

А. П. Райский, аспирант; С. Н. Шпилевский, студент; Н. А. Белясова, доцент

БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ РАСПРОСТРАНЕННЫХ НА МОЛОЧНЫХ КОМБИНАТАХ БЕЛАРУСИ ЛАКТОФАГОВ

We present here the results of an exploration and identification of the bacteriophage content of dairy products collected from milk plants localized in various regions of The Republic of Belarus. Molecular-genetic characteristics study by multiplex PCR analysis and transmission electron microscopy established that the twenty three studied widespread phages belong to three lactococcal phage species – c2 (17 of 23), 936 (3 of 23) and P034 (3 of 23), while P335 species phages were not detected. Yet, analyses of bacterial starter strains revealed that some of them are lysogenic and carry prophages of P335-type in their chromosome. Phage distribution in The Republic of Belarus was additionally discussed.

Введение. Популяция бактерий *Lactococcus lactis*, широко используемых в молочной промышленности в качестве активных «сквашивателей» молока, представляет собой особую экологическую нишу для воспроизводства и эволюции бактериофагов. Специфичные по отношению к лактококкам фаги (лактофаги) чрезвычайно широко распространены как в окружающей среде, так и на предприятиях, где эксплуатируются их хозяева, вызывая фаголизис последних. В технологические потоки фаги попадают из молока, которое даже после пастеризации не освобождается от этих устойчивых к факторам среды неклеточных форм жизни, а также из воздуха помещений, с пылью, из емкостей, коммуникаций и др.

В настоящее время выделены и охарактеризованы сотни фагов лактококков. Они классифицированы в десять видов по результатам ДНК-ДНК гибридизации, согласно особенностям морфологии вирионов, выявленных с помощью электронной микроскопии, а также по данным сравнительного анализа геномов. Однако на молочных комбинатах чаще всего встречаются только лактофаги трех видов: c2, 936 и P335. Представители этих трех видов принадлежат к семейству *Siphoviridae* (имеют двухцепочечную ДНК и длинный несокращающийся хвост) отряда *Caudovirales*.

Согласно литературным данным, лактофаги вида 936 являются доминирующими во Франции, Германии, Новой Зеландии и Канаде [1]. В то же время представителей вида c2 наиболее часто обнаруживали на территории России, а представителей вида P335 выявляли в течение последних 20 лет в США, Дании и Новой Зеландии [2]. В Республике Беларусь идентификация распространенных на ее территории лактофагов с использованием перечисленных выше молекулярно-генетических признаков не проводилось.

В данной работе представлены результаты изучения биоразнообразия и идентификации лактофагов, широко распространенных на молочных комбинатах Республики Беларусь.

Объекты и методы исследования. В работе использовали вирулентные лактофаги,

выделенные из кисломолочных продуктов производства различных предприятий Республики Беларусь. Фаги титровали на чувствительных тест-культурах *Lactococcus lactis* из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии.

Получение фаголизатов с высоким титром осуществляли в жидкой среде M17 в присутствии 0,5% глюкозы и 5 мМ CaCl₂.

Микроскопические исследования проводили с помощью трансмиссионного электронного микроскопа марки JSM-300. Пробы готовили следующим образом. Фаги концентрировали центрифугированием при 36600 g в течение 40 мин при 4°C. Отмывали в 1 мл 0,1М раствора ацетата аммония. Повторно центрифугировали и ресуспендировали в 15 мкл ацетата аммония. На пленки-подложки наносили 10 мкл суспензии фагов. Через 1 мин наносили раствор 2%-ной фосфорно-вольфрамовой кислоты.

ПЦР-анализ фаговых лизатов осуществляли в объеме 50 мкл, содержащем 1 моль/л каждого из трех пар праймеров, специфичных по отношению к фагам групп c2, 936 и P335; 1,25 U *Taq*-полимеразы ДНК («Fermentas», Литва), *Taq*-буфер 1x и 1 мкл лизата ($T = 10^8$ БОЕ/мл). В качестве контроля вместо лизата в рабочую смесь вносили 1 мкл стерильной среды M17. Амплификацию осуществляли в термоциклере «Терцик» при следующих режимах: 3 мин при 94°C, 35 циклов по 30 с при 94°C, 1 мин при 50°C и 1 мин при 72°C, последний шаг – 7 мин при 72°C. ПЦР-продукты разделяли с использованием 1,5% агарозного геля в ТАЕ буфере, окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ ($\lambda = 280$ нм).

Результаты и их обсуждение. Начиная с работ Jarvis [3], в качестве критерия идентификации лактофагов используется морфология их вирионов. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ) исследованы вирионы 23 бактериофагов, вирулентных по отношению к бактериям *Lactococcus lactis*. В результате среди исследуемой выборки выделены три группы фагов, представители которых различаются по морфологии вирионов. На рис. 1 приведены фотографии трех типичных по морфологии фагов, а в таблице – распределение всей коллекции по видам.

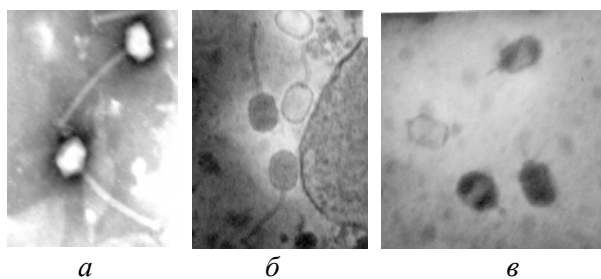


Рис. 1. Электронные микрофотографии лактофагов: а – BИМ BV-27 (вид 936); б – BИМ BV-36 (вид с2); в – BИМ BV-37 (вид P034)

Таблица
Результаты видовой идентификации
лактофагов

Фаги	Принадлежность к виду согласно данным	
	TEM	ПЦР
БИМ BV-25	с2	с2
БИМ BV-26	с2	с2
БИМ BV-27	936	936
Е04	с2	с2
БИМ BV-28	с2	с2
БИМ BV-29	с2	с2
БИМ BV-30	936	936
БИМ BV-31	936	с2
БИМ BV-32	P034	с2
БИМ BV-33	с2	с2
Е11	936	936
Е12	с2	с2
БИМ BV-34	с2	с2
Е14	с2	с2
Е15	P034	–
БИМ BV-35	с2	с2
БИМ BV-36	с2	с2
Е18	с2	с2
БИМ BV-37	P034	–
БИМ BV-38	с2	с2
БИМ BV-39	с2	с2
БИМ BV-40	с2	с2
БИМ BV-41	P034	–

В некоторых случаях на основании одних только морфологических признаков не удается идентифицировать лактофаги [4]. Labrie и Moineau [5] предложили для этих целей использовать еще один критерий – различия в размерах продуктов амплификации уникальных нуклеотидных последовательностей при ПЦР-анализе со специфическими олигонуклеотидами.

В данной работе для детекции уникальных последовательностей ДНК коллекционных фагов использовали метод мультиплексной ПЦР. Праймерами служили следующие последовательности: для фагов вида с2 – 5' СААТСГААГСААААГТТСГАГААС 3', 5' GCTT-TATCCATTTGTAGGTATGCTTCTGC 3'; для фа-

гов вида 936 – 5' ATCAGTTGGCTCAATGGAAG-АССААГСГГ 3', 5' GTTGCTTCTGCTGTTGGTGT-САААТГАГГА 3'; для фагов группы P335 – 5' GAAGСТАГГСГААТСАГТАААСТТГСТАГ 3', 5' СGGСТАТСТСГТСААТТГТТССGGTTGC 3'.

Отжиг олигонуклеотидных праймеров с ДНК фагов вида с2 должен приводить к появлению ампликона размером 444 п. н., вида 936 – 318 п. н., вида P335 – 196 п. н.

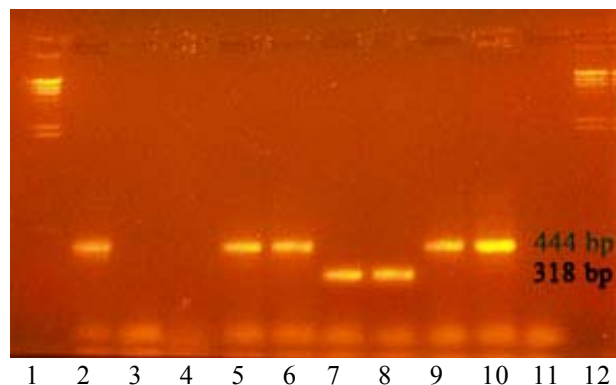


Рис. 2. Продукты ПЦР-анализа ДНК коллекционных лактофагов: 1, 12 – маркер; 2 – BИМ BV-29; 3 – BИМ BV-37; 4 – BИМ BV-41; 5 – Е14; 6 – Е18; 7 – BИМ BV-27; 8 – BИМ BV-31; 9 – BИМ BV-33; 10 – BИМ BV-38; 11 – контроль (не содержит фаголизата)

ДНК всех коллекционных фагов исследовали в ходе ПЦР-анализа с указанными праймерами. Результаты одного из подобных экспериментов приведены на рис. 2. Оказалось, что среди 23 изолятов 17 относятся к виду с2 и 3 изолята – к виду 936. Для трех фагов ампликоны не были выявлены. Также не было обнаружено ампликонов размером 196 п. н., типичных для фагов вида P335.

Однако ПЦР-анализ ДНК бактерий *L. lactis* позволил обнаружить характерные ампликоны размером 196 п. н. для трех из 30 исследованных штаммов. Это может свидетельствовать о присутствии профагов вида P335 в ДНК исследованных заквасочных бактерий.

Для 18 коллекционных лактофагов результаты идентификации по данным морфологических исследований совпали с данными идентификации с помощью ПЦР-анализа. Для двух фагов (БИМ BV-31 и БИМ BV-32) результаты идентификации по двум использованным критериям носят противоречивый характер (см. таблицу). Данное обстоятельство может являться следствием высокой вариабельности признаков лактофагов. Подобные фаги, сочетающие свойства представителей двух видов, описаны в литературе [4].

Изученные признаки лактофагов позволили определить видовую принадлежность изолятов, что дало возможность составить общую картину распределения их в Республике Беларусь (рис. 3).

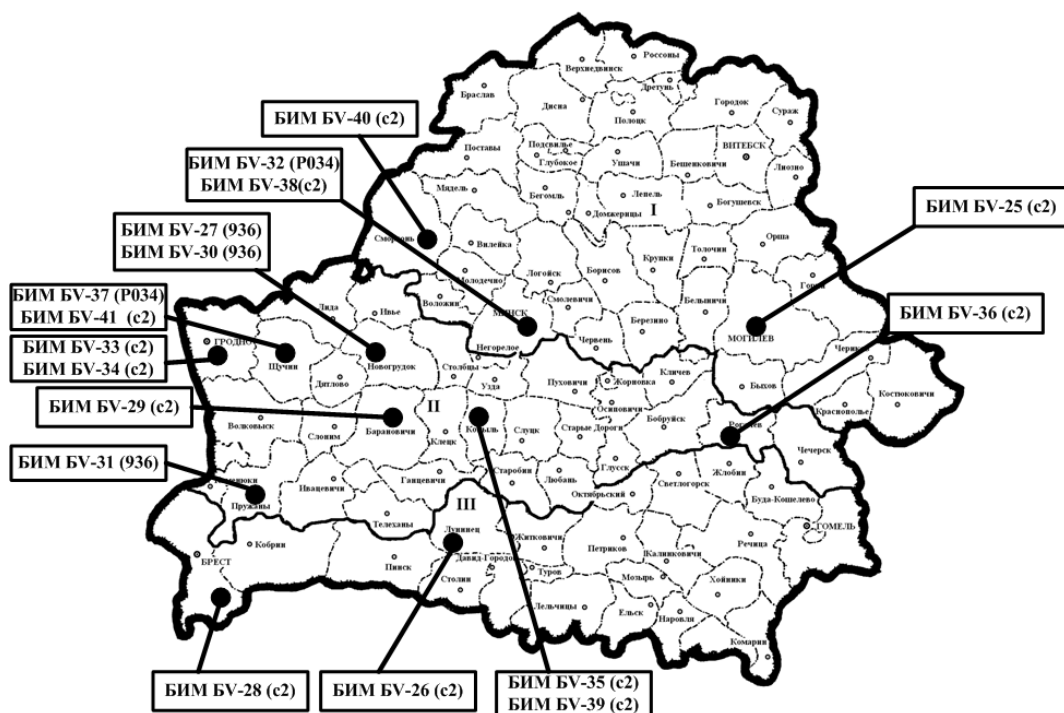


Рис. 3. Географическое распространение вирулентных лактофагов в Республике Беларусь

Данные по морфологии вирионов и размерам ампликонов уникальных последовательностей ДНК позволяют констатировать, что состав группы лактофагов, наиболее широко представленных в кисломолочных продуктах производства Республики Беларусь, имеет свои особенности: в нем очевидно преобладание фагов с удлинённой головкой (с2) и достаточно высокое относительное содержание фагов с короткими отростками (P034). Согласно литературным данным [1, 6], фаголизис на производстве в большинстве случаев вызывают фаги с изометрической головкой, принадлежащие к виду 936 – они составляют обычно до половины всех изолятов; четверть изолятов относится к виду с2 и оставшаяся четверть – к гетерогенному виду P335, чьи представители характеризуются маленькой изометрической головкой и могут быть как вирулентными, так и умеренными; фаги семейства *Podoviridae* обуславливают фаголизис редко.

Некоторые изоляты имеют широкое географическое распространение на территории Беларуси. В частности, фаг БИМ ВУ-29 распространён в Брестской и Минской областях, а фаг БИМ ВУ-27 обнаружен в Гродненской, Минской и Брестской областях. В то же время, обобщение данных позволяет сделать вывод о том, что большинство изолятов имеет более узкую географическую распространённость.

Заключение. Фаговый мониторинг является чрезвычайно важной составляющей контроля над процессами производства молочнокислых продуктов. Для идентификации видовой принадлежности фагов необходимо использо-

вать оба изученных признака. Использование ПЦР-анализа позволяет с большой точностью, достаточно экономично и в короткие сроки (4 ч) осуществлять детекцию и идентификацию бактериофагов.

Работа выполнена в рамках финансируемого задания ГППИ (2006–2010 гг.) «Новые биотехнологии».

Литература

1. Brussow, H. Phages of dairy bacteria / H. Brussow // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2001. – Vol. 55. – P. 283–303.
2. Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in Polish dairy environment / A. K. Szczepanska [et al.] // *Acta Biochimica Polonica.* – 2007. – Vol. 54. – P. 151–158.
3. Species and type phages of lactococcal bacteriophages / A. W. Jarvis [et al.] // *Intervirology.* – 1991. – Vol. 32. – P. 2–9.
4. Fortier, L. Genome sequence and global gene expression of Q54, a new phage species linking the 936 and c2 phage species of *Lactococcus lactis* / L. Fortier, A. Bransi, S. Moineau // *Journal of Bacteriology.* – 2000. – Vol. 188, № 17. – P. 6101–6114.
5. Labrie, S. Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. / S. Labrie, S. Moineau // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2000. – Vol. 66, № 3. – P. 987–994.
6. Biodiversity and classification of lactococcal phages / H. Deveau [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2006. – Vol. 72. – P. 4338–4346.