

УДК 578.81

Лактофаги, виділені на молокопереробних підприємствах України*О.В. Науменко, кандидат технічних наук;**Н.Ф. Кігель, доктор технічних наук*

Технологічний інститут молока та м'яса НААН, м.Київ

*Проведено дослідження біологічних властивостей вірулентних бактеріофагів молочнокислих бактерій, виділених на молокопереробних підприємствах України. На основі результатів вивчення морфології за допомогою електронної мікроскопії, генетичних досліджень і спектру літичної активності визначено таксономічне положення фагів *Lactococcus lactis*.*

Дослідження біологічних властивостей бактеріофагів молочнокислих бактерій були та залишаються на сьогоднішній день актуальним завданням біотехнологів молочної галузі. Чутливість молочнокислих бактерій до інфікування фагом створює цілу низку ускладнень під час виробництва різноманітної кисломолочної продукції та сирів, призводить до втрати їхньої якості та економічних збитків. Тому дослідження бактеріофагів лактобактерій переважно стосуються вивчення фізіологічних, культуральних характеристик для встановлення в першу чергу ступеню їхньої інфекційності та видоспецифічності щодо заквашувальної мікрофлори. Так, дослідження останніх років встановили широке розповсюдження бактеріофагів на молокопереробних підприємствах як нашої країни, так і за кордоном. Кількість бактеріофагів, спектр літичної активності, шляхи та джерела розповсюдження фагів на різних молочних заводах дуже варіюють [2; 14; 18]. Ґрунтовніші дослідження молекулярної біології фагів молочнокислих бактерій, їхньої тонкої морфологічної будови дозволяють не тільки ідентифікувати та визначити таксономічне положення фагів, але й отримати необхідні дані для кращого розуміння закономірностей їхньої взаємодії з лактобактеріями та прогнозування агресивності по відношенню до виробничих заквашувальних культур, розробки ефективних моніторингових систем та антифагових стратегій [6; 19]. Ці питання є особливо актуальними в Україні, оскільки такі дослідження практично не проводились, незважаючи на високий ступінь ризику фагового ураження біотехнологічних процесів у переробці молочної та м'ясної сировини.

Метою роботи було дослідження основних біологічних властивостей фагів молочнокислих бактерій, виділених на молокопереробних підприємствах України.

Матеріали та методи. Об'єктами досліджень були фагові ізоляти з колекції промислових бактеріофагів молочнокислих бактерій відділу біотехнології ТІММ [4]. У роботі застосовували вірусологічні, мікробіологічні та генетичні методи досліджень. Виділення та пасажування чистих ліній фагів проводили, використовуючи метод подвійного агару із 10 мМ CaCl₂ [1]. Фаги

нагромаджували у високому титрі методом зливного лізису за [3]. Отримані фаголізати центрифугували за 11 тис.об./хв. упродовж 20 хв за температури 4 °С. Кінцевий титр фагів у супернатанті становив 10^{10} БУО/см³. Морфологію фагів, підготованих у високому титрі, досліджували за допомогою електронного мікроскопу EM-125 (м. Суми, Україна) за напруги 75 кВольт та збільшенні $\times 80000$. Препарати вірусного матеріалу готували на мідних сіточках з плівками-підкладками з нітроцелюлози методом негативного контрастування 2% водним розчином фосфорновольфрамової кислоти. Виділення фагової ДНК проводили згідно з [20]. Електрофорез фагової ДНК здійснювали у 0,8% агарозному гелі, що містив 0,25 мкг/см³ етідій броміду у 1xTAE буфері (0,04M Tris, 0,04 M оцтова к-та, 1mM EDTA, pH 8,0). ДНК фагів перед нанесенням на гель з'єднували з буфером 6xLoading Dye Solution. Розміри фагової ДНК порівнювали з ДНК фага λ /EcoRI+HindIII.

Результати досліджень та їх обговорення.

У відповідності до вимог Міжнародної комісії з таксономії вірусів, для створення систематизованої колекції фагів молочнокислих бактерій, яка є базою для генетичних досліджень і науково-практичних розробок протифагових заходів, на першій стадії аналізували **морфологію фагів**. Для

цього відібрали 40 фагів, які ефективно репродукувались на гомологічних культурах. Дослідні результати електронного мікроскопіювання порівнювали з літературними даними щодо класифікації фагів молочнокислих бактерій за морфотипами [9; 11].

Було встановлено, що усі досліджені фаги мали довгі нескоротливі хвостові відростки, а за формою головки фаги розрізнялись між собою. В колекції виявлено фаги з ікосаедричними головками морфотипу В1 і фаги з пролатними головками морфотипу В2. Мікрофотограми головок фагів із схематичним зображенням різних геометричних форм головок подано на рис 1.

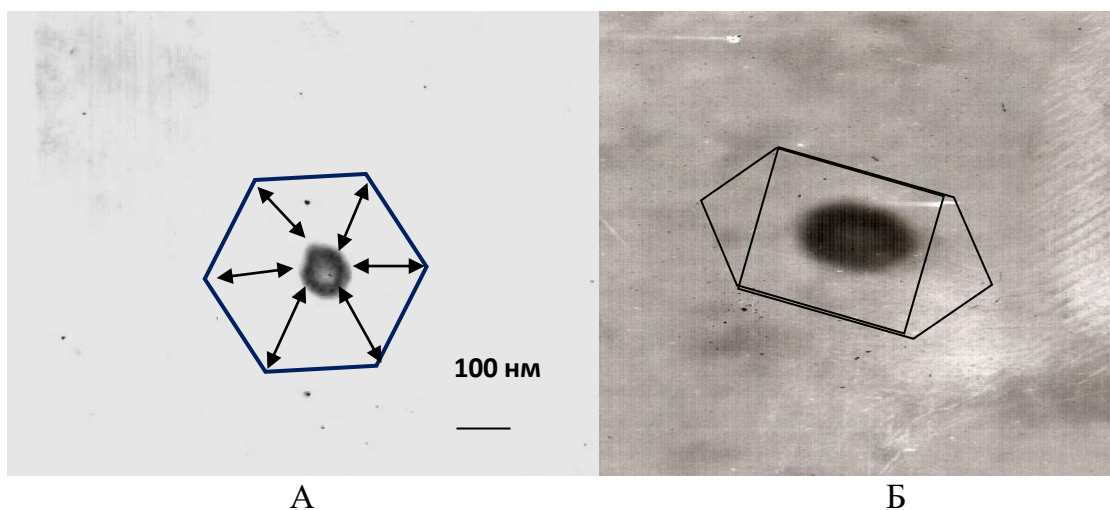


Рис. 1 - Мікрофотограми фагових головок:
А- ікосаедрична головка морфотипу В1; Б- пролатна головка морфотипу В2

Вивчення морфометричних характеристик вірусних часток показало, що фаги можна розподілити на 3 групи. Більшість досліджених фагів належали до морфотипу В1 – 69,3%. Фаги морфотипу В1 утворювали 2 підгрупи залежно від розмірів хвостового відростку. Розміри віріонів подано у таблиці 1.

Таблиця 1 - Морфометричні характеристики фагів

№ групи	Морфо-тип	Діаметр головки, нм	Довжина хвоста, нм	Фаговий комірець	Кількість фагів, %
1	В1-1	45-48	125-135	-	46,1
2	В1-2	46-50	100-105	-	23,2
3	В2	40-44 x 46-50	72-75	-	30,7

За кордоном згідно з літературними даними також переважно згадувались фаги морфотипу В1, хоча часто зустрічаються описи фагів морфотипу В2. Так, José Parada et al. досліджував стрептококові фаги і визначив, що вони є ДНК-вмісними, мають пролатні головки діаметром (36-69) нм та хвіст довжиною (102-110) нм, і відніс їх до групи В за *Bradley* та групи В2 за *Ackermann* [17]. У Білорусії також визначили поширення фагів морфотипу В2 с2 виду - 63,6% від досліджених вірусів [18]. У Германії с2 вид фагів теж був доміантним [12]. У Росії більшість фагів, що були досліджені, було віднесено до морфотипу В2 - частка таких фагів становила 81-83 %. Згідно з даними І.С. Протасової фаги морфотипу В1 розподілили на 4 підгрупи залежно від розмірів фагових часток, причому більшість фагів морфотипу В1 віднесли до підгрупи В1/1 – 62,2% [5].

Поширення фагів морфотипу В1 в Україні співпадає з даними досліджень багатьох зарубіжних науковців. Так, за даними А. К. Szczepańska et al. у Польщі частіше визначали фаги 936 типу (морфотип В1) – у 69% випадків [20]. Подібні результати отримано і науковцями Європейських країн, Нової Зеландії, США, Канади - літичний тип фагів виду 936 (морфотип В1) превалював над с2 видом фагів (морфотип В2) [2; 7; 15].

Було зроблено припущення, що відмінності у поширенні різних видів фагів обумовлені складом заквашувальних культур, які переважно використовуються у тій чи іншій країні [8; 11].

За даними науковців с2 вид фагів має ширший спектр літичної активності порівняно з 936видом [2; 15; 16]. Але це не завжди так: певні культури чутливі як до с2, так і до 936 виду фагів. Це свідчить про високу адаптаційну здатність лактофагів до інфікування різних видів культур молочнокислих бактерій.

Ще одне пояснення більшого поширення фагів 936 виду надав С. Madera et al. Відмінності у частоті виявлення фагів різних видів може бути обумовлена різною стійкістю цих фагів до дії високих температур. Так, фаги Р335 виду повністю інактивувались після 20 хв за температури 60°C. Обробка упродовж 10 хв за 70°C інактивувала фаги с2 виду, а фаги 936 виду зберігались навіть за обробки упродовж 30 хв за 75°C. Фаги 936 виду були у 35 разів стійкішими

порівняно з с2 видом, які витримували обробку лише упродовж 15 с за 75°C [13].

На нашу думку головна причина частішого виявлення фагів морфотипу В1 саме в більшій толерантності цих фагів до режимів температурних обробок, прийнятих у нас на виробництві. Це припущення буде перевірено у подальших наших дослідженнях.

Усі досліджувані фаги було розподілено на 4 групи залежно від спектру їхньої літичної активності. Як видно з табл. 2 найбільш поширеними та вивченими в колекції є фаги I - III груп.

Співставлення результатів дослідження літичної активності фагів та морфології вірусних часток показало, що між цими показниками не має корелятивних зв'язків. У колекції були фаги, що мали подібне коло хазяїв, але різну морфологію, і відносились до різних морфотипів. І, навпаки, були фаги одного морфотипу з різним спектром літичної активності. Подібні результати щодо відсутності кореляції між морфотипами та видоспецифічністю лактофагів було отримано К.Р. Tsaneva у Болгарії [21].

Таблиця 2 - Розподіл фагів на літичні групи та морфотипи

№ п/п	Літична група фагів	Спектр літичної активності	Морфотип
1	I	<i>L.lactis ssp lactis, L.lactis ssp cremoris, L.lactis ssp.diacetilactis</i>	B1-1
2	I	<i>L.lactis ssp lactis, L.lactis ssp cremoris, L.lactis ssp.diacetilactis</i>	B1-2
3	I	<i>L.lactis ssp lactis, L.lactis ssp cremoris, L.lactis ssp.diacetilactis</i>	B2
4	II	<i>L.lactis ssp lactis, L.lactis ssp.diacetilactis</i>	B1-2
5	III	<i>S.thermophilus</i>	B1
6	IV	<i>E.faecium</i>	нд*

Примітка:* нд-не досліджували

Генетичні дослідження фагового геному. За результатами генетичних досліджень встановлено, що відібрані до колекції фаги є дійсно вірусами молочнокислих бактерій. Геном фагів представлений лінійною дволанцюговою ДНК, що є характерною ознакою фагів лактококів [1; 11]. Аналіз електрофореграм (рис. 2-3) виділеної ДНК фагів показав, що за розміром геному досліджені фаги можна розподілити на 2 групи: фаги з ізометричною головкою з розміром ДНК 21-23 тисяч пар нуклеотидів (тпн); фаги з витягнутою пролатною головкою, розмір ДНК 18-20 тпн.

Було встановлено, що між морфометричними показниками і розмірами фагової ДНК існують зв'язки. Коефіцієнт кореляції між розмірами фагової головки та ДНК фагів різних морфотипів становив $r = 0,96$ ($n = 20$, $p < 0,05$).

Такі результати співпадають з літературними даними [10], що вказує на коректність проведених досліджень з ідентифікації фагів лактококів.

Висновки. Проведено електронномікроскопічний аналіз фагів лактобактерій з колекції відділу біотехнології та виявлено фаги морфотипів В1 і В2. Встановлено, що більшість фагів належали до морфотипу В1 – 69,3%. Фаги морфотипу В1 утворювали 2 підгрупи залежно від розмірів хвостового відростку. Досліджено видоспецифічність фагів, на підставі чого їх згруповано у 4 групи. Досліджено тип геному фагів - лінійна дволанцюгова ДНК. За розміром геному фаги формували 2 групи, які відповідали морфологічному розподілу. Визначено таксономічне положення вірулентних промислових фагів *Lactococcus lactis*: порядок *Caudovirales*, родина *Siphoviridae*, морфотип В1 та В2.

Бібліографія

1. Адамс М. Бактериофаги. – М.: Мир. - 1961. – 527 с.
2. Ганина В.И., Волкова И.Р., Калинина Л.В., Борисова Л.А. Состояние фагового фона на отечественных молочных предприятиях// Молочная промышленность. – 2005. - №10. – С.20-21.
3. Девіс Р., Бодстайн Д., Рот Дж. Методы генетической инженерии. Генетика бактерий: Пер. с англ. – М.: Мир, 1984.- 176 с.
4. Науменко О.В., Кігель Н.Ф. Дослідження розповсюдження бактериофагів на підприємствах молочного профілю України// Збірник наукових праць Луганського НАУ. Серія:Харчові технології — Луганськ: Видавництво ЛНАУ.- 2008. - № 88. - С. 161-166.
5. Протасова И.С. Повышение качества мелких сычужных сыров посредством углубления научных основ и разработки практических мер предотвращения фаголизиса заквасочной микрофлоры: Автореф. дисс. к.т.н. 01.17.00 / Вологда. – 1998. – 20 с.
6. B. del Rio, Binetti A.G., Martin M.C., Fernandez M., Magadan A.H., Alvarez M.A. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk//Food Microbiology.- 2007.- Vol. 24, N1. – P.75-81.
7. Bissonnette F., Labrie S., Deveau H, Lamoureux M., Moineau S. Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged cheddar cheese// J. Dairy Sci. - 2000. – Vol. 83. – P. 620-627.
8. Daly C., Fitzgerald G.F., Davis R. Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance// Antonie van Leeuwenhoek . – 1996. - Vol. 70. – P. 99-110.
9. Deveau H., Labrie S.J., Chopin M.C., Moineau S. Biodiversity and classification of lactococcal phages // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol.72, N 6. – P.4338-4346.
10. Jarvis A.W. DNA-DNA homology between lactic streptococci and their temperate and lytic phages // Appl. Environ. Microbiol. – 1984. – Vol. 47. – P. 343.

11. *Jarvis A. W.* Bacteriophages of lactic acid bacteria // *J. Dairy Sci.* – 1989. – Vol. 72. – P. 3406-3428.
12. *Josephsen J., Petersen A., Neve H., Nielsen E.W.* Development of lytic *Lactococcus lactis* bacteriophages in a Cheddar cheese plant// *Int. J. Food Microbiol.* – 1999. -Vol. 50. – P. 163-171.
13. *Madera C., Monjardín C., Suárez J. E.* Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70, N 12. – P. 7365-7371.
14. *Miklic A., Rogelj I.* Characterization of lactococcal bacteriophages isolated from Slovenian dairies// *Int. J. Food Sci Technol.* – 2003. - Vol. 38. – P. 305-311.
15. *Moineau S., Borkaev B., Holler B.J., Walker S.A., Kondo J.K., Vedamuthu E.R., Vanderbergh P.A.* Isolation and characterization of lactococcal Bacteriophages from cultured plants in the United States // *J. Dairy Sci.* – 1996. – Vol. 79. – P. 2104-2111.
16. *Moineau S., Fortier J., Ackermann H.-W., Pandian S.* Characterization of lactococcal bacteriophages from Quebec cheese plants//*Can. J. Microbiol.* – 1992. - Vol. 38. – P. 875-882.
17. *Parada J.L., Maria I. La Via, Sorari A. J.* Isolation of *Streptococcus lactis* bacteriophages and their interaction with the host cell // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1984. – Vol.47, N 6. – P.1352-1354.
18. *Raiski A., Belyasova N.* Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in the Republic of Belarus//*International Journal of Food Microbiology.* - 2009.- Vol.130, N1. – P.1-5.
19. *Suarez V., Moineau S., Reinheimer J., Quiberoni A.* Argentinean *Lactococcus lactis* bacteriophages: genetic adsorption studies// *Journal of Applied Microbiology.*- 2008.- Vol. 104, N 2. - P. 371-379.
20. *Szczepanska A.K., Hejnowicz M.S., Kolakowski P., Bardowski J.* Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in Polish dairy environment // *ABP.* – 2007. – Vol. 54, N 1. – P. 151-158.
21. *Tsaneva K. P., Tikhonenko A.S.* Electron microscopy of virulent phages for *Streptococcus lactis* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1976. – Vol. 31. – P. 590-603.

Автори висловлюють подяку Сопейко В.П. к.вет.н., с.н.співробітнику Інститута ветеринарної медицини НААН та Скрипкіній І.Я. к.б.н., с.н.співробітнику Інститута молекулярної біології та генетики НАНУ за консультативну допомогу при проведенні досліджень.

