

УДК 578.81

Науменко О.В., к.т.н., ст. науковий співробітник
naumenkoo@list.ru

Інститут продовольчих ресурсів НААН, м.Київ, Україна

Дослідження ролі екзополісахаридної капсули в захисті клітин

***Streptococcus thermophilus* від фагового ураження**

Досліджено вплив видоспецифічних фагів fS_1 та S_t-2 на штами *S. thermophilus* з колекції ІПР. Виявлено відмінності між фагорезистентними та фагочутливими штамми *S. thermophilus* у продукуванні вільного та капсульного полісахаридів клітинної стінки. Показано, що екзополісахаридна капсула захищає клітини від літичної дії певних типів фагів *S. thermophilus*. Відібрано штам *S. thermophilus* IMB B-7247, що характеризується здатністю до продукування капсульних екзополісахаридів і є фагостійким до широкого кола фагів.

Ключові слова: бактеріофаги, *Streptococcus thermophilus*, капсули, екзополісахарид.

Науменко О.В., к.т.н., ст. научный сотрудник
naumenkoo@list.ru

Институт продовольственных ресурсов НААН, г.Киев, Украина

Исследование роли экзополисахаридной капсулы в защите клеток

***Streptococcus thermophilus* от фагов**

Исследовано влияние видоспецифических фагов fS_1 и S_t-2 на штаммы *S. thermophilus* из коллекции ИПР. Установлены особенности между фагорезистентными и фагочувствительными штаммами *S. thermophilus* в продукции свободного и капсульного полисахаридов клеточной стенки. Показано, что экзополисахаридная капсула может защитить клетки от литического действия некоторых типов фагов *S. thermophilus*. Отобран штамм *S. thermophilus* IMB B-7247, который характеризуется способностью продуцировать капсульные полисахариды и является фагоустойчивым к широкому спектру фагов.

Ключевые слова: бактериофаги, *Streptococcus thermophilus*, капсулы, экзополисахаридов

O. V. Naumenko, Ph. D., Senior Researcher
naumenkoo@list.ru

Institute of Food Resources of National Academy of Agrarian Sciences, Kiev, Ukraine

Investigation of exopolysaccharide capsule in protection of

***Streptococcus thermophilus* cells from phages**

The influence of species specific phages fS_1 and S_t-2 on strains *S. thermophilus* from the collection of Institute of Food Resources were investigated. The differences between phage-resistant and phage-sensitive strains *S. thermophilus* in producing free and capsular polysaccharides of cell wall were detected. It was shown that exopolysaccharide capsule can facilitate cells protection from lytic action

of some types of phage *S. thermophilus*. The strain *S. thermophilus* IMB B-7247 was selected, it is characterized by its ability to produce capsular polysaccharides and it is phage-resistant to a wide range of phages.

Key words: bacteriophages, *Streptococcus thermophilus*, capsules, exopolysaccharide.

Відомо, що деякі штами *S.thermophilus* здатні утворювати екзополісахариди двох видів: вільний позаклітинний слиз (Eps) та капсульні полісахариди (Cps), щільно прикріплені до поверхні клітини. Наявність та розмір капсули є важливою властивістю, котра дозволяє бактеріальній клітині виживати за несприятливих умов середовища та є однією з найважливіших рис, що визначає її біологічні характеристики [1]. Чутливість лактобактерій до бактеріофагів залежить від комплементарності та наявності специфічних сайтів на клітинній стінці (первинних рецепторів), приєднання вірусних часток до них, а у разі наявності капсули відбувається впізнавання капсульних полісахаридів (вторинних рецепторів).

Штами Eps+, мають гідрофільнішу поверхню клітин, опосередковану структурою екзополісахариду, який маскує рецептори на поверхні клітини, що відповідають за зв'язування бактеріофагу з бактеріальною клітиною [2-3]. Існує думка, що в разі ураження бактеріофагом Cps⁺ штамів, полісахариди, які входять до складу клітинної стінки, деполімеризуються, внаслідок цього фаг не може приєднатись до рецепторів на поверхні клітини [4]. Отже, наявність, вид та структура екзополісахаридів відіграє важливу роль у фагостійкості лактобактерій унаслідок зменшення ділянок адсорбції специфічних фагів на поверхні бактеріальної клітини, ускладнення руху фагів до клітини крізь слизовий шар, або ж маскуванні певних рецепторів.

Метою роботи було дослідження здатності *S.thermophilus* продукувати екзополісахариди та вивчення впливу останніх на взаємодію з фагами.

Матеріали та методи.

Об'єктами досліджень були штами *S. thermophilus*, фаги видоспецифічні щодо *S. thermophilus* з колекції відділу біотехнології ИПР. Стійкість культур до бактеріофагів визначали традиційним вірусологічним методом шляхом нанесення лізатів фагів на чашку Петрі з твердим поживним середовищем на основі гідролізованого молока та досліджуваною культурою в логарифмічній фазі росту [5]. У дослідях використовували фаги титру 10^7 БУО/см³ об'ємом по 0,02 см³. Чутливими вважали ті штами, на газонах яких у місцях нанесення фаголізату спостерігали наявність зони лізису. Індекс літичної активності (I_L) фагів вираховували як відношення кількості лізованих штамів до числа випробуваних. Встановлення здатності штамів *S.thermophilus* утворювати капсули досліджували за аналізом мікроскопічних препаратів. Для цього готували негативно забарвлені мікропрепарати за методом Буррі, змішуючи дослідний матеріал із тушшю і висушуючи мазок за кімнатної температури на предметному склі. Далі фарбували капсули за методом Гінса: фіксували одержані препарати 95% етиловим спиртом, промивали водою, фарбували фуксином Циля 5 і мікроскопіювали під імерсією. За допомогою програмного

забезпечення Motic Images 2000 (версія 1.3) робили мікрофотографії фіксованих препаратів штамів *S.thermophilus* а також вимірювали величину їх капсул. Для виділення екзополісахариду нарощували досліджувану культуру у 100 см³ 10% стерильного знежиреного молока за 37°C упродовж 24 год. (3% інокуляту), центрифугували за 6000 об/хв упродовж 15 хв. Надосадову рідину зливали у мірний циліндр, вимірювали вихідний об'єм супернатанту. Даний об'єм ділили на дві рівні частини. Перший зразок надосадової рідини переносили у діалізний мішок Fisherbrand (ширина – 45 мм, товщина стінок – 20 мкм) та проводили діаліз проти дистильованої води – виділення вільного екзополісахариду. До другого зразку добавляли один об'єм сульфогаліцилової кислоти 8% та витримували розчин упродовж 30 хв за температури 4°C, потім поміщали у діалізний мішок – виділення капсульного екзополісахариду. Процес діалізу проводили у холодному приміщенні, міняючи дистильовану воду кожну годину до повної відсутності низькомолекулярних вуглеводів. Після закінчення діалізу обидва розчини зливали у мірні циліндри, щоб виміряти об'єм розчинів на виході. До кожного зразку діалізату добавляли три об'єми холодного етанолу та витримували за температури 4°C упродовж 24 годин. Отримані зразки центрифугували за 6000 об/хв упродовж 15 хв. Осад переносили у залізні бокси для висушування. Вимірювали окремо вихідну масу боксів та разом із мокрим осадом. Обидва бокси ставили у сушильну шафу за температури 55°C. Проводили періодичне вимірювання маси даних боксів, висушування припиняли після досягнення сталої ваги [6-9].

Результати дослідження.

Встановлено, що 74% від загальної кількості обстежених штамів *S. thermophilus* були резистентними щодо видоспецифічних фагів fS₁ та S_t-2 з колекції бактеріофагів, виділених за промислових умов (табл.1). За індексом літичної активності встановлено, що фаг S_t-2 є агресивнішим по відношенню до досліджених бактерій. Значення I_л для нього становило 0,26, що у 1,5 рази більше ніж для фага fS₁.

Мікроскопіювання фагостійких (FR) штамів показало, що вони мали гомогенну популяцію клітин у культурі - диплококи, ланцюжки коків, які мали капсули. Під час морфологічного аналізу капсул було встановлено, що їхній розмір у FR штамів термофільних стрептококів варіював у достатньо широких межах 4,0 – 12,6 мкм (табл. 1) (діапазон товщини капсули у різних штамів).

Фагочутливі (FS) штами утворювали дві морфогрупи: 1) культури з гетерогенною, неоднорідною морфологією клітин - диплококи без капсул, багато «пустих клітин» (клітини, що втратили здатність до забарвлення цитоплазми), 2) диплококи в капсулах невеликого розміру 1,7 – 1,9 мкм. Капсули такого розміру не захищали бактерії від впливу бактеріофагу S_t-2, в той час як до фагу fS₁ вони були стійкими.

Було проведено дослідження ролі екзополісахаридної капсули у захисті клітин від фагового ураження. Для цього порівнювали фагостійкість культур *S. thermophilus*, що продукують Crps, до та після обробки 30% трихлороцтовою кислотою (ТХО). Вплив кислоти на капсули спостережено

безпосередньо під мікроскопом, приклад показано для культури St 381/1 на рис. 1.

Таблиця 1 - Взаємозв'язок фагостійкості і капсулоутворювальної здатності *S. thermophilus*

Номер штаму	Наявність капсули	Розмір капсули, мкм		Фаг fS ₁	Фаг S _t -2
		мін-макс	середнє		
2136	+	5,8-8,9	6,3	FR**	FR
2142	-*	-	-	FS	FS
66	+	2,5-9,0	4,9	FR	FR
6 ₁₂	-	-	-	FS	FS
27с	+	3,8-10,9	6,7	FR	FR
2 ⁷	-	-	-	FS	FS
2137	+	10,3-10,6	10,5	FR	FR
6-15	+	1,5-2,4	1,9	FR	FS
2138	+	5,6- 7,7	6,7	FR	FR
2196	+	4,9-6,9	5,9	FR	FR
2145	+	2,6-6,1	4,3	FR	FR
74	+	3,2-4,9	4,0	FR	FR
27/2	+	1,2-2,3	1,7	FR	FS
2120	+	4,1-8,0	6	FR	FR
2185	+	4,1-10,3	6,2	FR	FR
2178	+	6,6-9,6	8,1	FR	FR
2192	+	8,3-17,0	12,6	FR	FR
81	+	10,4-11,6	11,0	FR	FR
2168	-	-	-	FS	FS
2193	+	9,7-10,1	9,9	FR	FR
2147	-	-	-	FS	FS
A8M	+	11,1-12,7	11,9	FR	FR
381/1	+	4,1 - 9,2	6,6	FR	FR

Примітка: * - не має капсули ; ** FR/FS – фагостійкий/фагочутливий штам



А Б

Рис. 1 - Фіксовані препарати культури *S. thermophilus* 381/1 зафарбовані за методом Омелянського (збільшення 10x100):

А – довгі ланцюжки коків із капсулою різного розміру;

Б – ланцюжки коків без капсул.

Клітини, які було оброблено кислотою за температури 20°C, мали характерну для них морфологію - ланцюжки коків різної довжини у капсулах. При цьому розмір капсул варіював від 4,1 до 9,2 мкм (рис.1 А).

Зразок культури St 381/1, який було піддано не тільки дії ТХО, але й нагріванню впродовж 5 хв за температури 100°C, не показав наявності капсул (рис.1 Б).

Дослідження відношення до фагів fS₁ та S₁-2 показало, що оброблені культури, позбавлені природного захисного чохла були вразливими до впливу фагів.

У результаті даного дослідження було виявлено, що приєднання капсули до поверхні клітинної стінки бактерій відбувається дуже міцно. Robitaille висловлював припущення, що даний зв'язок існує завдяки електростатичним силам [10].

Оброблення клітин культур кислотою призводило до руйнації Cps полісахариду та, ймовірно, полегшенню доступу фагів до специфічних сайтів-рецепції на бактеріальній стінці. Було встановлено, що здатність культур протистояти впливу бактеріофагу може бути обумовлена рівнем продукції як капсульного так і вільного полісахариду. Так, штами St 381/1 та St 2192 були фагостійкими та мали найвищі показники продукції Eps та Cps полісахаридів (рис. 2).

Зроблено підтвердження існуючого раніше припущення, що Cps запобігає негативному впливу бактеріофагів. Наприклад, штаму St 2136 характеризувався здатністю до продукції лише Cps полісахариду і був резистентним до фагів (див. рис. 2). Необхідно зауважити, що невелика за розміром капсула не захищала повністю штами від усіх типів фагів. Культури St

6-15 та St 27/2 хоча і продукували Cps полісахарид, але в значно меншій кількості порівняно з FR штамми, і були чутливими до фагу St-2.

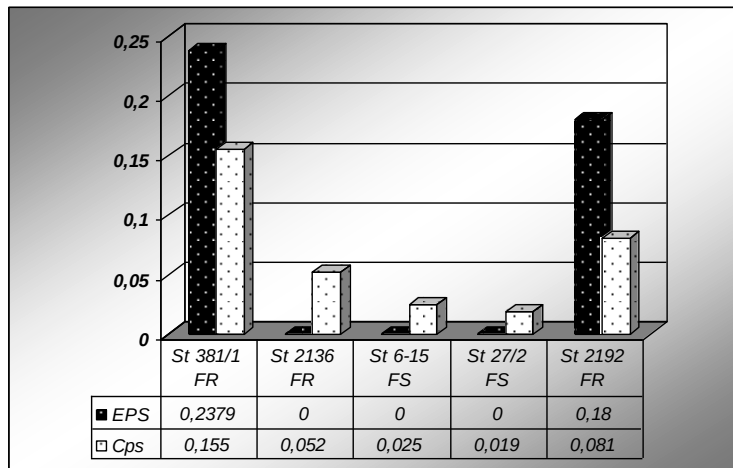


Рис. 2 - Вміст вільного (Eps) та капсульного (Cps) полісахариду FR та FS культур *S. thermophilus*

Отже, в результаті проведеного дослідження було встановлено структурно-функціональні відмінності між FR та FS культурами *S. thermophilus* та підтверджено роль Cps полісахариду у захисті клітин від фаголізу.

Такі результати узгоджуються з даними інших дослідників, які стверджують про те, що здатність молочнокислих бактерій утворювати капсули позитивно впливає не тільки на реологічні властивості кисломолочних продуктів, зокрема, збільшенням в'язкості, посиленням пластичності згустку та його стійкості до синерезису при механічному втручанні, але й є природним захисним механізмом від фагового ураження [11-13]. Про зв'язок між здатністю до продукції екзополісахаридів і фагостійкістю повідомляється у статті Deveau H. et all [14]. Проте автори наголошують, що фагостійкість Eps^+ штамів обумовлена не лише цією властивістю культури а і, як правило, комплексом інших фагозахисних механізмів.

Однак, на нашу думку, при первинному відборі перспективних штамів для включення їх до складу заквашувальних композицій доцільно проводити ретельний морфологічний аналіз штамів *S. thermophilus* щодо здатності утворювати капсули впродовж росту у молоці або поживному середовищі.

У результаті проведеної роботи було відібрано штам *S. thermophilus*, які характеризувались здатністю до продукування капсульних екзополісахаридів, фагостійкістю, перспективні до застосування у біотехнологічних розробках. Штам IMB B-7247 захищено патентом України № 92287.

Висновки. Виявлено відмінності між фагорезистентними та фагочутливими штамми *S. thermophilus* у продукуванні вільного та капсульного полісахаридів клітинної стінки. Показано, що екзополісахаридна капсула може захистити клітини від літичної дії певних типів фагів *S. thermophilus*.

Література

1. Gancel F., Novel G. Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. Conditions of production//Journal of Dairy Science. – 1994. – Vol. 77. – № 3. – P. 124-129.
2. Casteren W. H. M., P. de Waard, Dijkema C., Schols H. A., Voragen A. G. J. Structural characterisation and enzymatic modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B891//Carbohydr. Res. – 2000. – Vol. 327. – P. 411-422.
3. Saxelin M.-L., Nurmiaho E.-L., Korhola M. P., Sundman V. Partial characterization of a new C3-type capsule-dissolving phage of *Streptococcus cremoris*//Can. J. Microbiol. – 1979. – Vol. 25. –P. 1182-1187.
4. Van Geel-Schutten G. H., Faber E. J., Smit E., Bonting K. Biochemical and structural characterization of the glucanandfructanexopolysaccharides synthesized by the *Lactococcus reuteri* wild-type strain and by mutant strain//Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – Vol. 65, № 7. – P. 3008-3014.
5. Адамс М. Бактериофаги. – М.: Мир. - 1961. – 527 с.
6. Пирог Т.П., Іванушкіна Г. О., Гарбачук С. О. Модифікація вагового методу кількісного визначення полісахариду етаполану//Харчова промисловість. – 2008. – № 7. – С. 14-16.
7. Cerning J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria//FEMS Microbiol. – 2007. – Vol. 87. – P. 113-130.
8. Gruter M., Leeftang B. R., Kuiper J., Kamerling J. P., Vliegthart J. F. G. Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in skim milk//Carbohydr. Res. – 2003. – Vol. 239. – P. 209-226.
9. Ricciardi A., Parente E., Crudele M. A., Zanetti F., Scolari G., Mannazzu I. Exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* SY: production and preliminary characterization of the polymer//Journal of Applied Microbiology. – 2002. – Vol. 92. – P. 297-306.
10. Robitaille G., Moineau S., St-Gelais D., Vadeboncoeur C., Britten M. Detection and quantification of capsular exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* using lectin probes//J. Dairy Sci. – 2006. – Vol. 89. – P. 4156-4162.
11. Hassan A.N., Frank J.F., Smidt K.A., Shalabi S.I. Rheological properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures//Journal of Dairy Science. – 1996. – № 79. – P. 2091-2097.
12. Hassan A.N., Corredig M., Frank J. F. Capsule formation by nonropy starter affects the viscoelastic properties of yogurt during structure formation// Journal of Dairy Science. – 2002. – Vol 85. – №4. – P. 716-720.
13. Hassan A. N., Ipsen R., Janzen T., Qvist K.B. Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides//Journal of Dairy Science. – 2003. – № 86. – P. 1632–1638.
14. Deveau H., Marie-Rose Van Calsteren, Moineau S. Effect of exopolysaccharides on phage-host interactions in *Lactococcus lactis*//Appl. Environ. Microbiol.-2002.- Vol. 68, N 9. – P.4364-4369.