

УДК 578.81

Науменко О.В., © к.т.н., старший науковий співробітник (naumenkoo@list.ru)
Інститут продовольчих ресурсів НААН України, м.Київ

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ПОМІРНИХ ФАГІВ НА ПРОМИСЛОВІ ШТАМИ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ

Встановлено умови виявлення лізогенного стану лактобактерій методом хімічної індукції, застосовуючи мітоміцин С та хлороформ. Проведено скринінг промислових штамів лактобактерій на присутність помірних фагів. Відібрано фагочутливі нелізогенні штами як тест-культури для визначання фагів.

Ключові слова: бактеріофаги молочнокислих бактерій, профаги, індукція, мітоміцин С, лізогенність.

Відомо, що залежно від реакції росту у бактеріальній клітині-хазяїні бактеріофаги розподіляють на дві основні категорії – вірулентні або літичні бактеріофаги (інфікують та спричинюють лізис клітини-хазяїна), та помірні (профаги) або лізогенні (невірулентні) бактеріофаги (не лізують бактеріального хазяїна, а вбудовують свої геноми у його хромосому). Вірулентні фаги еволюціонують із одного виду в інший, і існує імовірність, що саме ДНК помірних фагів сприяє еволюції фагів в цілому [1]. Явище лізогенії у молочних стрептококів було доведено ще у 1949 році. З того часу проведено цілий ряд досліджень, які довели, що більшість штамів молочнокислих бактерій, які використовувались у заквасках кисломолочного виробництва, були лізогенними [2]. Лізогенія також була продемонстрована в ізолятів лактобактерій, виділених із комерційних мультиштамових заквасок [3] та з непастеризованого молока [4].

Дослідження лізогенного стану лактобактерій є вкрай необхідним для встановлення можливості їх застосування у біотехнологіях ферментованих молочних продуктів, оскільки такі культури є потенційним джерелом накопичення фагів на виробництві. Якщо до складу закващувальної композиції залучено лізогенний штама, то вірогідність того, що вивільнені фаги будуть інфікувати ту чи іншу чутливу до них культуру закваски, є дуже високою. У результаті буде порушено співвідношення між компонентами закваски, або взагалі втрачено певну чутливу культуру, і, як наслідок, ферментаційний процес буде мати неконтрольований характер [5].

Помірні фаги можуть бути спонтанно активовані у клітинах молочнокислих бактерій, однак, частіше це відбувається внаслідок впливу певного фізико-хімічного фактору, наприклад: хлороформу, мітоміцину С, ультрафіолетового випромінювання чи підвищення температури. Вивільнення помірних фагів можна простежити за лізисом клітин та дослідженням за допомогою електронної мікроскопії або ж розмноженням фагу на індикаторних штамах. Існує відмінність між результатами, отриманими за використання

різних методів індукції профагів, так само, як і між різними методами спостереження за рівнем індукції помірних фагів. Так, Reyrolle J. показав, що найнижчий рівень лізогенії був спричинений літичним ростом помірних фагів на індикаторних штаммах [6]. А найбільший рівень лізогенії (80%) спостерігали за допомогою електронної мікроскопії [7].

Метою роботи було дослідити лізогенний стан промислових штамів лактобактерій.

Матеріали та методи. Об'єктами досліджень були чисті культури молочнокислих бактерій видів *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *L. lactis ssp. lactis bv. diacetilactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium* з колекції промислових культур відділу біотехнології ІПР. Наявність лізогенного стану лактобактерій досліджували двома методами: 1) обробкою бактеріальної суспензії хлороформом (1:10) упродовж 30 хв. Оброблені клітини витримували у термостаті за 30 °С (для мезофільних бактерій) або 37 °С (для термофільних бактерій) упродовж 1,5 год, потім осаджували центрифугуванням за 3000 об/хв упродовж (15±5) хв і досліджували надосадову рідину на наявність фагів методом подвійного агару з 10 мМ CaCl₂ [8]; 2) індукцією профагів мітоміцином С згідно з [9]. Для цього 2% (17 годинної) бульйонної культури вносили до 40 см³ гідролізованого молочного бульйону та культивували за оптимальної температури росту упродовж 3-4 год для отримання бактеріальної суспензії з оптичною густиною 0,1-0,2 од. (екстинцію суспензії визначали на фотоелектроколориметрі КФК-3 у кюветі 3,0 мм за λ=600 нм). Потім підготовану культуру розливали у дві пробірки по 10 см³ – контрольну і дослідну. До дослідної пробірки додавали 2 мкг/см³ мітоміцину С для індукції помірних фагів. Дослідну та контрольну пробірки переносили до термостату та продовжували культивування бактерій, щогодини перевіряючи зміну оптичної густини бактеріальної суспензії упродовж 3-4 годин. У разі значного зменшення оптичної густини у дослідній пробірці порівняно з контрольною, вважали таку культуру лізогенною. Вміст дослідної пробірки досліджували на наявність бактеріофага двошаровим методом. Реєстрували наявність чи відсутність зон лізису тест-культури – так званих негативних колоній. Визначення титру фагів - за кількістю негативних колоній, виражали у БУО/см³. Стійкість культур до бактеріофагів визначали шляхом нанесення лізатів бактеріофагів на чашку Петрі з твердим поживним середовищем на основі гідролізованого молока та досліджуваною культурою в логарифмічній фазі росту. У дослідях використовували бактеріофаги титру 10⁷ БУО/см³ об'ємом по 0,02 см³. Чутливими вважали ті штами, на газонах яких у місцях нанесення фаголізату спостерігали наявність зони лізису.

Результати дослідження.

Встановлено, що 16% від загальної кількості проаналізованих культур за обробки хлороформом вивільняли профаги. Аналогічні результати отримано Мытник Л.Г. [10], лізогенний стан було встановлено у 20% досліджених штамів лактобактерій після обробки їх хлороформом. Оскільки хлороформ руйнує оболонки клітин, це сприяє вивільненню профагів.

Для того щоб підвищити ефективність визначення лізогенних бактерій було використано інший індукційний агент, а саме – мітоміцин С.

За даними різних авторів, умови проведення досліджень з визначення лізогенних бактерій за допомогою мітоміцину С є дуже варіативними. Так концентрація мітоміцину коливається від 0,1 до 5 мкг/см³ [11], термін обробки - від 20 хв до 6 год [12] і т.д. Отже, оптимальні умови визначаються експериментально залежно від об'єкту аналізу.

Було опрацьовано та визначено оптимальні умови для індукції профагів лактобактерій за допомогою мітоміцину С. Встановлено, що час необхідний для вивільнення фагів у взятих до дослідження штамів лактобактерій істотно різнився. Реакцію зниження оптичної густини бактеріальної суспензії у результаті лізису фагами, вивільненими під дією мітоміцину порівняно до контролю без мітоміцину, спостерігали у частини культур уже через 2 год (рис.1) – I група, та через 3 години – у II групи культур (рис.2).

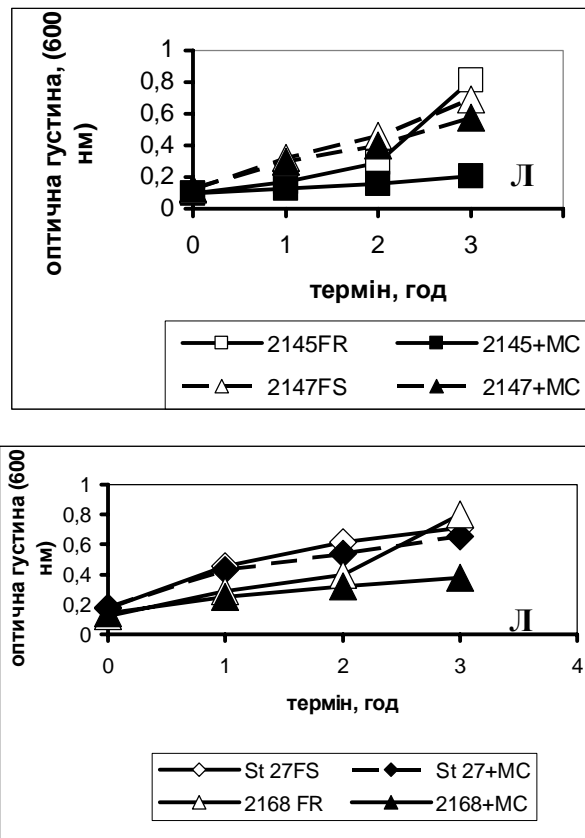


Рис. 1. Вплив мітоміцину С на розвиток лактобактерій I групи: Л-лізогенна культура

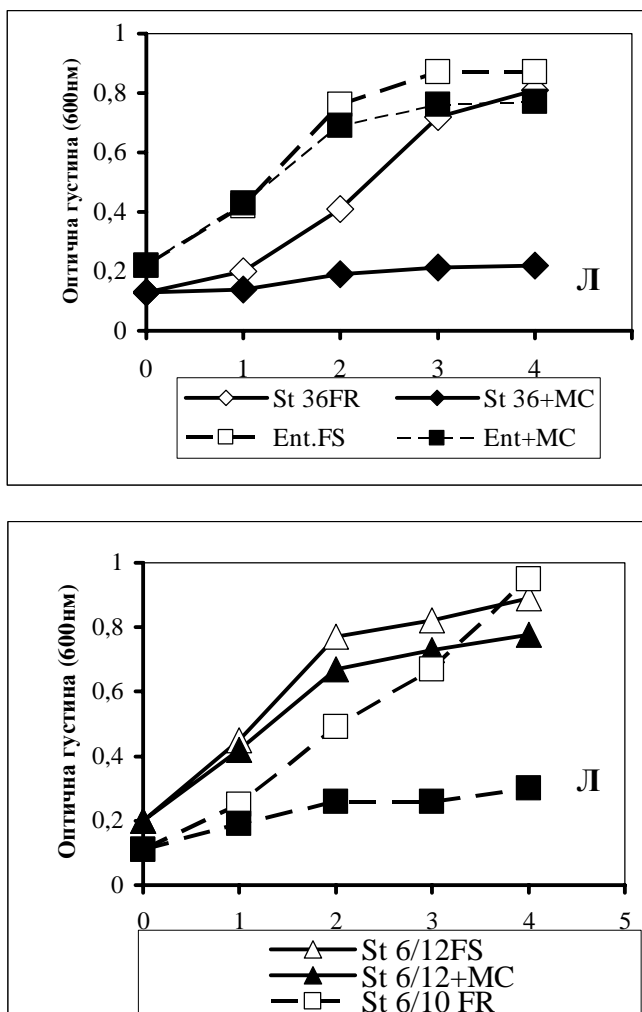


Рис. 2. Вплив мітоміцину С на розвиток лактобактерій II групи: Л-лізогенна культура

Було встановлено, що через 2 години обробки мітоміцином оптична густина бактеріальної суспензії зменшувалась порівняно до контролю на (20-44,9)% та (47,0-53,7)%, відповідно, у I та II груп культур. Через 3 години індукція лізису під впливом мітоміцину призводила до зменшення оптичної густини культур вже на (52,0-74,7)% - у I групі, і на (70,5-71,2)% - у II групі.

Максимальне зниження оптичної густини фіксували для усіх культур на 3 годину обробки мітоміцином С. Встановлено, що подальше витримування упродовж 4-ої години культивування істотно не впливало на індукцію профагів як для I, так і для II груп культур (рис.3).

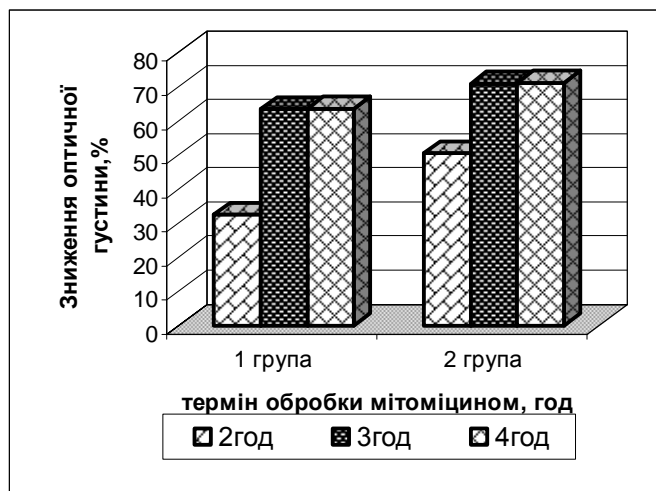


Рис.3 Індукція лізису культур під впливом мітоміцину, за 100% брали оптичну густину необробленої культури

Наступне культивування лізатів упродовж 17-24 год не призводило до відновлення концентрації клітин лізогенних бактерій (оптична густина не збільшувалась).

Загалом, у результаті проведених досліджень було встановлено, що використання мітоміцину С як індукційного агента, дозволило підвищити ефективність виявлення лізогенних штамів у три рази порівняно з використанням хлороформу. За таких умов обробки 50% культур вивільнили профаги. Такі результати збігаються з даними, отриманими Park С. [13], Cuesta Р. [9], Huggins А. [11], відповідно, 52; 53 і 60%. За даними Kilić А. [14] після індукції мітоміцином встановлено лізогени у 55% зразків.

Однак є повідомлення і про нижчі значення індукції. Так, Lowrie R. визначив, що тільки 20% з досліджених культур вивільняли профаги за обробки мітоміцином [15], а Hear Н. [16] – 37%.

Лізати, отримані від індукованих культур, було протестовано на літичну активність по відношенню до колекційних культур молочнокислих бактерій. Лише для частини лізатів було визначено індикаторні культури, ці дані подано у табл.1. Як видно з табл. 1, три штами, індуковані мітоміцином С, були чутливими до своїх профагів. Помірні фаги проявляли літичну активність щодо 2-3 культур, фагові титри варіювали від $10 \cdot 10^4$ БУО/см³.

У великої частини індукованих культур спостерігали візуалізацію лізису (за зниженням оптичної густини культур), але не було встановлено індикаторні штами, на яких би профаги репродукувались і утворювали негативні колонії у твердому поживному середовищі (метод подвійного агару). Можна припустити, що ці фаги були дефектними. Такий ефект описано у роботі [9].

Таблиця 1

Літичний спектр помірних фагів

Тест-к-ра	Лізогенні культури							
	St 2145		St 2168		St 36		St 6/10	
	К	МС	К	МС	К	МС	К	МС
St2145	-	+	-	+	-	-	-	-
St2168	-	+	-	+	-	-	-	-
St2147	-	-	-	-	-	-	-	-
St66	-	-	-	-	-	-	-	-
St2142	-	-	-	-	-	-	-	-
St381	-	-	-	+	-	-	-	-
St2120	-	-	-	-	-	-	-	-
St74	-	-	-	-	-	-	-	-
St2185	-	-	-	-	-	-	-	-
St36	-	-	-	-	-	+	-	-
St6/10	-	-	-	-	-	-	-	-
St27	-	-	-	-	-	++	-	++
L.1-1	-	-	-	-	-	-	-	-
L.1-2	-	-	-	-	-	-	-	-
L.1-3	-	-	-	-	-	-	-	-
L.1 6/3	-	-	-	+	-	++	-	+
Ent.FS	-	-	-	-	-	++	-	+
L.cr.12	-	-	-	-	-	-	-	-
L.1 3/5	-	-	-	-	-	-	-	-

Примітка: - немає лізису; +- лізис 10^{1-2} БУО/см³; ++ - лізис 10^{2-4} БУО/см³;

К - фільтрат неіндукованої культури; МС-лізат культури, індукованої мітоміцином С

Необхідно також наголосити, що культури, визначені у цій роботі як лізогенні, були в той же час фагорезистентними до вірулентних фагів з колекції відділу біотехнології ПП. І, навпаки, фагочутливі культури не містили профагів. На підставі цього було відібрано індикаторні культури *S.thermophilus* 6/12, *S.thermophilus* 2/11, *S.thermophilus* 2147, *E.faecium* FS для проведення фагового моніторингу.

Висновки.

1.Опрацьовано оптимальні умови виявлення лізогенних штамів молочнокислих бактерій методом хімічної індукції: нарощування бактеріальної культури упродовж 3-4 год для одержання культури у ранній log-фазі з оптичною густиною 0,1-0,2 од. ($\lambda=600$ нм); концентрація мітоміцину 2 мкг/см³;

термін обробки 3 години.

2. Проведено скринінг промислових штамів лактобактерій на присутність помірних фагів.

3. Відібрано фагочутливі нелізогенні штами як тест-культури для визначання фагів.

Література

1. Brüssow H., Desiere F. Comparative phage genomics and the evolution of *Siphoviridae*: insights from dairy phages // Mol. Microbiol. – 2001. – Vol.39. – P.213–222.
2. Davidson B.E., Powell I.B., Hillier A.J. Temperate bacteriophages and lysogeny in lactic acid bacteria // FEMS Microbiol. Rev. – 1990. – Vol.7, №1-2. – P.79-90.
3. Labrie S., Deveau H., Lamoureux M., Bissonnette F., Moineau S. Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged cheddar cheese (abstract) // J. Dairy Sci. – 2000. – Vol.83. – P.620-627.34.
4. Heap H.A., Jarvis A.W. A comparison of prolate and isometric-headed lactic streptococcal Bacteriophages// New Zealand J. Dairy Science Technology. – 1980. – Vol.15. – P.75.
5. Гудков А.В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты. Под ред. С.А. Гудкова. – М.: ДеЛи принт. - 2003. – 800 с.
6. Reyrolle J., Chopin M.C., Letellier F., Novel G. Lysogenic strains of lactic acid Streptococci and lytic spectra of their temperate bacteriophages // Appl. Environ. Microbiol. –1982. – Vol.43, №2. – P.349-356.
7. Jarvis A. W., Meyer J. Electron microscopic heteroduplex study and restriction endonuclease cleavage analysis of the DNA genomes of three lactic streptococcal bacteriophages // Appl. Environ. Microbiol. – 1986. – Vol.51. – P.566.
8. Адамс М. Бактериофаги. – М.: Мир. - 1961. – 527 с.
9. Cuesta P., Suarez J.E., Rodriguez A. Incidence of lysogeny in wild lactococcal strains // J. Dairy Sci. – 1995. – Vol.78. – P.998-1003.
10. Мытник Л.Г., Беспалова И.А., Тихоненко А.С. Сравнительное изучение умеренных и вирулентных фагов мезофильных молочнокислых стрептококков// Прикладная биохимия и микробиология. - 1975., том 9, вып. 6.- С.819-823.
11. Huggins A., Sandine W.E. Incidence and properties of temperate bacteriophages induced from lactic streptococci// Appl Environ Microbiol.- 1977.- Vol.33, N 1. – P. 184-191.
12. Wiederholt K.M., Steele J.L. Profage curing and partial characterization of temperate bacteriophages from thermolytic strains of *Lactococcus lactis ssp cremoris*// J. Dairy Sci.-1993.- Vol. 76, N 4. – P. 921-930.
13. Park C., McKay L.L. Induction of profage in lactic streptococci isolated from commercial dairy starter cultures//J.Milk Food Technol. – 1975. – 38. – P.594.
14. Kilic A.O., Pavlova S.I., Wen-ge Ma, Lio Tao. Analysis of *Lactobacillus* Phages and bacteriocins in American Dairy products and characterization of a phage isolated from yogurt // Apply Environmental Microbiology. – 1996. – Vol. 62, № 6. –

P. 2111-2116.

15. Lowrie R. J. Lysogenic strains of group N Lactic Streptococci // Appl. Environ. Microbiol. – 1974. – Vol.27, №1. – P.210-217.

16. Heap H.A., Limsowtin G.K.Y., Lawrence R.C. Contribution of Streptococcus lactis strains in raw milk to phage infection in commercial cheese factories// N.Z.J. Dairy Sci. Technol. – 1978. – Vol.13. – P. 16.

Summary

Conditions for detection of lactobacteria lysogenic state by method of chemical induction using mitomycin C and chloroform were defined. Screening of lactobacteria industrial strains for presence of temperate phages was conducted. Phage-sensitive non-lysogenic strains were selected as test cultures for phages detection.

Рецензент – д.с.-г.н., професор Цісарик О.Й.