

Indukcija bakteriofaga u sojevima mlečnih streptokoka

(Induction of Bacteriophage in Lactic Streptococci)

dr. Ana BANINA, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, dr. Dragojlo
OBRADOVIĆ, Poljoprivredni fakultet, Beograd

Izvorni znanstveni rad — Original Scientific Paper
Prispjelo: 25. 3. 1986.

UDK:579.862:24

Sažetak

U osam sojeva koji pripadaju vrstama *S. lactis* i *S. lactis* subsp. *diacetylactis* istraživano je prisustvo bakteriofaga primenom UV zračenja i mitomycina C (MC). Pod uticajem različitih doza indukcionih sredstava kod pet sojeva je došlo do indukcije profaga. Nijedan od istraženih sojeva nije pokazao indikatorska svojstva. U radu je također istaknut značaj lizogenih bakterija za odabir sojeva koji ulaze u sastav startera.

Summary

Eight strains of lactic streptococci were examined for lysogeny by treatment with ultraviolet light and Mitomycin C. Induction of lysis in five strains demonstrated what lysogenic state is very common in lactic streptococci. No one indicator strain has been found. The possible significance of lysogeny for cheese making practice has been discussed.

Uvod

Proizvodnja sireva i kiselo-mlečnih napitaka zasniva se na fermentaciji mlečnog šećera s čistim kulturama bakterija mlečne kiseline. Kako je proces fermentacije tesno povezan s razvitkom i aktivnošću navedenih mikroorganizama, velika pažnja se poklanja odabiru, pripremanju i održavanju kultura. Navedeni starteri moraju biti vrlo aktivni i ne smiju biti kontaminirani nepoželjnim mikroorganizmima ili bakteriofazima, odnosno vrusima koji deluju na bakterije. Međutim, fermentacioni procesi odvijaju se bez postojanja aseptičnih uslova, u otvorenim nesterilnim sudovima s podlogom i mlekom koje je samo pasterizovano. Iz tog razloga kontaminacija kultura bakteriofazima je vrlo verovatna, što u najvećem broju slučajeva dovodi do prestanka aktivnosti startera.

Infekcija mlečnih streptokoka fazima kao i kod drugih bakterija obuhvata adsorpciju, stvaranje otvora na ćelijskom zidu i istiskivanje DNA faga u bakterijsku ćeliju. DNA faga se zatim višestruko umnožava uz istovremenu sintezu proteinske komponente, tako da nakon 40 — 50' na 30 °C dolazi do pucanja ćelijskog zida i oslobađanja 8 — 105 čestica faga koji sada započinju novi litički ciklus, odnosno inficiraju susedne ćelije. Očigledno je da fazi imaju izuzetno veliki multiplikacioni faktor i da veoma brzo inaktiviraju startere kod kojih ćelija predstavlja logaritamsku funkciju.

Međutim, ne moraju sve infekcije streptokoka da se završe lizom, kao što je napred opisano pod uticajem takozvanih virulentnih faga. Taj proces često može dobiti sasvim drugi tok koji doseže kulminaciju ustanovljavanjem lizogene bakterije. Ovu pojavu izazivaju umereni fazi čija se DNA ne umnožava, već se ugrađuje na specifična mesta u bakterijskom hromozomu i zajedno s njim umnožava. Sve dok se DNA faga, koja nosi naziv profag, zadržava na svojoj hromozomskoj lokaciji, ćelije ne trpe nikakav štetan uticaj. Međutim, ako se profag otme kontroli bakterijskog hromozoma i započne vegetativnu reprodukciju, dolazi do litičkog procesa koji je karakterističan za virulentne fage. Ova pojava, koja se naziva indukcija, može da nastane spontano, ali se daleko češće javlja pod uticajem indukcionih agensa, kao što su UV zraci ili MC.

Bakteriofazi su jedan od glavnih uzroka prestanka aktivnosti startera pa se danas u svetu poklanja velika pažnja rešavanju ovog problema. Napori koji se u tom pravcu čine obuhvataju niz postupaka, kao što su: iznalaženje boljih metoda za odabir sojeva, pripremanje radnih kultura za direktnu inokulaciju, rotacija kultura, i izolacija sojeva koji su manje osetljivi na fage, korišćenje podloga za inaktivaciju faga, pravilna primena sanitarnih mera u pogonu i primena tehnologije rekombinantne DNA u poboljšanju stabilnosti sojeva, što je u ovom momentu još uvek u početnoj fazi istraživanja.

Podaci iz literature pokazuju da je velik broj mlečnih streptokoka lizogen, odnosno da poseduje umerene fage koji se indikuju indukcionim sredstvima ili spontano (Kozak et al., 1983; Mc Kay and Baldwin, 1973; Lowrie, 1974; Park and Mc Kay, 1975, Huggins and Sandine, 1977; Meister and Ledford, 1979; Terzaghi and Sandine, 1981; Teuber and Lembke, 1982 i Reyrolle et al., 1982). I pored toga što je pojava lizogenog stanja kod mlečnih streptokoka veoma raširena, njen uticaj na aktivnost startera odnosno na sam tehnološki proces nije dovoljno jasan. Vrlo je verovatno da lizogeni sojevi, koji ulaze u sastav kultura, mogu da predstavljaju izvore faga i zato se preporučuje, ako je to moguće, njihovo testiranje na ovu pojavu uz istovremeno pronalaženje tzv. indikatorskih sojeva koji su osetljivi na fage oslobođene u toku indukcionog testa.

Uzimajući u obzir sve što je izneto, kao i činjenicu da na stepen indukcije utiče niz faktora, u ovom radu je prikazan uticaj dva indukciona agensa, UV zraka i mitomycina C, i to u različitim dozama, na indukciju profaga osam sojeva streptokoka grupe N.

Materijal i metode

Za održavanje sojeva korišćeno je sterilno obrano lakmus mleko. Sojevi su pročišćeni tako što su odgovarajuća ćelijska razblaženja naneta na M_{17} agar (Terzaghi and Sandine, 1975) a odatle su uzimane pojedinačne kolonije. Sledeći sojevi korišćeni u ovom radu su *S. lactis* 4113, 4109, W-81, K-9 i *S. lactis subsp. diacetylactis* Bu 1-k, Bu 2-K, 32 i F7/2.

Indukcija UV zračenjem izvedena je prema metodi koja predstavlja modifikaciju postupka koji su dali Huggins i Sandine (1977). Kulture stare 16—18 časova koriste se za inokulaciju 100 ml M_{17} bujona (5%). Inkubacija se vrši na 30 °C, i to 1—2 sata, da bi se dostigla logaritamska faza. Zatim se vrši centrifugacija na 4000 rpm/min u toku 15', a potom se ćelije rastvaraju u 50

Indukcija bakteriofaga u sojevima...

ml 0,1 mM Mg SO₄; 10 ml ćelijske suspenzije ubacuju se u sterilne petri šolje i izlažu dejstvu UV zraka. Talasna dužina UV lampe iznosila je 254 nm, rastojanje od petri šolje bilo je 21 cm, a dužina izlaganja bila je 15'', 20'', 30'' a u nekim slučajevima i 40'', 50'' i 60''. 5 ml ozračenog materijala meša se sa 5 ml M₁₇ bujona koji ima duplu koncentraciju i inkubira na 30 °C. Merenje zamućenosti prati se na spektralnom kolorimetru pri talasnoj dužini od 600 nm u toku pet sati.

Kod indukcije mitomycinom C (Sigma), bujonskim kulturama dodat je MC i to u koncentraciji od 2, 4, 6 i 8 ng/ml. MC je prethodno rastvoren u SM puferu. Dalji postupak je istovetan kao i kod UV indukcije.

Rezultati

Od osam istraženih sojeva koji pripadaju vrstama *S. lactis* i *S. lactis subsp. diacetylactis* kod pet je došlo do indukcije faga i to pod uticajem oba indukciona agensa. Iz podataka se vidi da nisu svi sojevi jednako osetljivi na odgovarajuće doze mitomycina C i UV zraka. Karakterističan primer za ovo je soj Bu 1-k, kod koga je do razbistravanja bujona došlo tek kada je trajanje UV zračenja produženo na 60''. Kraći vremenski razmaci nisu davali nikakav učinak (graf. 1).

Indukcija bakteriofaga postignuta je svim upotrebljenim koncentracijama MC (2, 4, 6 i 8 ng/ml), s tim što se kod prve koncentracije absorpcija najmanje smanjila. Karakteristično je da je do ove pojave došlo nakon tri sata inkubacije. Kod soja Bu 2-K u ovom vremenskom razmaku pod uticajem UV zračenja (30'') došlo je do blagog pada zamućenosti bujonske kulture, dok je kod upotrebe MC bujon bio bistar, odnosno ćelije su bile potpuno lizirane (graf. 2).

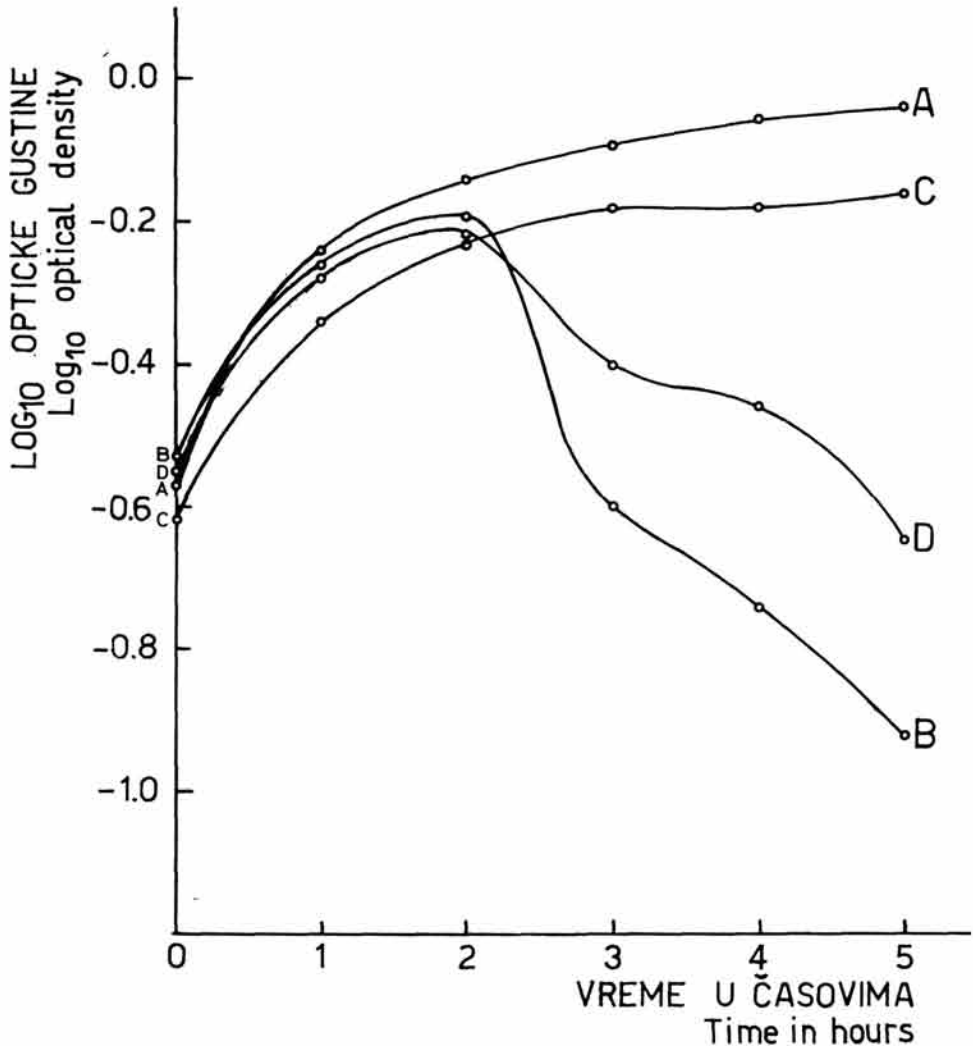
Od ostalih sojeva kod kojih je došlo do indukcije najosetljivija je bila kultura *S. lactis* 4113. U sojevima 4109, 32 i F 7/2 indukcija nije zapažena i pored toga što su vršeni ogledi s kulturama različite starosti uz istovremeno menjanje dužine UV zračenja, rastojanja lampe od petri šolje i koncentracije mitomycina C.

Nijedan od traženih sojeva nije bio osetljiv na lizate dobivene indukcijom što ukazuje na to da nije nađen soj s indikatorskim osobinama.

Diskusija

Sva dosadašnja istraživanja ističu neophodnost testiranja sojeva mezofilnih streptokoka da bi se utvrdilo da li su lizogeni ili ne. Rezultati prikazani u ovom radu pokazuju da je potrebno primeniti različite doze ili koncentracije indukcionih sredstava ako se želi efikasno identifikovati lizogeni soj. Očigledno je da sva istraživanja treba vršiti na 30 °C s kulturama koje se nalaze u logaritamskoj fazi rasta. Dobiveni podaci odgovaraju onima u literaturi (Meister and Ledford, 1979; Teuber and Lembke, 1982; Reyrolle et al., 1982). Podatak da je više od 50% istraženih sojeva u ovom radu lizogeno pokazuje takođe da je ova pojava i te kako raširena kod mlečnih streptokoka.

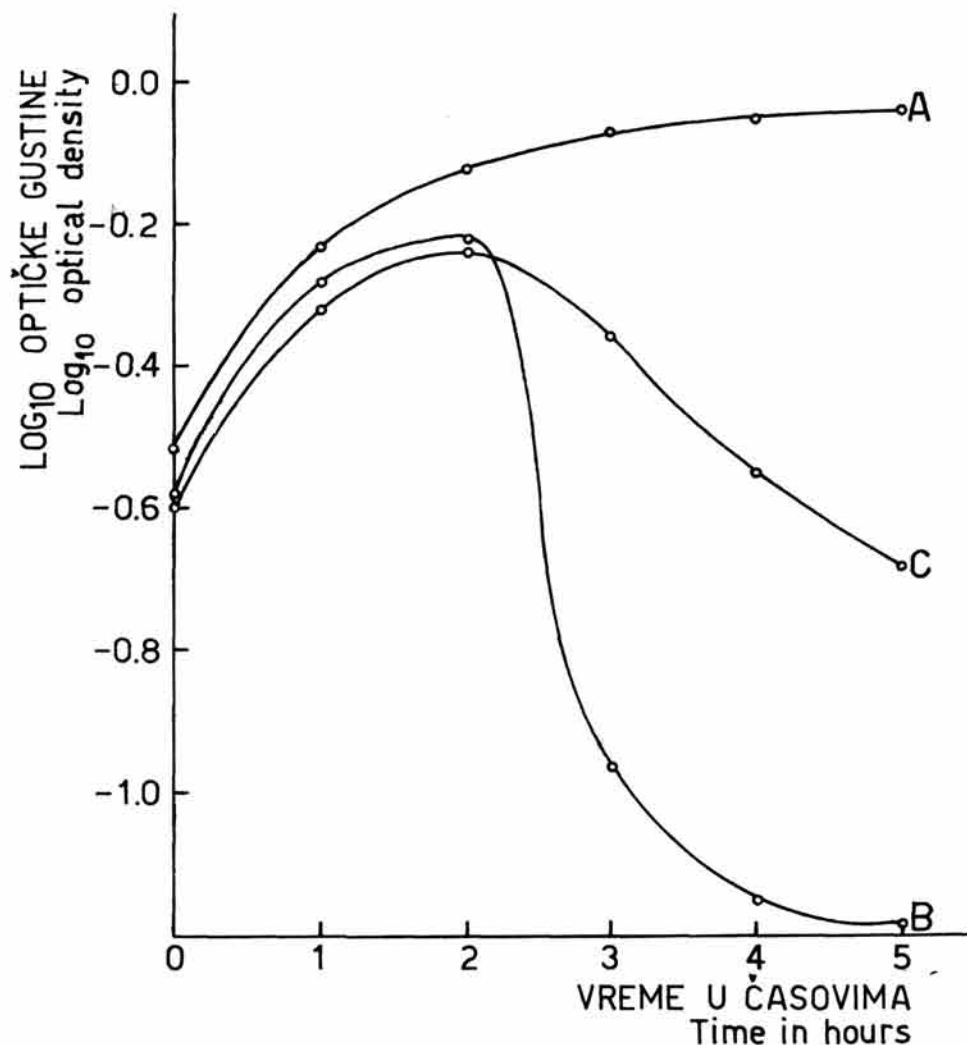
Međutim, ova istraživanja čini izuzetno interesantnim i neophodnim činjenica da do sada nije razjašnjeno u kojoj meri umereni fazi mogu da predstavljaju moguće izvore litičkih ciklusa u mlekarskim pogonima. Podatak da se sojevi osetljivi na indukovane fage teško pronalaze naveo je Teuber-a i Lembke-a (1983) da zaključuje da umerenim fazima ne treba pridavati poseban



Graf. 1. Indukcija faga u *S. lactis* subsp. *diacetylactis* Bu 1-K posle UV zračenja 30'' (C), 60'' (D), tretiranja sa 4 µg/ml MC (B); netretirana kontrola (A)

Fig. 1. Induction of phage in *S. lactis* subsp. *diacetylactis* Bu 1-K after irradiation 30'' (C), 60'' (D), treatment with 4 µg/ml MC (B); untreated control (A)

značaj i da oni istovremeno ne doprinose pojavi virulentnih faga u fermentacionim procesima. Podršku navedenom gledištu daje u svom radu Jarwis (1984). Istražujući homologiju DNA umerenih faga tri soja vrste *S. cremoris* i 25 lističnih faga koji su dominantni u siranama Novog Zelanda, on ne nalazi nikakve značajne genetske podudarnosti. S druge strane, ako bi se i prihvatio



Graf. 2. Indukcija faga u *S. lactis* subsp. *diacetylactis* Bu 2-K posle UV zračenja 30" (C), tretiranja sa 4 $\mu\text{g/ml}$ MC (B); netretirana kontrola (A)

Fig. 2. Induction of phage in *S. lactis* subsp. *diacetylactis* Bu 2-k after irradiation 30" (C), treatment with 4 $\mu\text{g/ml}$ MC (B); untreated control (A)

stav da uslovi za indukciju faga u normalnoj proizvodnji ne mogu da se porede s dejstvom indukcionih agensa u eksperimentu, ostaje činjenica da se izvestan broj sojeva spontano indukuje. Reyrolle et al. (1982) iznose da je 25% od 113 istraženih sojeva osetljivo na umerene fage streptokoka koji su indukovani

spontano ili sa MC. Spektar lize ovih faga bio je sličan onome koji je ranije nađen kod virulentnih faga (Chopin et al., 1976). Ova korelacija između litičnih spektara navedene dve vrste faga, velike morfološke sličnosti između ovih tipova (Huggins and Sandine, 1977) zajedno sa značajnim procentom sojeva indikatora navela su Reyrolle-a i saradnike da zaključe da umereni fazi mogu biti istovremeno i izvor litičnih faga. Autori smatraju da do prelaska iz jednog stanja u drugo dolazi usled mutacije faga.

Istraživanja u ovom radu pokazala su da se i u našim uslovima mogu primeniti metode za indukciju faga u mezofilnim streptokokama, što pruža mogućnost da se testiraju svi sojevi koji ulaze u sastav čistih kultura koje se koriste u našoj mlekarскоj industriji.

Međutim, ako se ima u vidu da još uvek nedostaju temeljna objašnjenja vezana za prelaz faga iz umerenog u litičan ciklus, može se pretpostaviti da će dinamičan razvoj oblasti, kao što je genetika bakterija mlečne kiseline, još bolje razjasniti ovaj fenomen i dati odgovore na niz pitanja koja proističu iz odnosa bakteriofaga i sojeva koji su prema njima osetljivi.

Zaključak

Više od 50% istraženih sojeva u ovom radu bilo je lizogeno. Prema tome, ako se uzme u obzir sve što je napred izneto može se konstatovati da sposobnost sojeva da indukuje fage, bilo spontano bilo pod uticajem indukcionih sredstava, predstavlja vrlo važan kriterijum kod izbora sojeva koji ulaze u sastav startera. Iz tog razloga dalja ispitivanja vezana za uslove koji omogućavaju ili sprečavaju indukciju u sojevima bakterija mlečne kiseline, imaju ne samo naučan već i praktičan značaj za pravilnu primenu startera u tehnološkom procesu proizvodnje fermentisanih mlečnih proizvoda.

Literatura

- CHOPIN, M. C., CHOPIN, A., and ROUX, C. (1976): *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 741—746.
- DAVIES, F., and GASSOM, M.: In »Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milks« (F. Davies and B. Law, eds.), Applied Science Publishers, London and New York (1984).
- HUGGINS, A. R. and SANDINE, W. E. (1977): *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 184—191.
- JARWIS, A. W. (1984): *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 1031—1038.
- KOZAK, W., RAJCHERT-TRZPIL, M., ZAJDEL, J., DOBRZANSKI, W. T. (1973): *Appl. Microbiol.* **25**, 305—307.
- LAWRENCE, R. C. (1978): *N.Z.J. Dairy Sci. Technol.* **13**, 129—136.
- LOWRIE, R. J. (1974): *Appl. Microbiol.* **27**, 210—217.
- MEISTER, K. A. and LEDFORD, R. A. (1979): *J. Food. Prot.* **42**, 396—400.
- MC KAY, L. L., and BALDWIN, K. A. (1973): *Appl. Microbiol.* **25**, 682—684.
- PARK, C., and MC KAY, L. L. (1975): *J. Milk Food Technol.* **38**, 594—597.
- REYROLLE, J., CHOPIN, M. C., LETELLIER, F., and NOVEL, G. (1982): *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 349—356.
- TERZAGHI, B. E., and SANDINE, W. E. (1975): *Appl. Microbiol.* **29**, 807—817.
- TERZAGHI, B. E., and SANDINE, W. E. (1981): *J. Gen. Microbiol.* **122**, 305—311.
- TEUBER, M., and LEMBKE, J. (1982): In »Microbiology 82« (D. Schlessinger eds.), ASM, 230—231.
- TEUBER, M., and LEMKE, J. (1983): *Antonie van Leeuwenhoek*, **49**, 283—295.