

УДК 578.81

Науменко О.В., к.т.н., старший науковий співробітник відділу біотехнології Інституту продовольчих ресурсів НААН України, м.Київ, naumenkoo@list.ru

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. Розроблено методичні вказівки з визначання лізогенних штамів молочнокислих бактерій.

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

O. V. Naumenko, Ph. D., Senior Researcher Department of Biotechnology Institute of Food Resources of NAAS of Ukraine, Kiev, naumenkoo@list.ru

Study of the effect of temperate phages on industrial strains of lactic acid bacteria

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. Methodical instructions for determination of lactic acid bacteria lysogenic strains were worked out.

Key words: *bacteriophages of lactic acid bacteria, prophage, induction, mitomycin C, lysogenicity.*

Відомо, що в залежності від реакції росту у бактеріальній клітині-хазяїні бактеріофаги розподіляють на дві основні категорії – вірулентні або літичні бактеріофаги (інфікують та спричиняють 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 ізолятив 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 заквашувальної композиції залучено лізогенний штам, то вірогідність того, що вивільнені профаги будуть інфікувати ту чи іншу чутливу до них культуру закваски є дуже високою. У результаті буде порушено співвідношення між компонентами закваски, або взагалі втрачено якусь 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 може бути виявлено за лізисом клітин та дослідженням за допомогою електронної мікроскопії, або ж розмноженням фагу на індикаторних штаммах. 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, Reurolle 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. diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium* з колекції промислових культур відділу біотехнології ППР. 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 із 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 до контрольної, 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 досліджах 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. Вочевидь, хлороформ руйнує оболонки клітин, що 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 аналізування.

Було опрацьовано та визначено оптимальні умови для індукції профагів лактобактерій за допомогою мітоміцину С. Реакцію зниження оптичної густини бактеріальної суспензії у результаті лізису профагами, 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).

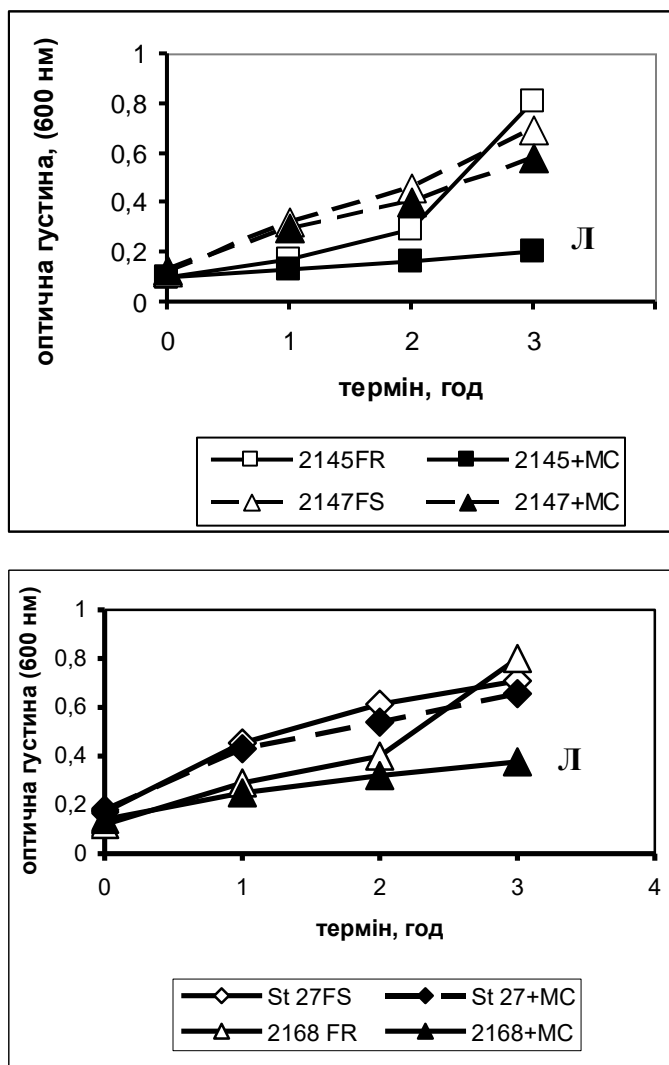


Рис. 1 - Вплив мігоміцина С на розвиток лактобактерій I групи:Л-лізогенна культура

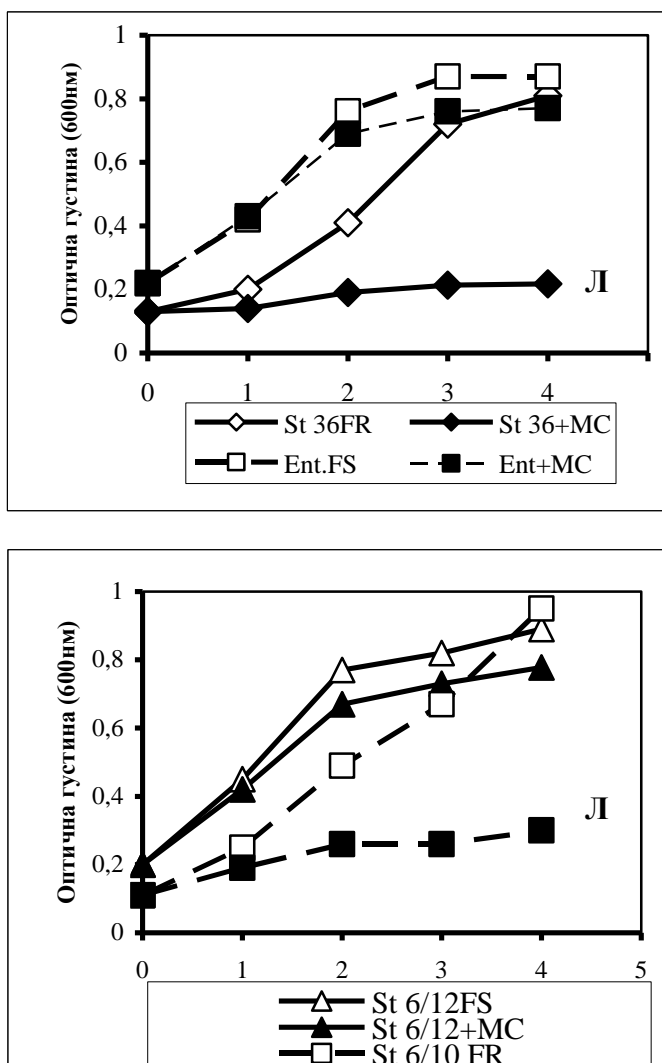


Рис. 2 - Вплив мітоміцину С на розвиток лактобактерій II групи:
Л-лізогенна культура

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 подальша витримка упродовж 4-ої години культивування істотно не впливала на індукцію профагів, як для I так і для II груп культур (рис.3).

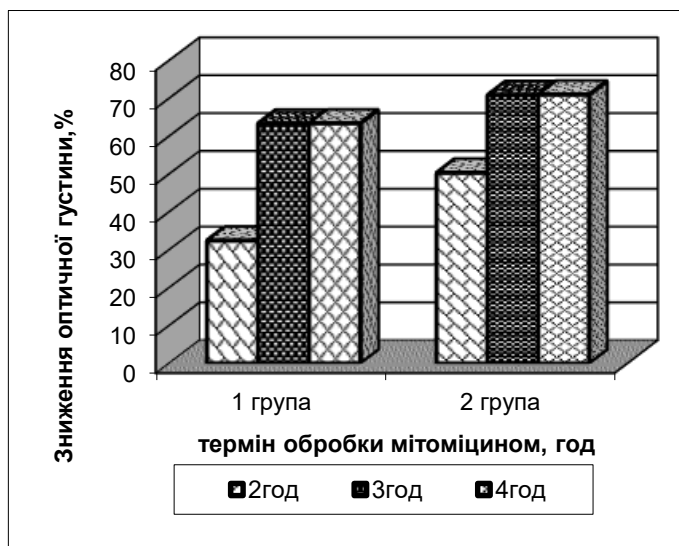


Рис.3 – Індукція лізису культур під впливом мітоміцину, за 100% брали оптичну густину необробленої культури

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 Kilic 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 Near 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. 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), 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].

Необхідно також наголосити, що культури, визначені у цій роботі як лізогенні, були в той же час фагорезистентними до вірулентних фагів з колекції відділу біотехнології ППР. 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.
4. На підставі отриманих наукових результатів розроблено „Методичні вказівки з визначення лізогенних штамів молочнокислих бактерій”.

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 lactis 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.