідження, проведені *Burrus* та ін. виявили наявність інтегративного кон'югативного елемента ICRSt1 у штама *S. thermophilus* CNRZ368, що кодує R/M систему II типу, яка забезпечує стійкість до інфекції фага ϕ ST84 [20]. Ідентифікація системи захисту від фага на цьому інтеграційному елементі засвідчила те, що і такі генетичні елементи, як транспозони, можуть бути відповідальними за поширення механізмів фагорезистентності в популяціях бактерій.

Мутагенез і скринінг фагостійких штамів

На відміну від попередніх прикладів, коли стійкість до бактеріофага не встановлювалась для кожного бактеріофага атакуючого певний штам, можна розробити повністю стійкі мутанти шляхом скасування реплікації ДНК бактеріофага [21, 22].

Тимідилатсинтаза, що кодується геном *ThyA*, має важливе значення для нового синтезу дТТФ. Оскільки молоко позбавлене тимідину, реплікація ДНК в тому числі ДНК бактеріофага, що вражає штам, скасовується в *ThyA*-мутантах. Штам *L. lactis* MBP71 - *ThyA* мутант штама *L. lactis* CHCC373 з делецією у 42-bp на початку гена *ThyA* характеризувався повною стійкістю по відношенню до дев'яти бактеріофагів з 936 і P335 видів. Оскільки *ThyA*-мутанти здатні синтезувати РНК і, таким чином, також білки, вони все ще метаболічно активні. Для досягнення рівня кислотоутворювальної активності подібного до штаму «дикого типу» необхідно було лише збільшити рівень інокуляту [23].

Зауважимо, що штам *L. lactis* MBP71 був створений з використанням технології рекомбінантної ДНК і використовується виключно для доведення правильності концепції.

Мутагенез і скринінг пиримідинових ауксотрофів згодом був використаний для отримання варіантів промислових штамів *L. lactis* і *S. thermophilus*, придатних для включення в закваски. Варіанти бактеріофага, які б долали цей механізм стійкості досі виявлено не було.

CRISPR/cas захист у молочнокислих бактеріях

CRISPR/cas захисна система була вперше описана ще в 1980-х роках для *E. coli*, але лише порівняно недавно визнана для молочнокислих бактерій, в тому числі для таких родів: як *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* і *Streptococcus*. Дослідження більше ніж 100

геномів різних видів МКБ дозволило виявити біля 60 різних CRISPR локусів, які були згруповані у вісім різних сімейств [23]. Це вказує на досить високу різноманітність природи CRISPR локусів у МКБ. Крім того, було відзначено, що поширення CRISPR локусів всередині світу прокариотів до окремих родів відбувалось за рахунок горизонтального переносу генів і їх подальшої еволюції під селективним тиском фагової інфекції.

Загалом встановлено, що CRISPR локуси розташовані на хромосомі за винятком одного штаму *E. faecium*, для якого визначено перенесення CRISPR локусу на плазміді. Більшість видів МКБ містять більше одного CRISPR локусу.

Однак, незважаючи на звичайне явище систем CRISPR/cas, вони до цих пір не були визначені для таких родів МКБ, наприклад, як: *Lactococcus* і *Leuconostoc*. Оскільки CRISPR/cas системи надають клітинам-господарям стійкість до фага, вони дуже цікаві для молочної промисловості, де мікробне виробництво відіграє значну роль.

Застосування CRISPR/cas систем для створення нових варіантів штамів МКБ з диференційованою стійкістю до фагової інфекції є новим біотехнологічним підходом [13, 24-25]. Більш того, такі штами вважаються безпечними для застосування в харчовій промисловості, оскільки вірогідність поширення ними чужих (запозичених) мобільних генетичних елементів з невідомими функціями є низькою.

Природні методи відбору BИMs клітин промислових бактерій, що містять CRISPR локуси, можуть стати цікавим рішенням для отримання стійких штамів без навмисних генетичних модифікацій. *Barrangou* та ін. [24] описали метод отримання спонтанних BИMs клітин *S. thermophilus*, що містять CRISPR, завдяки селективному тиску в результаті фагової інфекції. Протоколи виділення таких штамів були розроблені пізніше для *S. thermophilus*, що застосовуються у виробництві сиру і йогуртів [13].

Ця стратегія базується на експозиції бактеріальної закваски з фагом у високому титрі. Кілька циклів росту в молочних середовищах під постійним селективним тиском через присутність фага призводило до одержання фагостійких мутантів, здатних ефективно рости в промислових умовах.

Великою перевагою такого підходу є той факт, що наявність природно набутих спейсерних послідовностей робить штам стійким до конкретного фагу при збереженні промислово-привабливих особливостей вихідного батьківського штаму.

Інша стратегія створення фагостійких штамів - навмисна інтеграція синтетичних гомологічних спейсерних послідовностей для збереження послідовностей промислових фагів у CRISPR локусах заквашувальних бактерій. Проте, цей підхід буде включати в себе певні молекулярні маніпуляції на рівні ДНК. Однак, контрольована зміна фагостійкості МКБ штамів з використанням CRISPR/cas локусів не розглядається в харчовій промисловості, як генетичний метод модифікації.

Висновки

Таким чином, основними загальнозживаними методами створення нових фаготолерантних штамів лактобактерій для використання в харчовій промисловості є уточнені класичні методи селекції на основі природних стратегій поліпшення штамів, таких як: скринінг штамів «дикого типу» з природних джерел, рандомний (випадковий) мутагенез, направлена еволюція (адаптація) і домінантна селекція. Перераховані методи можуть бути поєднані з такими природними механізмами перенесення генів, як кон'югація, трансдукція і трансформація, для створення промислових штамів з покращеними властивостями, і в тому числі фагостійких.

Література

1. Daly C. Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance/ C. Daly, G. F. Fitzgerald, R. Davis // *Antonie Van Leeuwenhoek* .- 1996.- Vol. 70, Issue 2. - P.99–110.

2. Derkx Patrick M. F., The art of strain improvement of industrial lactic acid bacteria without the use of recombinant DNA technology / Patrick M.F. Derkx, T. Janzen, K. I. Sorensen, J. E. Christensen, B. Stuer-Lauridsen, E. Johansen // *Microbial Cell Factories*. - 2014. - 13(Suppl 1):S5. - P.1475-2859.
3. *Sturino J.M., Bacteriophage defense systems and strategies for lactic acid bacteria / J.M. Sturino, T.R. Klaenhammer // Advances in Applied Microbiology. -2004. - Vol. 56. - P. 331-378.*
4. *Labrie S.J., Bacteriophage resistance mechanisms / S.J. Labrie, J.E. Samson, S. Moineau // Nat. Rev. Microbiol. – 2010. - Vol. 8. - P. 317-327.*
5. *Marcó M. B., Performance of spontaneous phage-resistant derivatives of Lactobacillus plantarum in fermented milk manufacture / M. B. Marcó, D. Mercanti, J. A. Reinheimer, A. Quiberoni // International Dairy Journal. – 2011. - Vol. 21, Issue 11. - P. 857–862.*
6. *Viscardi M., Selection of bacteriophage-resistant mutants of Streptococcus thermophilus / M. Viscardi, R. Capparelli, R.Di Matteo, D.Carminati, G. Giraffa, D. Iannelli // J. Microbiol. Met. -2003. - Vol. 55 (1). - P. 109-119.*
7. *Looijesteijn P.J., Physiological function of exopolysaccharides produced by Lactococcus lactis / P.J. Looijesteijn, L. Trapet, E. de Vries, T. Abee, J. Hugenholtz // Int. J. Food Microbiol. – 2001. - Vol. 64. - P.71-80.*
8. Patent WO2011092300 A1 МПК: C12R 1/46 (2006.01), A23C 9/12 (2006.01), A23L 1/054 (2006.01) Lactic bacterium for texturizing food products selected on basis of phage resistance / T. Janzen (DK), D.E. Christiansen (DK). - № міжнар.заявки РСТ/EP2011/051239; заявлено - 28.01.2011.- опубл. 04.08.2011.- 41 с.
9. *Forde A., Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria / A. Forde, G. F. Fitzgerald // Antonie Van Leeuwenhoek. - 1999. - Vol. 76. - P.89-113.*
10. *Coffey A., Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application / A. Coffey, R. P. Ross // Antonie Van Leeuwenhoek. - 2002.- Vol. 82, Issue 1.- P. 303–321.*
11. *Maguin E., Construction of food-grade mutants of lactic acid bacteria / E. Maguin, H. Prévost, A. Gruss // Lait. – 1996. - Vol.76.- N1-2. - P. 139-146.*
12. Патент WO/2006/072631 A1 МПК: C12N 1/21 (2006.01), A23L 29/00 (2016.01) *Bacteriophage resistant bacteria / B. Stuer-Lauridsen* (DK), *T. Janzen* (DK).- № міжнар.заявки РСТ/EP2006/050078; заявлено -06.01.2006.- опубл. 13.07.2006.- 38 с.
13. *Mills S., Efficient method for generation of bacteriophage insensitive mutants of Streptococcus thermophilus yoghurt and mozzarella strains/ S. Mills, A. Coffey, O. E. McAuliffe, W. C Meijer, B. Hafkamp, R. P. Ross// J. Microbiol. Methods.- 2007.- Volume 70, Issue 1.- P. 159–164.*
14. *Chirico D., Bacteriophage-insensitive mutants for high quality Crescenza manufacture / D. Chirico, A. Gorla, V. Verga, Per D. Pedersen, E. Polgatti, A. Cava, F. D. Bello // Front. Microbiol. - 2014 [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00201>.*
15. *Sanders M. E., Conjugal strategy for construction of fast acid-producing, bacteriophage-resistant lactic streptococci for use in dairy fermentations / M. E. Sanders, P. J. Leonhard, W. D. Sing, T. R. Klaenhammer // Appl. Environ. Microbiol. – 1986. - Vol.52, N 2.- P.1001-1007.*
16. *Pillidge C. J., Efficacy of four lactococcal phage resistance plasmids against phage in commercial Lactococcus lactis subsp. cremoris cheese starter strains / C. J. Pillidge, L. J. Collins, Ward L.J.H., Cantillon B.M., Shaw B.D., Timmins M.J., Heap H.A., Polzin K.M // Int. Dairy J. - 2000. - Vol. 10, N 9. - P.617-625.*
17. *Mckay L. L., Conjugal 40-megadalton plasmid in Streptococcus lactis subsp. diacetylactis DRC3 is associated with resistance to nisin and bacteriophage / L. L. McKay, K. A. Baldwin // Appl. Environ. Microbiol. - 1983. - Vol. 47, N 1. - P.68-74.*

18. Steenson L. R., *Streptococcus cremoris* M12R transconjugants carrying the conjugal plasmid pTR2030 are insensitive to attack by lytic bacteriophages / L. R. Steenson, T. R. Klaenhammer // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1985. - Vol. 50, N 4. - P.851-858.
19. O'Connor L., Abi G., *A genotypically novel abortive infection mechanism encoded by plasmid pCI750 of Lactococcus lactis subsp. Cremoris UC653* / L. O'Connor, A. Coffey, C. Daly, G.F. Fitzgerald // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1996. - Vol.62. - P.3075-3082.
20. Burrus V., Characterization of a novel type II restriction-modification system, Sth368I, encoded by the integrative element ICES_{t1} of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 / V. Burrus, C. Bontemps, B. Decaris, G. Guédon // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2001. - Vol.64. - P.1522-1528.
21. Pedersen M.B., *Bacteriophage resistance of a ΔthyA mutant of Lactococcus lactis blocked in DNA replication* / M. B. Pedersen, P. R. Jensen, T. Janzen, D. Nilsson // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2002. - Vol. 68, N 6. - P.3010-3023.
22. Patent US 7892585 B1. МПК: A23C 9/12 (20060101) *Method of preventing bacteriophage infection of bacterial cultures* / D. Nilsson (DK), T. Janzen (DK). - № міжнар.заявки РСТ/DK1999/000382; заявлено -02.07.1999.- опубл. 22.02.2011. - 23 с.
23. Horvath P., Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes / P. Horvath, A. C. Couté-monvoisin, D. A. Romero, P. Boyaval, C. Fremaux, R. Barrangou // *J. Food Microbiol.* - 2009. - Vol. 13, N 11. - P. 62-70.
24. Barrangou R., CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes / R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero, P. Horvath // *Science.* - 2007. - Vol. 315, N 58(19). - P.1709-1712.
- Horvath P., Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus* / P. Horvath, D. A. Romero, A. C. Couté-monvoisin, M. Richards, H. Deveau, S. Moineau, P. Boyaval, C. Fremaux, R. Barrangou // *J. Bacteriol.* - 2008. - Vol. 19, N 4. - P.1401-1412.