

ВИВЧЕННЯ МОРФОЛОГІЧНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ ЛАКТОФАГІВ МЕТОДОМ ТРАНСМІСІЙНОЇ ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ

*Проведено дослідження бактеріофагів молочнокислих бактерій з колекції ІПР методом трансмісійної електронної мікроскопії. Встановлено, що морфологічні характеристики досліджуваних вірусів є типовими для представників родини Siphoviridae. Знайдено дві основні морфоформи, що відрізняються формою капсида та довжиною хвостових відростків. У колекції переважали фаги з ізометричними головками морфотипу В1. Фаги з пролатними головками морфотипу В2 складали лише 13% від загалу. Фаги морфотипу В1 утворювали 2 підгрупи залежно від розмірів хвостового відростку. Серед них були також фаги, видоспецифічні до *S. thermophilus* – вони мали ізометричні головки та найдовші хвостові відростки.*

Встановлено відсутність кореляції між характеристиками фагів, а саме: морфологією віріонів, морфологією негативних колоній та видоспецифічністю.

Ключові слова: бактеріофаги молочнокислих бактерій, капсид, морфотип, трансмісійна електронна мікроскопія, хвостовий відросток.

*Проведено исследование бактериофагов молочнокислых бактерий из коллекции ИПР методом трансмиссионной электронной микроскопии. Установлено, что морфологические характеристики исследуемых вирусов являются типичными для представителей семейства Siphoviridae. Найдены две основные морфоформы, отличающиеся формой капсида и длиной хвостовых отростков. В коллекции преобладали фаги с изометрическими головками морфотипа В1. Фаги с пролатными головками морфотипа В2 составляли лишь 13 % от общего количества. Фаги морфотипа В1 образовывали 2 подгруппы в зависимости от размеров хвостового отростка. Среди них были также фаги, видоспецифические к *S. thermophilus* - они имели изометрические головки и длинные хвостовые отростки. Установлено отсутствие корреляции между характеристиками фагов, а именно: морфологией вирионов, морфологией негативных колоний и видоспецифичностью.*

Ключевые слова: бактериофаги молочнокислых бактерий, капсид, морфотип, трансмиссионная электронная микроскопия, хвостовой отросток.

*A study of lactic acid bacteria phages from the collection of Institute of Product Resources by transmission electronic microscopy was conducted. It was defined that the morphological characteristics of the studied viruses are typical for the representatives of Siphoviridae kind. Two main morphoforms, characterized by capsid shape and tail length were found. Phages with isometric heads of B1 morphotype dominated in the collection. Phages with heads of B2 morphotype made only 13 % of the total amount. Phages of B1 morphotype formed two subgroups by the tail size. The phages were among them, being species-specific to *S. thermophilus* - they had isometric heads and long tails.*

The absence of correlation between the characteristics of phages was established, namely virion morphology, negative colonies morphology and species-specificity.

Key words: capsid, lactic acid bacteria bacteriophages, morphotype, tail, transmission electronic microscopy .

*Згідно з класифікацією Міжнародного Комітету Таксономії Вірусів, бактеріофаги, які вражають *Lactococcus lactis*, належать до порядку Caudovirales. Даний*

порядок включає три родини: *Myoviridae* з довгими хвостами, що скорочуються, *Siphoviridae* з довгими хвостами, що не скорочуються та *Podoviridae* з короткими хвостами [1].

На основі морфології та гомології ДНК послідовностей, фаги лактококів було поділено на 12 видів, три з яких, а саме 936, с2 та P335, є найпоширенішими, і до них належить 98 % від всіх відомих на сьогодні лактофагів. Решта бактеріофагів, зокрема KSY1, P087, Q54, 1358, 1706 є представниками рідкісних видів фагів. Вважається, що такі віруси бактерій виникли внаслідок численних рекомбінацій між лактофагами та вірусами, які вражають інші бактерії [2].

Бактеріофаги, які належать до родини *Siphoviridae*, окрім видів, поділяють на три морфотипи, однак лише два з них вражають молочнокислі бактерії роду *Lactococcus*. До морфотипу B1 належать фаги з маленьким ізометричним капсидом та довгим хвостовим відростком, що не скорочується. До морфотипу B2 належать фаги з видовженим капсидом та довгим хвостом, що не скорочується. Більшість фагів з ізометричним капсидом належать до 936 та P335 видів, тоді як з видовженим - зустрічаються переважно фаги с2 виду. P335 вид бактеріофагів містить як вірулентні, так і помірні фаги, тоді як віруси с2 та 936 видів є виключно вірулентними [3].

Для вищезгаданих видів лактофагів описані ареали їх поширення. Зокрема, бактеріофаги, які є представниками 936 виду, зустрічаються здебільшого у Франції, Німеччині, Канаді та Новій Зеландії, тоді як представники с2 виду поширеніші на території Росії. Впродовж останніх двадцяти років американські дослідники все частіше визнають причиною фаголізису на молочних підприємствах саме бактеріофаги, що належать до виду P335 [4].

Бактеріофаги *S. thermophilus* належать до морфологічної групи B1, родини *Siphoviridae*. Даний вид фагів має головки за формою дуже схожі на ізометричні (у середньому від 42 до 63 нм в діаметрі), хвости 200-300 нм у довжину, що не мають комірця [5].

Отже, особливості морфології вірусних часток є одним із критеріїв диференціювання та ідентифікації фагів молочнокислих бактерій. Під час таких досліджень ураховують параметри головки та хвостового відростку, наявність і тип шипів, форму капсида. Застосування, як критерію диференціювання фагів особливостей морфології їхніх віріонів, незважаючи на достатню трудомісткість і витратність, дає можливість розмежувати вибірку фагів на чітко відокремлені групи, що має допомогти виявити їх типових представників.

Метою роботи було дослідження морфологічної будови бактеріофагів лактобактерій з колекції відділу біотехнології ІПР.

Матеріали та методи. Об'єктами досліджень були бактеріофаги молочнокислих бактерій, виділені на молочних заводах України. Проводили очищення фаголізатів від залишків бактеріальних клітин шляхом центрифугування при 11000 об./хв. впродовж 10 хв. Для адсорбції фагових часток до поверхні формвару мідну сіточку із формаровою плівкою-підложкою поміщали на краплину фагового препарату і витримували впродовж 1 години при кімнатній температурі. Неадгезовані фаги відмивали у деіонізованій H_2O впродовж 10 хв. і одразу ж проводили контрастування препаратів 2 % розчином ураніацетату впродовж 40 с при кімнатній температурі. Фіксацію зразків проводили за допомогою етанолу. Мікрофотографії фагових часток отримували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопу JEM-1400 (Jeol, Японія) при напрузі 80 кВ і інструментальному збільшенні $\times 20-100$ тис. в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАНУ. При мікроскопіюванні оцінювали загальний вигляд бактеріофагів. Максимальний діаметр капсида визначали за відстанню між протилежними вершинами його гексагональної проекції. Повну

довжину хвостового відростка вимірювали від порталльної вершини до кінця базальної пластинки включно. Статистична обробка даних проведена за допомогою програми Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., 2001; www.statsoft.com).

Результати дослідження. Встановлено, що склад фагів, які циркулюють на підприємствах молочної галузі України, мав свої особливості. У колекції превалювали фаги двох основних морфотипів: перший тип морфотип В1 – фаги з ікосаедричним капсидом і хвостовим відростком довжиною $(160,15 \pm 32,28)$ нм, другий тип морфотип В2 – фаги з видовженим капсидом і хвостовим відростком із середньою довжиною $(79,01 \pm 14,88)$ нм. Середня величина діаметру капсида в усіх фагів знаходилась у межах 40-47 нм.

Встановлено, що фаг Ф1 мав видовжений капсид довжиною до 49 нм у діаметрі. Хвостовий відросток, довжина якого не перевищувала 110 нм, закінчувався базальною пластинкою. У деяких полях зору в місці приєднання капсида до хвостового відростку, спостерігали наявність комірця (рис. 1 А). Морфологічно подібним до даного вірусу виявився бактеріофаг Ф5, який мав видовжений капсид подібного діаметру та в середньому лише на 5-7 нм довший хвостовий відросток (рис. 1 Б).

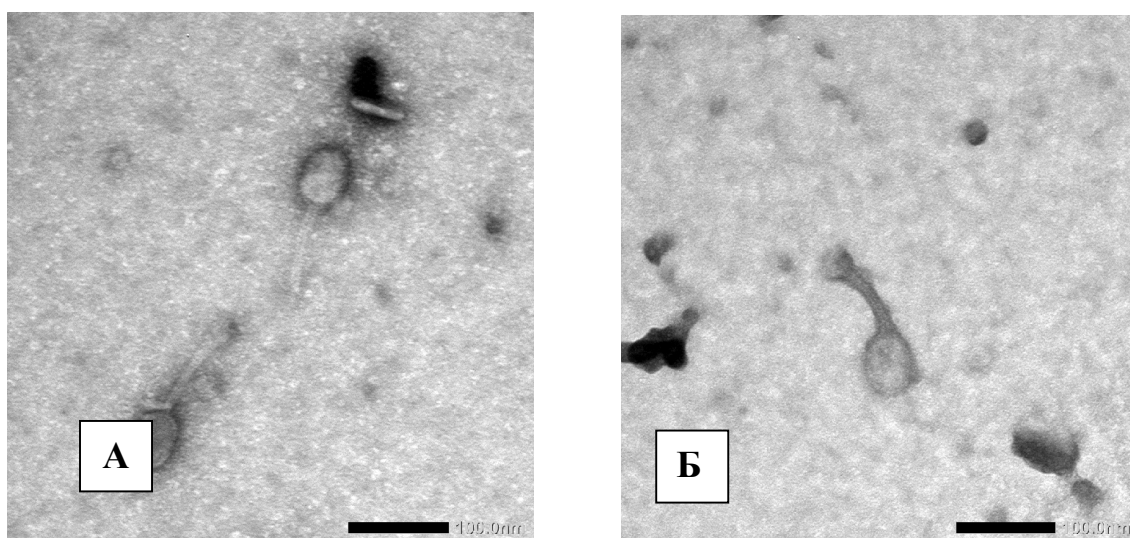


Рис. 1. Бактеріофаги морфотипу В2:
А – фаг Ф1; Б – фаг Ф5

Подібно до Ф1, фаг Ф5 мав невелику базальну пластинку на кінці хвостового відростку. Однак на відміну від Ф1, у даного вірусу не було помічено структур, подібних на комірці у жодному з полів зору.

Морфологія фагів Ф2 (рис. 2А) та Ф6 (рис. 3Б) виявилася дуже подібною, однак перший з них мав у середньому на 15-20 нм довший хвостовий відросток. Обидва віруси були представниками морфотипу В1, мали ікосаедричний капсид, діаметр якого не перевищував 48 нм. Для даних фагів не було зафіксовано наявність базальної пластинки або комірця.

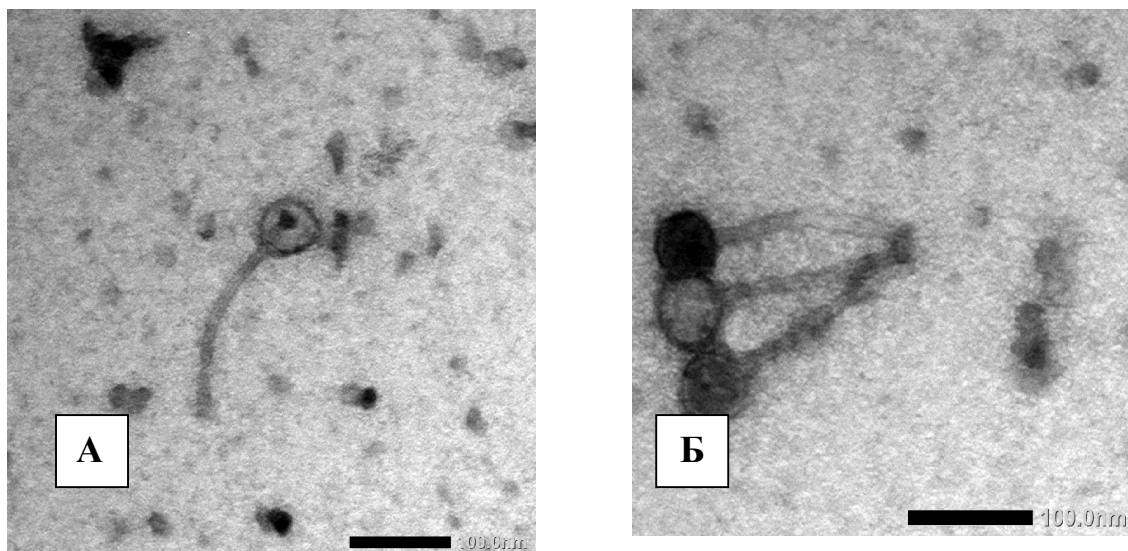


Рис. 2. Бактеріофаги морфотипу В1:

А – фаг Φ2; Б – фаг Φ3

Бактеріофаг Φ3, який теж виявився представником морфотипу В1, мав капсид 36-47 нм у діаметрі та хвостовий відросток до 112 нм у довжину та 10-15 нм в ширину. У даного вірусу не було знайдено жодних структур подібних на комірці, однак хвостовий відросток закінчувався невеликою базальною пластинкою (див. рис. 2 Б).

Бактеріофаг Φ4 характеризувався досить довгим хвостовим відростком, довжина якого сягала 169 нм, при цьому діаметр ікосаедричного капсиду подібно до інших досліджуваних вірусів не перевищував 51 нм. Для даного вірусу не було зафіксовано структур подібних на комірці або базальну пластинку (рис. 3 А).

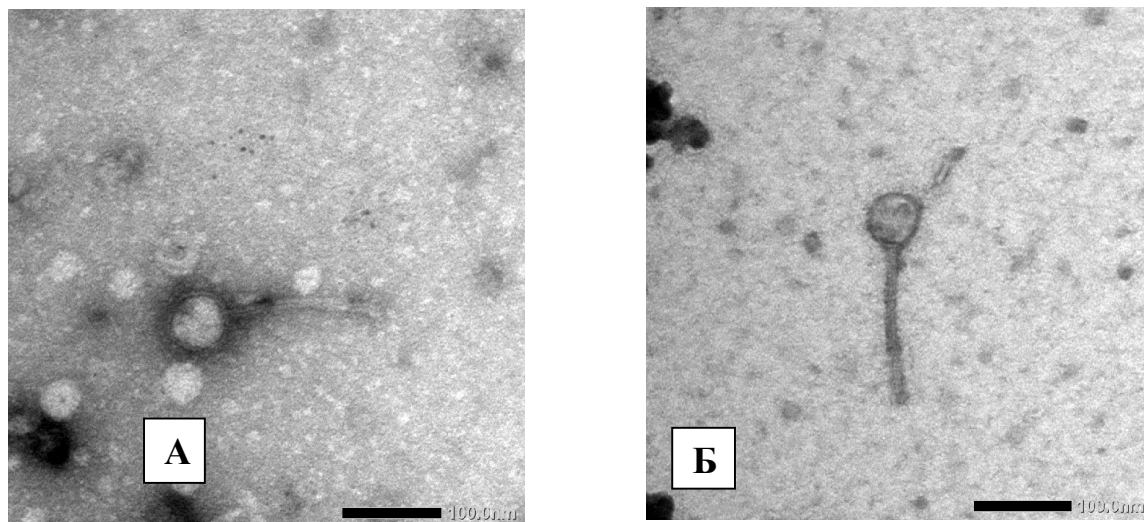


Рис. 3. Бактеріофаги морфотипу В1:

А – фаг Φ4; Б – фаг Φ6

У таблиці 1 представлено морфометричні характеристики досліджуваних бактеріофагів.

Морфометричні характеристики бактеріофагів

Фаг	Капсид		Хвіст			
	Форма	Розмір (нм)	Довжина (нм)	Ширина (нм)	Наявність комірця	Наявність баз.пласт.
Ф1	видовжена	49-37	58-110	10-15	-	+
Ф2	ікосаедрична	48-38	151-186	10-12	—	—
Ф3	ікосаедрична	47-36	79-112	10-12	—	+
Ф4	ікосаедрична	36-51	127-169	10-15	—	—
Ф5	видовжена	37-50	68-128	10-12	—	+
Ф6	ікосаедрична	36-41	67-124	10-12	—	—
Ф7	ікосаедрична	50-31	60-117	10-12	—	—
Ф8	ікосаедрична	39-47	73-104	10-12	+	—
Ф9	ікосаедрична	32-43	87-117	10-12	—	+
Ф10	ікосаедрична	37-44	78-141	10-12	—	—
Ф11	ізометрична	57-59	234-244	10-12	—	—
Ф12	ізометрична	65-68	230-260	10-12	—	—
Ф13	ізометрична	48-51	207-258	10-12	—	—
Ф14	ізометрична	55-58	204-217	10-12	—	—
Ф14	ізометрична	53-59	215-243	10-12	—	—
Ф15	ізометрична	49-51	232-266	10-12	—	—

Дані досліджень віріонів порівнювали з морфологічними ознаками фагів молочнокислих бактерій, що опубліковані в літературі [1, 2] для визначення їхньої видової приналежності.

Згідно з літературними даними [6, 7], фаголізис на виробництві в більшості випадків викликають фаги з ізометричною головкою, що належать до виду 936 - вони нараховують зазвичай до половини всіх ізолятів; чверть належать до с2 виду з подовженою головкою і чверть - до гетерогенного виду P335, представники якого характеризуються маленькою ізометричною головкою і можуть бути як вірулентними, так і помірними; фаги сімейства *Podoviridae* обумовлюють фаголізис рідко.

Для цього дослідження у даній вибірці фагів переважали фаги морфотипу В1. Фаги з пролатними головками морфотипу В2 складали лише 13% від загалу. Фаги морфотипу В1 утворюювали 2 підгрупи залежно від розмірів хвостового відростку. Серед них були також фаги, видоспецифічні до *S. thermophilus* – вони мали ізометричні головки та найдовші хвостові відростки.

Висновки

Встановлено, що бактеріофаги з колекції ІПР відрізнялись за формою капсида та довжиною хвостових відростків. Виявлено фаги з ізометричними головками морфотипу В1 і фаги з пролатними головками морфотипу В2. Таким чином морфологічні характеристики досліджуваних вірусів є типовими для представників родини *Siphoviridae*, до якої належить більшість відомих на сьогодні бактеріофагів молочнокислих бактерій.

Перспективи подальших досліджень

Слід зазначити відсутність кореляції між морфологією віріонів та іншими дослідженими ознаками фагів, наприклад: морфологією негативних колоній та видоспецифічністю. Так, фаги Ф2 та Ф 4 мали різний видовий спектр бактерій - хазяїв, різну морфологію негативних колоній, проте належали до одного морфотипу В1. Ця обставина зумовлює необхідність проведення подальших досліджень фагів, в тому числі на молекулярно - генетичному рівні.

Різне. Робота виконана згідно з Науково-технічною програмою НААН України на 2011-2015 рр. «Ефективні системи комплексної переробки тваринницької сировини і виробництва м'ясних і молочних продуктів гарантованої якості» в рамках виконання завдання з теми: «Дослідити особливості біологічного відгуку клітин молочнокислих бактерій на вплив інгібіторних агентів вірусного та хімічного походження, здійснити пошук ефективних моніторингових систем з детекції та ідентифікації інгібіторів росту лактобактерій», шифр 36.00.03.01.Ф, Державний реєстраційний номер 0111U001292.

Висловлюю глибоку вдячність д.б.н. Ф.І. Товкачу та к.б.н. А.М. Остапчуку за цінні поради та сприяння у проведенні досліджень.

Література

1. Ackermann H.-W. Bacteriophage taxonomy / H.-W. Ackermann // Microbiology Australia. – 2011. – P. 90-94.
2. Deveau H. Biodiversity and classification of Lactococcal phages / H. Deveau, S. Labrie, M.-C. Chopin, S.Moineau // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72.- № 6. – P. 4338-4346.
3. Ly-Chatain M. H. Direct quantitative detection and identification of Lactococcal bacteriophages from milk and whey by real-time PCR: application for the detection of Lactococcal bacteriophages in goat's raw milk whey in France / M. H. Ly-Chatain, L. Durand, V. Rigobello, A. Vera, Y. Demarigny // International Journal of Microbiology. – 2011. - P. 1-9.
4. Labrie S. Morphology, genome sequence, and structural proteome of type phage P335 from *Lactococcus lactis* / S. J. Labrie, J. Josephsen, H. Neve, F. K. Vogensen, S. Moineau // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 74. - № 15. – P. 4636-4644.
5. Brüssow H. Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation / H. Brüssow, M. Fremont, A. Bruttin, J. Sidoti, A. Constable // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 60. - № 12. – P. 4537-4543.
6. Szczepańska A. K. Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in Polish dairy environment / A. K. Szczepańska, M. S. Hejnowicz, P. Kołakowski, J. Bardowski // Acta Biochimica Polonica. – 2007. – Vol. 54. - № 1. – P.151–158.
7. Marco M. B., Moineau S., Quiberoni A. Bacteriophages and dairy fermentations / M. B. Marco, S. Moineau, A. Quiberoni // Bacteriophage. – 2012. – Vol. 2. - № 3. – P. 149-158.