

## VPLIV PRISOTNOSTI ZUNAJCELIČNIH POLISAHARIDOV NA OBČUTLJIVOST CELIC *Lactococcus lactis* ZA BAKTERIOFAGNO OKUŽBO \*

Andreja MIKLIČ<sup>a)</sup> in Irena ROGELJ<sup>b)</sup>

<sup>a)</sup> Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, dr., mag.

<sup>b)</sup> Isti naslov kot <sup>a)</sup>, prof., dr., spec.

Delo je prispelo 15. maja 2003, sprejeto 30. junija 2003.

Received May 15, 2003, accepted June 30, 2003.

### IZVLEČEK

Nekatere mlečnokislinske bakterije tvorijo zunajcelične polisaharide (EPS) z različno sestavo in strukturo. EPS so pomembni v zaščiti mikrobnih celic pred izsušitvijo, fagocitozo, antibiotiki ali drugimi škodljivimi snovmi ter fagnim napadom. Proučevali smo vpliv prisotnosti zunajceličnih polisaharidov sedemnajstih sevov *Lactococcus lactis*, izoliranih iz treh slovenskih mlekar, na pripenjanje bakteriofagov. Da bi ugotovili ali imajo prisotni EPS vpliv na pripenjanje fagov, smo celice obdelali z različnimi kemičnimi sredstvi. Po obdelavi s 25 mM NaOH je bila večina izolatov občutljivih za večje število fagov kot pred njo. Ugotovili smo, da v EPS, ki jih proizvajajo proučevani izolati, prevladujejo galaktoza, glukoza in ksiloza. Največjo koncentracijo sladkorjev smo ugotovili pri izolatu PT19 (130,6 µM galaktoze in 146,9 µM ksiloze), ki je bil občutljiv le za fag ΦPT19. Domnevo, da izolati MB18, KR7, PT4, PT13 in PT19 tvorijo EPS, ki prekrijejo receptorje za fagno pripenjanje, bomo skušali potrditi v nadaljnjih raziskavah.

Ključne besede: mikrobiologija / mlečnokislinske bakterije / starterske kulture / *Lactococcus lactis* / bakteriofagi / zunajcelični polisaharidi / adsorpција / preprečitev adsorpције

## EFFECT OF EXOPOLYSACCHARIDES PRESENCE ON SENSITIVITY OF *Lactococcus lactis* CELLS FOR BACTERIOPHAGE INFECTION †

### ABSTRACT

Several lactic acid bacteria produce exopolysacharides (EPS) with different composition and structure. EPS are believed to play a role in the protection of the microbial cell against desiccation, phagocytosis, antibiotics or toxic compounds and phage attack. The effect of EPS of seventeen strains of *Lactococcus lactis*, isolated from starter cultures in three Slovenian dairy plants, on bacteriophage adsorption was studied. In order to determine the possible influence of EPS presence on bacteriophage adsorption, we treated cells with different chemical agents. After washing the cells with 25 mM NaOH, most of isolates were susceptible for more bacteriophages as before. EPS of studied isolates consisted mainly from galactose, glucose and xylose. The highest concentration of polysaccharides was detected in PT19 isolate (galactose 130.6 µM and

\* Prispevek je del doktorske disertacije Andreje Miklič z naslovom 'Obramba izolatov *Lactococcus lactis* iz mlekarskih obratov proti fagni okužbi', mentorica prof., dr. Irena Rogelj.

† The article is a part of doctoral dissertation 'Defence of *Lactococcus lactis* isolates from dairy plants against phage infection', issued by Andreja Miklič, supervisor prof. Irena Rogelj, Ph.D.

xylose 146.9 µM), which was susceptible only to ΦPT19 phage. In the future we will try to confirm the presumption that isolates MB18, KR7, PT4, PT13 and PT19 produce EPS which mask receptors for phage adsorption.

Key words: microbiology / lactic acid bacteria / starters / *Lactococcus lactis* / bacteriophages / exopolysaccharides / adsorption inhibition

## UVOD

Mezofilne starterske kulture za proizvodnjo skute in sirov običajno sestavlja dve podvrsti mlečnokislinskih bakterij (MKB) rodu *Lactococcus*, in sicer *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* in *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. Mnogi dejavniki, kot so sestava mleka, kontaminacijski mikroorganizmi in spremembe tehnoloških parametrov, lahko povzročijo napačen potek fermentacije. Prav gotovo pa je eden izmed poglavitnih dejavnikov okužba starterskih kultur z bakteriofagi. Ta predstavlja resne probleme v proizvodnji fermentiranih mlečnih izdelkov, saj lahko prisotni fagi upočasnijo tvorbo kisline ali pa popolnoma preprečijo fermentacijo mleka. Posledice takšnih napak so velike ekonomske izgube. V mlekarski industriji so fermentacijski procesi še vedno pogosto izpostavljeni fagnim okužbam, ker uporabljamo za izdelavo fermentiranih izdelkov pasterizirano mleko, v katerem so po toplotni obdelavi fagi še vedno lahko prisotni. Večkratna uporaba definiranih starterskih kultur pa fagom zagotovi celice gostiteljice za razmnoževanje. Prisotnost in vrsta fagov v industrijskem obratu sta odvisni od uporabljenih starterskih kultura, geografskega območja, načina prireje in predelave mleka, postopka čiščenja in razkuževanja in samega obrata. Na obseg okužbe pa imajo velik vpliv osnovne lastnosti fagov.

Mlečnokislinske bakterije, ki so dalj časa izpostavljene fagni okužbi, kar predstavlja intenziven selekcijski pritisk, razvijejo različne taktike (trike), s katerimi se branijo pred fagno okužbo. Laktokoki so tako razvili različne metode za preprečitev fagnega razvoja in sicer v različnih točkah razmnoževalnega ciklusa fagov, kot so: pripenjanje fagov, vbrizg fagne DNA, podvojevanje in prepisovanje fagne DNA, sinteza fagnih beljakovin, sestavljanje fagov in liza bakterijske celice z osvoboditvijo novonastalega fagnega potomstva. Splošno lahko različne načine, ki jih celice uporabljajo za preprečitev fagne okužbe, razdelimo v štiri večje skupine naravne obrambe proti fagom: oviranje pripenjanja, preprečitev vbrizga fagne DNA, restriktijski in modifikacijski sistemi ter mehanizme neuspele (abortivne) okužbe (Forde in Fitzgerald, 1999a).

Prva obramba celice pred fagno okužbo je torej oviranje pripenjanja faga na zunanjost celice. Do tega oviranja lahko pride zaradi odsotnosti receptorskih mest, zaradi napak/sprememb v celičnih receptorjih ali pa zaradi prisotnosti drugih komponent, ki fizično prekrijejo receptorje.

Pri večini fagnih receptorjev so pomembni ogljikovi hidrati (sladkorji) v celični steni. Tako so Valeyasevi in sodelavci (1990) ugotovili, da se zaradi izgube galaktoze iz celične stene *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* KH na celico ni moglo vezati pet testiranih fagov, ramnoza pa je bila esencialna za adsorpcijo dveh od petih fagov. Podobno sta bili za pripenjanje fagov na *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Wg2-1 in *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* F7/2 potreben galaktoza in/ali ramnoza (Forde in Fitzgerald, 1999a).

Dinsmore in Klaenhammer (1995) sta opisala nekovalentno, rahlo povezano snov (loosely associated material – LAM), ki so jo izolirali iz celične površine seva *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* E8 in fagno odpornega derivata 398. LAM iz seva E8 je omogočila vezavo treh fagov, medtem ko LAM iz seva 398 ne. Torej je imela LAM neposreden vpliv na fagno pripenjanje, sprememba v sestavi ali strukturi LAM pa je bila vzrok za fagno odpornost, ugotovljeno pri sevu 398. Kemijkska analiza je pokazala, da je LAM iz derivata 398 vsebovala petkrat več ramnoze in dvakrat več galaktoze kot LAM iz seva E8.

Velika skupina raziskav temelji na proučevanju mehanizmov preprečevanja pripenjanja, ki so plazmidno kodirani. Vlogo plazmidne DNA pri preprečitvi fagnega pripenjanja so dokazali pri veliko sevih. Plazmidi nosijo zapise bodisi za sintezo površinskih celičnih antigenov ali pa za produkcijo zunajceličnih ogljikovih hidratov, ki prekrijejo (maskirajo) receptorje in celico tako zaščitijo pred fagnim napadom. Opisanih je najmanj osem različnih plazmidno kodiranih mehanizmov pri laktokokih, trije do sedaj poznani pa preprečijo fagno pripenjanje z maskiranjem receptorskih mest. V primeru plazmida pSK112 (de Vos, 1989) iz *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* SK110 pripenjanje prepreči lipotejhonska kislina z vezano galaktozo, v primeru plazmidov pCI528 (Coffey in sod., 1989; Lucey in sod., 1992) in pCI658 (Forde in Fitzgerald, 1999b) iz *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* UC503 oz. *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HO2 pa pripenjanje prepreči hidrofilni polimer v celični steni, ki vsebuje ramnozo in galaktozo oz. galaktozo in glukoronsko kislino.

Kljub številnim raziskavam so mehanizmi preprečitve fagnega pripenjanja na molekularni ravni še vedno slabo raziskani. Ostaja nejasno ali je plazmidno posredovano blokiranje pripenjanja pravi obrambni mehanizem ali pa sekundaren učinek drugih celičnih funkcij. Poleg tega lahko nastanejo zaradi nestabilnosti teh plazmidov mešane kulture, sestavljene iz fagno občutljivih in neobčutljivih sevov. Fagno odporne celice so zaščitene pred napadom fagov, vendar fag ni odstranjen ali uničen in ostane neprizadet v okolju ter lahko napade občutljive celice. Prisotnost bakteriofagov v odpornih kulturah lahko povzroči psevdolizogenost ali stanje prenosa fagov (bakterije in litični fagi se lahko istočasno nahajajo v kulturi). Takšno stanje lahko zmanjša učinkovitost tega obrambnega mehanizma (Forde in Fitzgerald, 1999a).

## MATERIAL IN METODE

### Bakterijski sevi

V raziskavi smo uporabili sedemnajst sevov vrste *Lactococcus lactis* iz zbirke kultur Katedre za mlekarstvo (Miklič-Anderlič, 1998): MB18, MB20, KR3, KR7, KR8, KR36, KR43, PT2, PT4, PT9, PT13, PT18, PT19, PT27, PT28, PT67 in PT70. Seve smo izolirali iz okisovalcev, ki jih mlekarne pripravljam kot tehnično kulturo za izdelavo sira oziroma skute. Seve smo s pomočjo biokemijskih metod (Zacchello, 1991) in genetske metode, ki temelji na razlikovanju zaporedja 16S rRNA (Ward in sod., 1998), razvrstili v podvrsti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* in *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. Sevi KR3, KR7, KR8 pripadajo podvrsti *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, ostali sevi pa podvrsti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (Miklič-Anderlič in sod., 2000). Poleg naštetih lastnih izolatov smo v raziskavo vključili tudi *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CAA120 iz zbirke kultur Chr. Hansen's Laboratorium A/S, Danska.

### Bakteriofagi

Uporabili smo trinajst bakteriofagov iz zbirke kultur Katedre za mlekarstvo (Miklič-Anderlič, 1998): ΦMB18, ΦMB20, ΦKR3, ΦKR7, ΦKR8, ΦKR36, ΦKR43, ΦPT2, ΦPT4, ΦPT9, ΦPT19, ΦPT28 in ΦPT67. Bakteriofage smo izolirali iz sirotke po proizvodnji sira oz. skute. S pomočjo verižne reakcije s polimerazo (Labrie in Moineau 2000) smo bakteriofage razvrstili v fagni vrsti c2 (ΦMB18, ΦMB20, ΦKR36, ΦKR43 in ΦPT2) in 936 (ΦKR3, ΦKR7, ΦKR8, ΦPT4, ΦPT9, ΦPT19, ΦPT28 in ΦPT67). V raziskavo smo vključili tudi fag CHL92 iz zbirke kultur Chr. Hansen's Laboratorium A/S, Danska, ki pripada fagni vrsti c2 (Miklič in Rogelj, 2003).

## Gojenje bakterijskih izolatov in bakteriofagov

Bakterijski izolati in bakteriofagi so shranjeni v tekočem gojišču M17 (Merck, Nemčija) z dodatkom 20 % glicerola v zamrzovalniku pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Enaki vzorci so shranjeni tudi v tekočem dušiku pri  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Bakterijske seve smo gojili v tekočem gojišču M17 (Terzaghi in Sandine, 1975) pri  $30^{\circ}\text{C}$  18 ur.

Bakteriofage smo namnoževali v tekočem gojišču M17 s celico gostiteljico (6-urna kultura) ob dodatku 5,0 mM CaCl<sub>2</sub>. Infektivno sposobnost fagov smo preverjali z metodo s spoti (Svensson in Christiansson, 1991). Občutljivost bakterijskih izolatov proti fagom pa smo testirali z navzkrižno metodo s spoti (Moineau in sod., 1992).

## Kemijska obdelava celične površine

Prekonočne celične kulture (10 ml) smo centrifugirali 10 minut pri 3.500 g in celice sprali dvakrat s 5 ml fiziološke raztopine. Sediment celic smo resuspendirali v različnih raztopinah (Forde in Fitzgerald, 1999b): 1 % triton X-100 ( $45^{\circ}\text{C}$ ); 1 % SDS ( $45^{\circ}\text{C}$ ); 0,1 M HCl ( $21^{\circ}\text{C}$ ); 50 mM in 25 mM NaOH ( $21^{\circ}\text{C}$ ); 1,5 mg ml<sup>-1</sup> tripsin ( $37^{\circ}\text{C}$ ). Po 30-minutni obdelavi smo celice sprali v fiziološki raztopini in jih resuspendirali v tekočem gojišču M17.

Kemijsko tako obdelane bakterijske izolate smo testirali na občutljivost proti fagom z navzkrižno metodo s spoti.

## Ekstrakcija polisaharidov in tankoplastna kromatografija

Bakterijske izolate prekonočnih kultur smo sprali v sterilni vodi in celice resuspendirali v 5 ml 0,12 M HCl. Polisaharide iz celičnih sten smo ekstrahirali 30 minut pri  $100^{\circ}\text{C}$  ter centrifugirali 10 minut pri 3.500 g. Bakterijske izolate, ki smo jih predhodno obdelali s 25 mM NaOH 30 minut pri  $21^{\circ}\text{C}$ , smo pripravili po enakem postopku.

Tako pripravljene ekstrakte smo liofilizirali (liofilizator Heto CT 60c, Danska) in jih pred nanosom na kromatografsko ploščo raztopili v 0,5 ml 80 % metanola. Kot standard smo pripravili standardno mešanico rafinoze, galaktoze, glukoze, arabinoze, ksiloze in riboze v koncentraciji 0,01-odstotka.

Tankoplastno kromatografijo so opravili na Kemijskem inštitutu po naslednjem postopku: vzorce so z linomatom (CAMAG TLC, Švica) nanesli na plošče HPTLC Silicagel 60 F 254 (Merck, Nemčija), plošče posušili in potopili v mobilno fazo ABC [17 ml 3 mM 2-aminoethyl-difenil borata v acetonitrilu; 3 ml destilirane vode; 0,25 ml metanola]. Ko je mobilna faza prepotovala 8–9 cm, so plošče posušili in postopek ponovili še dvakrat. Po razvijanju so plošče potopili v raztopino DAP [2 % difenilamin; 2 % anilin; metanol:fosforna kislina-4:1] za 2 sekundi, nato pa jih položili za 10 minut na grelno mizico s temperaturo  $110\text{--}120^{\circ}\text{C}$ , da so se razvili madeži. Detekcijo madežev so izvedli s pomočjo denzitometra (CAMAG TLC Scanner 3, Švica).

## REZULTATI

### Občutljivost izolatov *Lactococcus lactis* za bakteriofage

Pri vseh izolatih smo preverili občutljivost za bakteriofage, izolirane iz slovenskih mlekarskih obratov, in za bakteriofag CHL92 iz zbirke kultur Chr. Hansen's Lab, ki je glavni dobavitelj starterskih kultur v Sloveniji. V preglednici 1 so prikazani rezultati tega testiranja.

Proučevani laktokoki so pokazali zelo različno občutljivost za fage. Tako so bili na primer izolati KR7, KR8 in PT19 občutljivi le za enega od štirinajstih testiranih fagov, izolat KR3 pa kar za sedem. Izolati MB20, KR36, KR43, PT2 in sev CAa120 so občutljivi za iste fage. Enak spekter fagne občutljivosti ima tudi izolat KR3, ki pa je občutljiv tudi za fag  $\Phi$ MB18. Izolati PT4, PT9, PR13 in PT18 so občutljivi za faga  $\Phi$ MB18 in  $\Phi$ PT4, izolat PT9 je občutljiv tudi za fag  $\Phi$ PT9, medtem ko je izolat PT18 občutljiv poleg faga  $\Phi$ PT9 še za fag  $\Phi$ MB20. Enak spekter občutljivosti smo ugotovili tudi pri izolatih PT27 in PT28.

Preglednica 1. Občutljivost 17 laktokoknih izolatov ter seva CA120 za bakteriofage, izolirane iz slovenskih mlekarških obratov

Table 1. Sensitivity of 17 lactococcal isolates and CAa120 strain for phages, isolated from Slovenian dairy plants

Bakterijski izolati Bacterial isolates	Bakteriofagi / Bacteriophages													
	$\Phi$ MB18	$\Phi$ MB20	$\Phi$ KR3	$\Phi$ KR7	$\Phi$ KR8	$\Phi$ KR36	$\Phi$ KR43	$\Phi$ PT2	$\Phi$ PT4	$\Phi$ PT9	$\Phi$ PT19	$\Phi$ PT28	$\Phi$ PT67	CHL92
MB18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MB20	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
KR3	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
KR7	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KR8	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KR36	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
KR43	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
PT2	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
PT4	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
PT9	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
PT13	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
PT18	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
PT19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
PT27	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
PT28	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
PT67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
PT70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
CAa120	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+

+ = občutljiv / sensitive; - = ni občutljiv / not-sensitive

### Občutljivost izolatov po kemijski obdelavi

Prvi zaščitni mehanizem obrambe bakterij proti fagom je preprečitev pripenjanja fagov na receptorje, razporejene po površini celične stene. Bakterije lahko tvorijo različne snovi, ki zakrijejo te receptorje. Z obdelavo celičnih kultur z različnimi kemikalijami lahko te komponente odstranimo.

Tako smo 18-urne kulture obdelali s tritonom X-100, SDS HCl, NaOH in tripsinom in ponovno preverili njihovo občutljivost za fage. Pri obdelavi celičnih kultur z 1-odstotnim tritonom X-100, 1-odstotnim SDS, 0,1-molarnim HCl in 50-mili molarnim NaOH so celice izgubile sposobnost za rast. V primeru, ko smo celične kulture obdelali s 25-mili molarnim

NaOH in tripsinom ( $1,5 \text{ mg ml}^{-1}$ ), pa so celice ohranile sposobnost za rast, vendar so spremenile svojo odpornost proti bakteriofagom iz zbirke. Podrobno občutljivost izolatov za fage smo ugotavljali po obdelavi s 2-mili molarnim NaOH (pregl. 2).

Če primerjamo rezultate, prikazane v preglednicah 1 in 2, vidimo, da so bakterijski izolati po obdelavi s 25-mili molarnim NaOH veliko bolj občutljivi za okužbo s fagi kot pred obdelavo. Večina izolatov (razen izolata PT67 in PT70) je izgubila sposobnost obrambe proti vsem fagom z elipsoidno glavo ( $\Phi\text{MB18}$ ,  $\Phi\text{MB20}$ ,  $\Phi\text{KR36}$ ,  $\Phi\text{KR43}$ ,  $\Phi\text{PT2}$  in  $\text{CHL92}$ ) ter proti dvema fagoma z izometrično obliko glave ( $\Phi\text{KR3}$  in  $\Phi\text{PT19}$ ). Noben izolat pa ni izgubil odpornosti proti fagom  $\Phi\text{KR7}$  in  $\Phi\text{KR8}$ . Bakterijska izolata PT67 in PT70 sta po obdelavi z NaOH občutljiva le za štiri oz. pet fagov iz zbirke. Kot lahko vidimo, so največjo škodo utrpeli izolati MB18, KR7, PT4, PT13 in PT19, ki so postali občutljivi za dodatnih sedem oz. devet fagov.

Ko smo kemijsko obdelane izolate nacepili v tekoče gojišče M17 in jih inkubirali 18 ur pri  $30^\circ\text{C}$ , so ponovno postali odporni proti istim bakteriofagom kot pred obdelavo.

Preglednica 2. Občutljivost 17 laktokoknih izolatov ter seva CA120 za bakteriofage, izolirane iz slovenskih mlekarских obratov, po obdelavi s 25-mili molarnim NaOH

Table 2. Sensitivity of 17 lactococcal isolates and CAa120 strain for phages, isolated from Slovenian dairy plants, after treatment with 25 mM NaOH

Bakterijski izolati Bacterial isolates	Bakteriofagi / Bacteriophages													
	$\Phi\text{MB18}$	$\Phi\text{MB20}$	$\Phi\text{KR3}$	$\Phi\text{KR7}$	$\Phi\text{KR8}$	$\Phi\text{KR36}$	$\Phi\text{KR43}$	$\Phi\text{PT2}$	$\Phi\text{PT4}$	$\Phi\text{PT9}$	$\Phi\text{PT19}$	$\Phi\text{PT28}$	$\Phi\text{PT67}$	$\text{CHL92}$
MB18	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
MB20	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
KR3	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
KR7	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
KR8	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
KR36	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
KR43	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
PT2	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
PT4	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
PT9	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
PT13	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
PT18	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
PT19	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
PT27	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
PT28	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
PT67	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
PT70	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
CAa120	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+

+ = občutljiv / sensitive; - = ni občutljiv / not-sensitive

## Vsebnost sladkorjev, ugotovljenih s tankoplastno kromatografijo

Z blago alkalno raztopino speremo s površine celic ogljikove hidrate, ki so v večini primerov odgovorni bodisi za uspešno pripenjanje fagov ali pa za maskiranje receptorjev, potrebnih za pripenjanje fagov. Glede na rezultate, prikazane v preglednici 2, smo sklepali, da so pri bakterijskih izolatih receptorji za fage prekriti. Ker sta nas zanimali količina in sestava ogljikovih hidratov na celični površini, smo ekstrahirali sladkorje s celičnih površin izolatov pred obdelavo z blago raztopino NaOH in po njej ter s tankoplastno kromatografijo ugotovili prisotnost različnih sladkorjev (pregl. 3). Kot standard smo uporabili mešanico galaktoze, glukoze, arabinoze, ksiloze in riboze.

Ugotovili smo, da so ekstrahirani ogljikovi hidrati s celične površine bakterij sestavljeni iz galaktoze, glukoze in ksiloze (pregl. 3). Pri izolatu KR7 smo poleg omenjenih monosaharidov ugotovili tudi prisotnost arabinoze. Pri izolatih MB18, PT4, PT13 in PT27 pa smo ugotovili, da so na celični površini ogljikovi hidrati, sestavljeni samo iz glukoze in ksiloze, pri izolatu KR8 pa iz galaktoze in ksiloze.

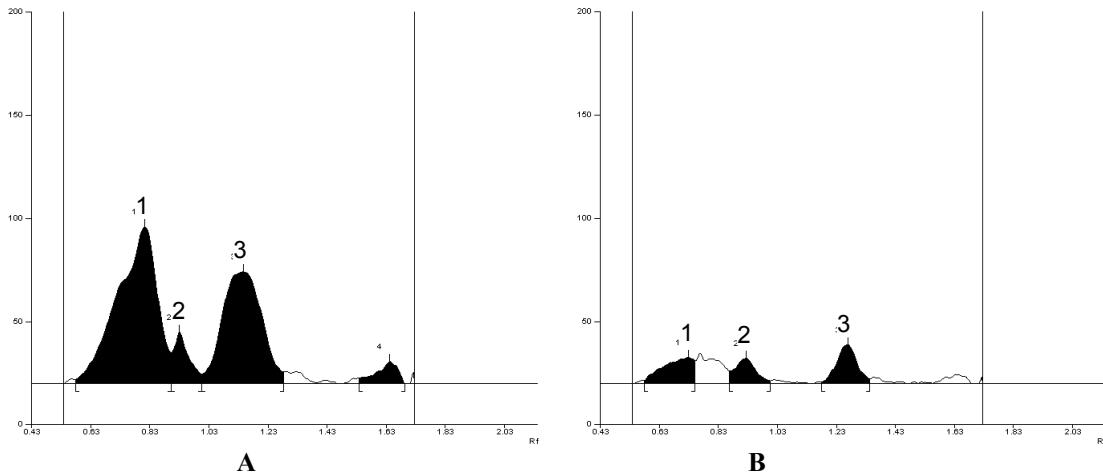
Vsebnost sladkorjev, ki sestavljajo zunajcelične polisaharide, se je po obdelavi z blago raztopino NaOH zmanjšala pri večini izolatov (pregl. 3). Največjo spremembo vsebnosti sladkorjev smo opazili pri izolatu PT19 (slika 1), kjer se je vsebnost galaktoze zmanjšala za 95 %, vsebnost ksiloze pa za 82 %. Ta izolat je utrpel tudi največjo škodo, saj je izgubil odpornost proti dodatnim devetim fagom.

Preglednica 3. Vsebnost sladkorjev na površini celic *Lactococcus lactis* pred obdelavo z NaOH in po njej

Table 3. Content of sugars on the surface of *Lactococcus lactis* isolates before and after treatment with NaOH

Bakterijski izolati Bacterial isolates	Sladkorji / Sugars (µM)							
	galaktoza / galactose		glukoza / glucose		ksiloza / xylose		arabinoza / arabinose	
	pred before	po after	pred before	po after	pred before	po after	pred before	po after
MB18	<5,0	<5,0	42,2	28,1	33,4	13,5	<5,0	<5,0
MB20	16,0	8,3	9,4	<5,0	25,4	10,0	<5,0	<5,0
KR3	8,1	<5,0	5,6	<5,0	7,1	<5,0	<5,0	<5,0
KR7	<5,0	<5,0	25,4	23,6	21,5	12,1	6,4	<5,0
KR8	76,6	53,2	<5,0	<5,0	34,2	32,3	<5,0	<5,0
KR36	25,7	14,0	17,5	6,4	27,5	18,3	<5,0	<5,0
KR43	11,7	8,2	9,5	5,7	13,7	8,0	<5,0	<5,0
PT2	11,7	10,9	11,0	8,2	12,8	12,7	<5,0	<5,0
PT4	<5,0	<5,0	67,2	28,6	45,5	27,0	<5,0	<5,0
PT9	24,8	22,3	76,4	42,4	51,9	27,0	<5,0	<5,0
PT13	<5,0	<5,0	56,1	38,8	28,0	28,0	<5,0	<5,0
PT18	7,2	<5,0	33,1	12,4	23,0	15,4	<5,0	<5,0
PT19	130,6	6,4	18,0	12,0	149,9	27,0	<5,0	<5,0
PT27	<5,0	<5,0	26,4	25,9	29,6	25,7	<5,0	<5,0
PT28	<5,0	<5,0	44,9	9,2	13,9	7,9	<5,0	<5,0
PT67	<5,0	<5,0	31,0	14,2	11,0	10,7	<5,0	<5,0
PT70	<5,0	NP	13,5	NP	12,5	NP	<5,0	NP
CAa120	15,1	NP	11,9	NP	14,2	NP	<5,0	NP

NP = ni podatka / no data



Slika 1. Denzitogram sladkorjev, ekstrahiranih s površine celic PT19 pred obdelavo z NaOH (A) in po njej (B). Vrh 1: galaktoza, vrh 2: glukoza, vrh 3: ksiloza.

Figure 1. Densitogram of sugars extracted from surface of PT19 isolate before (A) and after (B) treatment with NaOH. Peak 1: galactose, peak 2: glucose, peak 3: xylose.

## RAZPRAVA

Mikroorganizmi vrste *Lactococcus lactis* so mezofilne po Gramu pozitivne mlečnokislinske bakterije (MKB), ki jih uporabljamo v mlekarski industriji kot starterske kulture v proizvodnji številnih fermentiranih mlečnih izdelkov, kot so kislo mleko in kisla smetana, maslo ter različne vrste sira.

Eden od prevladujočih vzrokov za počasno fermentacijo ali celo njeno popolno prekinitev je okužba starterskih kultur z bakteriofagi, ki so navzoči povsod v fermentacijskem okolju. Rezultat takšne okužbe je napačen potek osnovnega bioprosesa v proizvodnji fermentiranega mlečnega izdelka, ki povzroči v nadaljevanju vrsto napačnih procesov in v končni fazi izdelek slabe kakovosti ali celo kakovostno nesprejemljiv izdelek.

Da lahko fag okuži celico gostiteljico, se mora najprej uspešno pripeti na receptorje, ki so razporejeni po celični površini. Prva obramba celice proti fagni okužbi je preprečitev pripenjanja. Do oviranja oziroma preprečitve pripenjanja faga lahko pride zaradi pomanjkanja primernih fagnih receptorjev na celični površini ali pa zato, ker so receptorji prekriti z različnimi snovmi. Snovi, ki maskirajo receptorje za adsorpcijo fagov, so običajno hidrofilni zunajcelični polisaharidi (EPS), sestavljeni iz galaktoze, glukoze in ramnoze. MKB so poznane po sposobnosti tvorbe EPS, ki so bodisi rahlo vezani na celično steno bodisi jih celica izloča v okolje kot sluz. EPS verjetno igrajo vlogo v zaščiti mikrobnih celic pred izsušitvijo, fagocitozo in fagnim napadom, proti antibiotikom ali drugim strupenim snovem (toksični kovinski ioni, žveplov dioksid, etanol), proti osmotskemu stresu, omogočajo pa tudi vezavo na različne površine (oprema, prebavni trakt) in oblikovanje biofilmov. MKB, ki proizvajajo EPS, so pogosto vključene v starterske kulture predvsem zaradi njihovega tehnološkega pomena, ker prispevajo k boljši konsistenci in reološkim lastnostim fermentiranih mlečnih izdelkov (de Vuyst in Degeest, 1999; Looijesteijn in sod., 2001; Ruas-Madiedo in sod., 2002).

Kot smo že omenili, so EPS pogosto rahlo vezani na celično površino in jih lahko odstranimo s spiranjem celic z različnimi kemičnimi sredstvi (NaOH, HCl, SDS, triton, tripsin). Ugotovili smo, da izolati, vključeni v našo raziskavo, od običajnih kemijskih sredstev, ki jih uporabljamo za odstranjevanje EPS, preživijo samo spiranje s 25-mili molarno raztopino NaOH in raztopino tripsina ( $1,5 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Ko smo na obdelanih celicah s 25-mili molarnim NaOH preizkusili občutljivost za fage, smo ugotovili, da je 15 izolatov, kot tudi sev CAa120, postalo občutljivih za

večino fagov. Izjemi sta izolata PT67 in PT70, ki po spiranju celične površine z blago raztopino NaOH dodatno občutljiva le za dva faga, kar je lahko posledica pomanjkanja primernih fagnih receptorjev ali preprečitve vbrizganja fagne DNA.

Glede na ugotovitev, da je bila večina izolatov po spiranju z blago raztopino NaOH bolj občutljiva za fage, nismo bili presenečeni, ko smo ugotovili, da večina naših izolatov tvori EPS. Analize so pokazale, da so ogljikovi hidrati na celični površini naših izolatov sestavljeni predvsem iz galaktoze, glukoze in ksiloze. Največ EPS je imel izolat PT19, ki je bil občutljiv le za en fag iz zbirke. Veliko zunajceličnih ogljikovih hidratov so vsebovali tudi izolati KR8, PT4 in PT9, ki so bili občutljivi za enega, dva oziroma tri fagne izolate. Najmanjšo količino ogljikovih hidratov smo ugotovili pri izolatu KR3. Raztopina snovi s površine celic, namnoženih preko noči v 10 ml bujona M17, je po spiranju vsebovala le 5,6 µM glukoze, 7,1 µM ksiloze in 8,1 µM galaktoze. Ta izolat je bil občutljiv za kar sedem od trinajstih fagov iz zbirke.

Pri obdelavi z blago alkalno raztopino smo s celičnih površin odstranili EPS. Izgubo EPS smo ugotavljali s pomočjo merjenja vsebnosti sladkorjev v ekstraktih pred obdelavo celic in po njej. Po obdelavi celic smo opazili zmanjšanje vsebnosti sladkorjev, kar je povzročilo, da so nekateri izolati izgubili del odpornosti proti fagom. Največje zmanjšanje vsebnosti sladkorjev smo opazili pri izolatu PT19, pri katerem se je zmanjšala vsebnost ksiloze za 82 % in galaktoze celo za 95 %, kar je drastično vplivalo na odpornost proti fagom: izolat PT19 je postal dovezten za okužbo z dodatnimi devetimi fagi. Pri izolatu PT4 se je po obdelavi z NaOH prav tako zmanjšala vsebnost glukoze in ksiloze, kar je povzročilo občutljivost za dodatnih sedem fagov. Pri izolatu MB18 smo opazili zmanjšanje ksiloze za kar 60 % in izolat je postal občutljiv še za sedem fagov. Pri izolatu PT13 pa je bila za oviranje pripenjanja fagov na njihove receptorje najverjetnejše odgovorna glukoza. Celice so po obdelavi izgubile 31 % glukoze in postale občutljive za dodatnih sedem fagov. Tako je verjetno tudi za pripenjanje fagov na izolat PT28 odgovorna glukoza, saj je ta izolat po obdelavi z NaOH izgubil kar 79,5 % glukoze in je postal občutljiv za dodatnih pet fagov.

Glede na to, da so proučevani laktokokni sevi v naslednji generaciji ponovno pridobili izgubljeno odpornost proti fagom, lahko sklepamo, da so zapisi za sintezo EPS, ki prekrijejo receptorje, potrebne za adsorpcijo fagov, zapisani na celičnem genomu. Običajno so za sintezo zunajceličnih snovi, ki maskirajo fagne receptorje, odgovorni plazmidi, kar sta dokazala leta 1989 v ločenih raziskavah že de Vos in Coffey s sodelavci. Opisala sta dva plazmida pSK110 in pCI528, ki vplivata na adsorpcijo fagov. Lucey in sodelavci (1992) so potrdili, da je za blokiranje fagnih receptorjev odgovoren plazmid pCI528, ki kodira sintezo hidrofilnega polimera, sestavljenega iz ramnoze in galaktoze. V podobni raziskavi sta Forde in Fitzgerald (1999b) ugotovila, da so za preprečitev fagne adsorpcije odgovorni EPS, sestavljeni predvsem iz glukuronske kisline in galaktoze, njihova sinteza pa je zapisana na plazmidu pCI658. Kje pa so zapisi za sintezo EPS v naših proučevanih izolatih, pa bomo poskušali ugotoviti z nadaljnjjimi raziskavami.

V naši raziskavi smo pri desetih proučevanih izolatih ugotovili močno oviranje fagne adsorpcije, saj EPS, ki jih tvorijo izolati, preprečujejo dostop do receptorjev petim do devetim fagom. Torej je tvorba polisaharidov uspešna naravna zaščita izolatov pred napadom fagov.

## POVZETEK

Za proizvodnjo različnih vrst sira in skute uporabljamo mezofilne starterske kulture, ki so sestavljene iz različnih sevov *Lactococcus lactis*. Okužba starterskih kultur z bakteriofagi še vedno predstavlja glavni vzrok počasne oziroma napačne fermentacije in posledica je izdelek slabe kakovosti. Prvi obrambni mehanizem celice pred fagnim napadom je oviranje pripenjanja fagov na receptorje, razporejene po celični površini. Bakterije lahko sintetizirajo različne

polisaharide, ki prekrijejo receptorje. S tankoplastno kromatografijo smo ugotovili, da so polisaharidi na celični površini izolatov sestavljeni predvsem iz galaktoze, glukoze in ksiloze. Z obdelavo celic s 0,25-mili molarno raztopino NaOH smo lahko te polisaharide odstranili. Ugotovili smo, da so bili izolati po spiranju veliko bolj občutljivi za napad fagov kot pred spiranjem. Največjo vsebnost sladkorjev smo opazili pri izolatu PT19, ki je bil občutljiv le za en fag. Po spiranju z NaOH pa se je pri tem izolatu zmanjšala vsebnost ksiloze in galaktoze za 82 oziroma 95 % in izolat je izgubil odpornost proti devetim fagom. Iz tega lahko zaključimo, da ima izolat PT19 receptorje za 10 od 14 proučevanih fagov.

## SUMMARY

Mesophilic starter cultures, consisting of different *Lactococcus lactis* strains, are used for manufacture of variety of cheeses. Bacteriophage infection of starter cultures is still the main cause of slow or incorrect fermentation, which results in poor-quality product. First defence mechanism coded is inhibition of phage adsorption to the receptors located on the cell surface. Bacteria can synthesise various exopolysaccharides, which can cover the receptors. Using thin liquid chromatography, we have determined that these exopolysaccharides consist mainly of galactose, glucose and xylose. These polysaccharides could be washed away by treating the cells with 0.25 mM NaOH. After washing, the isolates were much more susceptible to bacteriophage infection. Strain PT19 had the highest content of exopolysaccharides and it was susceptible only to one phage. After washing with NaOH, the amount of xylose and galactose was reduced by 82 and 95 %, respectively, and the isolate lost resistance against nine more phages. We can conclude that the isolate PT19 have receptors for 10 out of 14 studied phages.

## ZAHVALA

Avtorici se zahvaljujeva dr. Alenki Golc Wondra s Kemijskega inštituta za pomoč pri analizi sladkorjev s tankoplastno kromatografijo. Raziskave je financiralo Ministrstvo za šolstvo, znanost in šport.

## VIRI

- Coffey, A.G./ Fitzgerald, G.F./ Daly C. Identification and characterisation of a plasmid encoding abortive infection from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* UC811. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 43(1989), 229–244.
- de Vos, W.M. On the carrier state of bacteriophages in starter lactococci: an elementary explanation involving a bacteriophage resistance plasmid. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 43(1989), 221–227.
- de Vuyst, L./ Degeest, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(1999), 153–177.
- Dinsmore, P.K./ Klaenhammer, T.R. Bacteriophage resistance in *Lactococcus*. *Molecular Biotechnology*, 4(1995), 297–314.
- Forde, A./ Fitzgerald, G.F. Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76(1999a), 89–113.
- Forde, A./ Fitzgerald, G.F. Analysis of exopolysaccharide (EPS) production mediated by the bacteriophage adsorption blocking plasmid, pCI658, isolated from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HO2. *International Dairy Journal*, 9(1999b), 465–472.
- Labrie, S./ Moineau, S. Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2000), 987–994.
- Looijesteijn, P.J./ Trapet, L./ de Vries, E./ Abee, T./ Hugenholtz, J. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 64(2001), 71–80.
- Lucey, M./ Daly, C./ Fitzgerald, G.F. Cell surface characteristics of *Lactococcus lactis* harbouring pCI528, a 46 kb plasmid encoding inhibition of bacteriophage adsorption. *Journal of General Microbiology*, 138(1992), 2137–2143.

- Miklič-Anderlič, A. Proučevanje litičnih bakteriofagov mlečnokislinskih bakterij. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fak., Odd. za živilstvo, 1998, 77 str.
- Miklič-Anderlič, A./ Bogovič Matijašić, B./ Čanžek Majhenič, A./ Rogelj, I. Plasmid profiles of isolated *Lactococcus lactis* strains. 34. V: Hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka, Lovran, 08-11 nov. 2000. Zagreb, Hrvatska mljekarska udruga Zagreb, Zbornik sažetaka, 2000, 42.
- Miklič, A./ Rogelj, I. Characterisation of lactococcal bacteriophages isolated from Slovenian dairies. International Journal of Food Science and Technology, 38(2003), 305–311.
- Moineau, S./ Fortier, J./ Ackermann, H.W./ Pandian, S. Characterisation of lactococcal bacteriophages from Quebec cheese plants. Canadian Journal of Microbiology, 38(1992), 875–882.
- Ruas-Madiedo, P./ Hugenholtz, J./ Zoon, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 12(2002), 163–171.
- Svensson, U./ Christiansson, A. Methods for phage monitoring. V: Practical phage control. Bulletin of the International Dairy Federation, 263(1991), 29–39.
- Terzaghi, B.E./ Sandine, W.E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Applied Microbiology, 29(1975), 807–813.
- Valevasevi, R./ Sandine, W.E./ Geller, B.L. Bacteriophage kh receptor of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* KH is rhamnose of extracellular wall polysaccharide. Applied and Environmental Microbiology, 56(1990), 1882–1889.
- Ward, L.J.H./ Brown, J.C.S./ Davey, G.P. Two methods for the genetic differentiation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *cremoris* based on differences in the 16S rRNA gene sequence. FEMS Microbiology Letters, 166(1998), 15–20.
- Zacchello, P. I batteri lattici. V: L'analisi microbiologica dei prodotti lattiero – caseari (Ed.: Ottoviani, F.). Milano, Tecniche Nuove, 1991, 77–110.