

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

Дипломна магістерська робота

на тему: «Дослідження антибактеріального та
протиплівкоутворювального потенціалу бактеріофагу, виділеного з ґрунту»

Виконала: студентка 2 курсу, групи МгБТ-21
спеціальності 162 Біотехнології
та біоінженерія
освітньої програми Біотехнологія
високомолекулярних сполук
Юлія ХМЕЛЬНИЦЬКА
Керівник: к.б.н., Ольга ШИДЛОВСЬКА
Рецензент: к.т.н., доц. Олена ОХМАТ

Київ 2022

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія високомолекулярних сполук</u>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
біотехнології, шкіри та хутра

_____ Олена МОКРОУСОВА
« ____ » _____ 2022 року

**ЗАВДАННЯ
НА ДИПЛОМНУ МАГІСТЕРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНТУ
Хмельницької Юлії Олександрівни**

1. Тема роботи: Дослідження антибактеріального та протиплівкоутворювального потенціалу бактеріофагу, виділеного з ґрунту
Науковий керівник роботи Шидловська Ольга Андріївна, к.б.н.
затверджені наказом закладу вищої освіти
від «28» вересня 2022 року № 180-уч.
2. Строк подання студентом роботи _____
3. Вихідні дані до роботи: завдання на дипломну магістерську роботу; наукова література щодо властивостей бактеріофагів; експериментальні дані антибактеріальної та протиплівкоутворюючої дії бактеріофагу, виділеного з ґрунту; матеріали науково-дослідної та переддипломної практик.
4. Зміст дипломної роботи (перелік питань, які потрібно розробити): вступ, огляд літератури, об'єкт, мета та методи дослідження, експериментальна частина, висновки, список використаних джерел, додатки.

5. Консультанти розділів дипломної магістерської роботи

Розділ	Ім'я, прізвище та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 1	Ольга Шидловська, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Розділ 2	Ольга Шидловська, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Розділ 3	Ольга Шидловська, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Висновки	Ольга Шидловська, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		

6. Дата видачі завдання 12.09.2022 р.**КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН**

№ з/п	Назва етапів дипломної магістерської роботи	Терміни виконання етапів	Примітка про виконання
1	Вступ		
2	Розділ 1 Огляд літератури		
3	Розділ 2 Об'єкт, мета та методи дослідження		
4	Розділ 3 Експериментальна частина		
5	Висновки		
6	Оформлення дипломної магістерської роботи (чистовий варіант)		
7	Здача дипломної магістерської роботи на кафедру для рецензування		
8	Перевірка дипломної магістерської роботи на наявність ознак плагіату		
9	Подання дипломної магістерської роботи на затвердження завідувачу кафедри		

Студент _____

Юлія ХМЕЛЬНИЦЬКА

Науковий керівник роботи _____

Ольга ШИДЛОВСЬКА

Директор НМЦУПФ _____

Олена ГРИГОРЕВСЬКА

АНОТАЦІЯ

Хмельницька Юлія Олександрівна. Дослідження антибактеріального та протиплівкоутворювального потенціалу бактеріофагу, виділеного з ґрунт. – Рукопис

Дипломна магістерська робота за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2022 рік.

Метою роботи є дослідження антибактеріального та протиплівкоутворювального потенціалу бактеріофагу, виділеного з ґрунту. В роботі було розглянуто та досліджено їхні властивості, шляхи інфікування молочнокислих бактерій фагами, а також методи для їх захисту від ураження бактеріофагами.

Всі досліджувані штами бактеріофагів були отримані зі зразків харчових продуктів і зразків ґрунту, відібраних на території України та Антарктики. Дослідження показали, що найбільшого розповсюдження фаги здобули в саме молочнокислих продуктах та ґрунтах, доступних для громадського використання.

В результаті проведених експериментальних досліджень встановлено аналітичні залежності активності ураження молочнокислих бактерій, антибактеріального та протиплівкоутворювального потенціалу бактеріофагу.

У межах роботи проаналізовано властивості бактеріофагів щодо їх виявлення на твердих середовищах, збагачення, титрування, визначення сили біоплівки, визначення кількості живих бактерій та антиадгезивної активності та проведено статистичний аналіз. Отримані залежності властивостей бактеріофагів допоможуть прогнозувати можливість зараження ґрунтів та харчової продукції бактеріофагами на заводах та підприємствах на етапах виробництва, що дозволить покращити методи профілактики забруднення продукції від природних агентів.

Ключові слова: антибактеріальний потенціал, молочнокислі бактерії, бактеріофаги, рід Lactobacillus, продукти харчування, судинні рослини, фаги, LAB.

ABSTRACT

Khmelnyska Yuliia. Investigation of antibacterial and antibiofilm-forming potential of bacteriophage isolated from soil. – Manuscript.

Master's thesis in specialty 162 – Biotechnology and bioengineering. – Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2022.

The purpose of the work is to study the antibacterial and antifilm-forming potential of the bacteriophage isolated from the soil. In the work, their properties, ways of infection of lactic acid bacteria with phages, as well as methods for their protection from damage by bacteriophages were considered and investigated.

All studied strains of bacteriophages were obtained from food samples and soil samples collected on the territory of Ukraine and Antarctica. Studies have shown that phages are most prevalent in lactic acid products and soils available for public use.

As a result of the conducted experimental studies, the analytical dependences of the activity of damage to lactic acid bacteria, the antibacterial and antifilm-forming potential of the bacteriophage were established.

Within the framework of the work, the properties of bacteriophages were analyzed in terms of their detection on solid media, enrichment, titration, determination of biofilm strength, determination of the number of living bacteria and anti-adhesive activity, and statistical analysis was performed. The obtained dependences of the properties of bacteriophages will help to predict the possibility of contamination of soils and food products with bacteriophages at factories and enterprises at the production stages, which will allow to improve the methods of prevention of contamination of products from natural agents.

Keywords: antibacterial potential, lactic acid bacteria, bacteriophages, genus Lactobacillus, food products, vascular plants, phages, LAB.

ЗМІСТ

ВСТУП	10
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	14
1.1 Характеристика основних молочнокислих бактерій, що використовуються у виробництві молочнокислої продукції	14
1.1.1 Характеристика представників роду <i>Lactobacillus</i>	15
1.1.2 Характеристика представників роду <i>Lactococcus</i>	17
1.1.3 Характеристика представників роду <i>Bifidobacterium</i>	18
1.2 Характеристика бактеріофагічного забруднення молочних та молочнокислих продуктів	20
1.2.1 Бактеріофаги, що інфікують <i>Lactobacillus fermentum</i>	22
1.2.2 Бактеріофаги, що інфікують <i>Lactobacillus acidophilus</i>	24
1.2.3 Бактеріофаги, що інфікують інші види роду <i>Lactobacillus</i>	26
1.3 Характеристика судинних рослин, що населяють Антарктику	27
1.3.1 Огляд <i>Deschampsia antarctica</i>	29
1.3.2 Огляд <i>Colobanthus quitensis</i>	30
1.4 Бактеріофаги, що інфікують бактерії рослин.....	31
1.4.1 <i>Dickeya</i> і <i>Pectobacterium</i>	33
1.4.2 <i>Erwinia amylovora</i>	33
1.4.3 <i>Ralstonia solanacearum</i>	34
1.4.4 <i>Pseudomonas syringe</i>	34
1.4.5 Вид <i>Xanthomonas</i>	35
1.4.6 <i>Xylella fastidiosa</i>	36
1.4.7 <i>Serratia marcescens</i>	36

1.5 Літичний та лізогенний шляхи розвитку бактеріофагів.....	37
1.6 Механізми захисту бактерій від інфікування бактеріофагами.....	40
Висновки до розділу 1.....	43
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТ, МЕТА ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	45
2.1 Характеристика об'єкту дослідження.....	45
2.1.1 Особливості об'єкту дослідження.....	45
2.2 Характеристика предмету дослідження.....	46
2.3 Методи дослідження.....	46
2.3.1 Прямий метод виявлення бактеріофага.....	46
2.3.2 Виявлення бактеріофага на твердому середовищі.....	47
2.3.3 Титрування фагів методом spot-тесту.....	48
2.3.4 Титрування фагів за методом Грація.....	49
2.3.5 Титрування фагів за методом Апельмана.....	50
2.3.6 Дослідження оптичної густини за допомогою спектрофотометра.....	52
2.3.7 Визначення сили біоплівки.....	52
2.3.8 Визначення антибактеріальної дії фага.....	53
2.3.9 Антиадгезивна дія.....	53
2.3.10 Статистичний аналіз.....	54
Висновки до розділу 2.....	55
РОЗДІЛ 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	58
3.1 Результати дослідів.....	58
3.1.1 Прямий метод виявлення бактеріофага.....	58
3.1.2 Виявлення бактеріофага на твердому середовищі.....	59
3.1.3 Титрування фагу методом spot-тесту.....	60

3.1.4 Титрування фагів за методом Грація	61
3.1.5 Титрування фагів за методом Апельмана	62
3.1.6 Дослідження оптичної густини за допомогою спектрофотометра	63
3.1.7 Визначення сили біоплівки	64
3.1.8 Дослідження антибактеріальної дії досліджуваного фага	65
3.1.9 Антиадгезивна дія досліджуваного фага	68
Висновки до розділу 3	72
ВИСНОВКИ	73
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	75
ДОДАТКИ	Помилка! Закладку не визначено.

ВСТУП

Основою всіх життєвих процесів організму людини є постійний обмін речовин між організмом і навколишнім середовищем. Із довкілля людина споживає кисень, воду і харчові продукти. З продуктами харчування людина отримує речовини, необхідні для нормальної життєдіяльності, – білки, жири, вуглеводи, мінеральні солі, воду, вітаміни. Всі вони беруть участь у складних процесах обміну речовин, розпадаються та виводяться з організму.

Роль їжі полягає в поповненні енергії і тканинних елементів, необхідних для росту, розвитку і функціонування організму, забезпечення обмінних процесів, нормального стану здоров'я і працездатності. Саме завдяки харчуванню забезпечується безперервність перебігу двох протилежних і взаємопов'язаних процесів асиміляції і дисиміляції.

Існують продукти харчування рослинного і тваринного походження. Найбільш розповсюджені продукти рослинного походження: злакові й продукти їх переробки, овочі, фрукти, ягоди, гриби. До продуктів тваринного походження відносять м'ясо, рибу, яйця, молоко і молочні продукти.

Кисломолочними називаються продукти, виготовлені сквашуванням пастеризованого молока або вершків чистими культурами молочнокислих бактерій з додаванням або без додавання дріжджів чи оцтовокислих бактерій. У процесі сквашування під впливом молочнокислих бактерій, ферментів та інших агентів відбуваються хіміко-фізичні зміни складових частин молока, наприклад, коагуляція білків.

Промислова переробка молока являє собою складний комплекс послідовно виконаних та взаємопов'язаних фізико-хімічних, мікробіологічних, біотехнологічних та інших специфічних процесів, спрямованих у соціально-технологічному плані на задоволення потреб споживачів і виробництво високоякісних, екологічно безпечних продуктів нового покоління. Комплексна переробка молока з використанням всіх його складових частин, збільшення випуску конкурентоспроможної продукції, що

користується підвищеним попитом населення і відповідає експертним можливостям, є головним завданням молочної промисловості.

При виробництві кисломолочних продуктів (кисломолочні напої, сметана, кисломолочний сир), сирів, у пастеризовану молочну суміш вносять спеціально підібрані штами молочнокислих, пропіоновокислих, біфідобактерій, дріжджів, в наслідок чого відбуваються біохімічні зміни складових молока, відбувається процес бродіння, який лежить в основі виготовлення всіх кисломолочних продуктів [1].

Виробництво ферментованих молочних продуктів є класичним та, мабуть, і найстарішим напрямом біотехнології, яке базується на застосуванні мікроорганізмів. Завдяки життєдіяльності та біохімічному потенціалу заквашувальної мікрофлори відбуваються перетворення основних компонентів молока у смакові, ароматичні та біологічно активні речовини, формується консистенція та структура кисломолочних продуктів, сирів тощо. Тому якість готової продукції перш за все залежить від стану заквашувальної мікрофлори та напряму перебігу мікробіологічних процесів.

Актуальність теми. На багатьох підприємствах присутня проблема загрози бактеріофагічного забруднення продуктів харчування. Про проблеми, пов'язані з наявністю фагів, повідомлялося в харчовій, хімічній, фармацевтичній, кормовій та пестицидній промисловості. Проте молочна промисловість, ймовірно, є тією, в якій проблеми з фагами є найбільш задокументованими. Протягом десятиліть молочна промисловість боролася з цим природним явищем і покладалася на низку заходів контролю, зокрема адаптовані дизайни заводів, покращення санітарії, змін процесів, специфічне культуральне середовище, чергування штамів та використання фагорезистентних штамів. В роботі було розглянуто та досліджено їхні властивості, шляхи інфікування молочнокислих бактерій фагами, а також методи для їх захисту від ураження бактеріофагами.

Метою роботи є дослідження антибактеріального та протиплівкоутворювального потенціалу бактеріофагу, виділеного з ґрунту.

Об'єкт дослідження – бактеріофаг, виділений з ґрунту на території України (з ґрунту клумби Святошинського району з під рослини гортензії – *Hydrangea* spp.).

Предмет дослідження – аналіз антибактеріального та протиплівкоутворювального потенціалу бактеріофагу, виділеного з ґрунту.

Завдання дослідження. Відповідно до встановленої мети було сформульовано та вирішено ряд завдань:

1. Виділити зі зразків харчових продуктів та зразків ґрунту бактеріофаги до відповідних чутливих культур бактерій.
2. Провести накопичення бактеріофагу та попередні дослідження для встановлення його біологічної активності по відношенню до чутливої культури.
3. Визначити спектр чутливих бактерій до виділеного бактеріофагу.
4. Дослідити антибактеріальну та протиплівкоутворюючу активність виділеного з ґрунту бактеріофагу проти ряду чутливих штамів бактерій.

Методи дослідження, що використані в роботі: спостереження, аналіз, узагальнення, біологічні, мікробіологічні, статистичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів полягає в тому, що в результаті проведених експериментальних досліджень встановлено аналітичні залежності активності ураження молочнокислих бактерій, антибактеріального та протиплівкоутворювального потенціалу бактеріофагу, виділеного з ґрунту.

Практичне значення отриманих результатів полягає в тому, що межах даної роботи проаналізовано властивості бактеріофагів щодо їх виявлення на твердих середовищах, збагачення, титрування, визначення сили біоплівки, визначення кількості живих бактерій та антиадгезивної активності та проведено статистичний аналіз. Отримані залежності властивостей бактеріофагів допоможуть прогнозувати можливість зараження ґрунтів та

харчової продукції бактріофагами на заводах та підприємствах на етапах виробництва, що дозволить покращити методи профілактики забруднення продукції від природних агентів.

Апробація результатів роботи. Основні положення і результати роботи доповідались на XIII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біологічні дослідження – 2022», яка проходила на базі природничого факультету Житомирського державного університету імені Івана Франка (Україна) 10-11 жовтня 2022 року (Додаток А).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано тези доповідей Всеукраїнської конференції (додаток А):

Хмельницька Ю. О., Шидловська О. А. Характеристика фагу phiJB РНІВ, виділеного з *Lactobacillus delbrueckii*. *Біологічні дослідження – 2022: збірник наукових праць* : XIII Всеукр. науково–практ. конф., 10 жовт. 2022 р. Житомир, 2022. С. 229–231.

Підготовлено до публікації статтю «*L. lactis* bacteriophages and methods of their elimination from dairy products», яку подано до IX Міжнародної конференції з передових матеріалів і систем, яка проходила в Бухаресті (Румунія) 26-28 жовтня 2022 року (додаток Б).

Структура та обсяг роботи. Дипломна магістерська робота складається зі вступу, трьох розділів з висновками, загальних висновків та списку використаних джерел. Основна частина дипломної магістерської науково-дослідницької роботи викладена на 83 сторінках друкованого тексту, включає 12 рисунків. Список використаних джерел з 66 найменувань публікацій вітчизняних та зарубіжних дослідників поданий на 7 сторінках. В роботі представлено два додатки, що ілюструють виконання індивідуального плану магістра, представлені на 11 сторінках.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Характеристика основних молочнокислих бактерій, що використовуються у виробництві молочнокислої продукції

Молочнокислі бактерії становлять групу бактерій, які мають морфологічну, метаболічну та фізіологічну схожість, а також відносно тісно пов'язані між собою філогенетично. Загальний опис бактерій у групі — це грампозитивні, неспороутворювальні, позбавлені здатності синтезувати цитохроми і порфірини (компоненти дихальних ланцюгів) і тому не можуть генерувати АТФ шляхом створення протонного градієнта, вибагливі, толерантні до кислот, не дихаючі коки або палички, які суворо ферментативним шляхом вуглеводів виробляють молочну кислоту як основний кінцевий продукт під час бродіння цукру [2].

Термін молочнокислі бактерії (LAB) поступово був прийнятий на початку 20 століття.

Класифікація родів LAB була заснована на морфології, способі бродіння глюкози, зростання при певних температурах та діапазоні використання цукру. Існує основна група, що складається з чотирьох родів: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* і *Streptococcus*. Для ідентифікації LAB найчастіше використовуються фенотипові методи.

Таксономія молочнокислих бактерій була заснована на реакції Грама і виробленні молочної кислоти з різних ферментованих вуглеводів. Класифікація молочнокислих бактерій за різними родами значною мірою заснована на морфології, способі бродіння глюкози, зростанні при різних температурах і конфігурації виробленої молочної кислоти, здатності рости при високих концентраціях солі та кислото- або лужної толерантності. Для деяких з описаних родів у класифікації використовуються додаткові характеристики, такі як склад жирних кислот і рухливість. Вимірювання справжніх

філогенетичних зв'язків із секвенуванням рРНК допомогли класифікувати молочнокислі бактерії та прояснили філогенез групи [3].

ЛАВ можуть отримати АТФ лише шляхом ферментації, як правило, цукрів. Оскільки вони не використовують кисень для виробництва енергії, молочнокислі бактерії добре ростуть в анаеробних умовах, але вони також можуть рости в присутності кисню. Вони захищені від побічних продуктів кисню (наприклад, H_2O_2), оскільки містять пероксидази.

Серед молочнокислих бактерій можна виділити два основні шляхи бродіння цукру. Гліколіз (шлях Ембдена-Мейєргофа) призводить до майже виключно молочної кислоти як кінцевого продукту за стандартних умов, а метаболізм називається гомолактичною ферментацією. Шлях 6-фосфоглюконат/фосфокетолаза призводить до значних кількостей інших кінцевих продуктів, таких як етанол, ацетат і CO_2 на додаток до молочної кислоти, і метаболізм називається гетеромолочним бродінням. Різні умови росту можуть значно змінити утворення кінцевого продукту деякими молочнокислими бактеріями. Ці зміни можуть бути пов'язані зі зміненим метаболізмом пірувату та/або використанням зовнішніх акцепторів електронів, таких як кисень або органічні сполуки [4].

1.1.1 Характеристика представників роду *Lactobacillus*

Лактобактерії - це каталазонегативні, грампозитивні мікроорганізми, які виробляють переважно молочну кислоту як основний метаболічний кінцевий продукт ферментації вуглеводів. Лактобактерії є не спороутворюючими паличками або кокобацилами. Вони суворо ферментативні, аеротолерантні або анаеробні, кислотні або ацидофільні й мають складні потреби (наприклад, у вуглеводах, амінокислотах, пептидах, ефірах жирних кислот, солях, похідних нуклеїнових кислот і вітамінах).

Не синтезують порфіриноїди і, таким чином, позбавлені гемезалежної активності. Штами деяких видів можуть використовувати порфіриноїди з

довкілля і виявляють активність каталази, відновлення нітритів або навіть цитохроми. Псевдокаталаза утворюється в штаммах *Lactobacillus mali*. З глюкозою як джерелом вуглецю лактобактерії можуть бути або гомоферментативними, тобто виробляють більше 85% молочної кислоти, або гетероферментативними, що виробляють молочну кислоту, CO₂, етанол (і/або оцтову кислоту) у еквімолярні кількості. У присутності кисню або інших окислювачів збільшена кількість ацетату може вироблятися за рахунок лактату або етанолу, завдяки чому один додатковий моль АТФ отримується через ацетаткіназну реакцію. Таким чином, можуть виникнути зміни в кінцевих продуктах метаболізму. Різні сполуки (наприклад, цитрат, малат, тартрат, хінолат, нітрат, нітрити тощо) можуть метаболізуватися та використовуватися як джерело енергії (наприклад, через створення протонної рушійної сили) або акцепторів електронів [5].

Найбільше представники роду *Lactobacillus* відомі своїм застосуванням у харчовій ферментації, а конкретні штами були визнані такими, що мають пробіотичні властивості. Аспекти здоров'я лактобактерій спонукали багатьох дослідників активно досліджувати численні потенційні джерела цих бактерій. Як наслідок, за останні 20 років спостерігався вибух нових видів, причому на початку 2013 року з'явилося понад 150 видів із дійсними назвами. Незважаючи на те, що багато раніше описаних видів були переведені до новостворених родів (*Atopobium*, *Carnobacterium*, *Eggerthia*, *Fructobacillus*, *Weissella* та ін.) рід залишається гетерогенним за філогенетичними та фенотиповими маркерами [6].

Лактобактерії зустрічаються там, де доступно багато вуглеводневих субстратів, тобто, у різноманітних середовищах існування, наприклад на слизовій оболонці оболонок людини і тварин, на рослинах або матеріалах рослинного походження, у гної та техногенних середовищах існування, таких як стічні води, бродіння або псування їжі.

1.1.2 Характеристика представників роду *Lactococcus*

Рід *Lactococcus* включає в себе 5 видів типових лактококів *Lactococcus lactis*. Виокремлено 4 види, що належать до роду лактококів: *Lac. garvieae*, *Lac. piscium*, *Lac. plantarum*, *Lac. Raffinolactis*. Підвид *Lac. lactis subsp. hordniae* було перенесено в рід *Lactococcus* з іншого роду [7].

Таксономічна плутанина, спричинена тим, що зовсім неспоріднені бактерії були поміщені до роду *Streptococcus* лише на основі морфологічних критеріїв, закінчилися остаточно, коли були успішно застосовані сучасні методи хімічної систематики. На основі дослідження гібридизації нуклеїнових кислот та імунологічних зв'язків відокремлено мезофільні молочнокислі стрептококи від справжніх стрептококів (рід *Streptococcus*) і ентерококів (рід *Enterococcus*) і створено новий рід *Lactococcus*. Ця назва є геніальним описом їх функції та морфології бактерій, на які, звичайно, вплинули вже існуючий рід *Lactobacillus*, який містить більшу частину паличкоподібних молочнокислих бактерій [8].

Лактококи - це бактерії кокоїдної форми, які мають розмір близько 0,5-1,2 x 0,5-1,5 мкм та найчастіше розташовані у вигляді коротких ланцюжків. Вони нерухомі, не утворюють капсули і спори. Лактококи - грампозитивні, факультативно-анаеробні бактерії, які продукують L(+)-молочну кислоту з лактози в спонтанно ферментованому сирому молоці, яке залишають при температурі навколишнього середовища (близько 20-30°C) на 10-20 год. Через це їх зазвичай називають «мезофільні молочнокислі стрептококи» [9].

Лактококам, як і більшості молочнокислих бактерій, необхідні вітаміни: рибофлавін, тіамін, пантотенова, нікотинова, фолієва кислоти, піродиксин (B6) та ін. Цим пояснюється позитивний вплив на ріст мікроорганізмів добавок у поживні середовища картопляного та кукурудзяного борошна. На подібних живильних середовищах молочнокислі бактерії мають можливість утворити колонії човникоподібної або округлої форми [10].

Біохімічні властивості роду *Lactococcus* визначають за декількома критеріями: гранична кислотність, енергія кислотоутворення, якість згустку, здатність ферментувати солі лимонної кислоти, можлива протеолітична активність бактерій. Енергія кислотоутворення визначається як період, за який утворився згусток молока при внесенні 0,5 см³ молодого культури в 10 см³ стерильного знежиреного молока і вирощуванні посівів при оптимальній температурі [11].

1.1.3 Характеристика представників роду *Bifidobacterium*

Біфідобактерії являють собою групу бактерій, що відіграють важливу роль у життєдіяльності людини. Ця група мікроорганізмів є складовою частиною нормальної мікрофлори шлунково-кишкового тракту (ШКТ) людини і тварин. Завдяки високій і різноманітній біологічній активності біфідобактерій інтерес до цих бактерій постійно зростає.

Значний прогрес у галузі систематики біфідобактерій почав спостерігатися у другій половині ХХ ст., після встановлення домінуючої ролі цих мікроорганізмів у складі мікрофлори ШКТ дітей, а також їх позитивного впливу на організм людини [12].

На даний час описано 31 вид біфідобактерій, які в останні роки були доповнені трьома новими родами.

Біфідобактерії – це варіабельні за морфологією палички. різної форми: короткі, правильні, тонкі клітини з загостреними кінцями, кокоїдні правильні клітини або довгі клітини з невеликими вигинами або виступами або з великою різноманітністю розгалужень; загострені, зі злегка роздвоєними булавоподібними або лопатоподібними кінцівками; може зустрічатися окремо або в ланцюгах з багатьох елементів; може зустрічатися у вигляді зіркоподібних агрегатів або у «V» або «частолонних» розташуваннях. Колонії гладкі, опуклі з цільними краями, від кремового до білого кольору, блискучі, м'якої консистенції. Грампозитивні, кислотостійкі, неспороутворюючі і

нерухомі. Клітини часто нерівномірно забарвлюються метиленовим синім. Анаероби; деякі види можуть переносити O_2 , але тільки в присутності CO_2 , а нещодавно описані види, такі як *Bifidobacterium psychraerophilum*, *Bifidobacterium scardovii* і *Bifidobacterium tsurumiense*, можуть рости в аеробних умовах. Оптимальна температура росту 37–41°C, за винятком *Bifidobacterium mongoliense*, який демонструє оптимальну температуру росту 30°C; мінімальна температура росту 25–28°C, за винятком *Bifidobacterium mongoliense* та *Bifidobacterium psychraerophilum*, які можуть рости при 15°C і 8°C відповідно; максимальна температура росту 43–45°C, за винятком *Bifidobacterium thermacidophilum*, у якого максимальна температура росту 49,5°C. Оптимальний рН для початкового росту становить 6,5–7,0; не росте при рН 4,5–5,0 (за винятком *Bifidobacterium thermacidophilum*, який може рости при рН 4,5) або рН 8,0–8,5 [13].

Було відмічено посилення розгалуження і утворення набряклих, інволюційних, кулеподібних форм біфідобактерій в несприятливих умовах поживного середовища, а саме: занадто висока або низька кислотність середовища, температура вирощування, присутність кисню. В результаті проведених досліджень зроблено висновок, що хоча біфідобактерії мають тенденцію до плеоморфізму при рості *in vitro*, але вони у більшості паличкоподібні у природному для них середовищі. Припускається, що біфідобактерії мають більш складний шлях синтезу клітинної стінки, ніж інші мікроорганізми.

Потреби біфідобактерій у поживних речовинах великі і різноманітні. Ці мікроорганізми потребують біотину, рибофлавіну, пантотенової кислоти, пуринових і піримідинових основ, пептидів, цистеїну, аміноцукрів. В той же час деякі біфідобактерії самі здатні синтезувати ряд вітамінів: пантотенову кислоту, рибофлавін, тіамін, фолієву кислоту, кобаламін.

Протягом всього періоду вивчення біології біфідобактерій, що супроводжувався відкриттям нових видів і дослідженням їх властивостей,

між дослідниками цих мікроорганізмів велися суперечки у питанні відношення їх до кисню. Літературні відомості про здатність біфідобактерій рости в присутності кисню є суперечливими і дотепер. Так, одні автори відмічали різницю в потребі атмосферного CO₂ при вирощуванні біфідобактерій на твердому або в рідкому середовищах. Інші ж дослідники показали, що біфідобактерії є анаеробними мікроорганізмами, а також виявили існування різних причин анаеробіозу для різних штамів біфідобактерій [14].

1.2 Характеристика бактеріофагічного забруднення молочних та молочнокислих продуктів

Основні чинники, що можуть негативно вплинути на розвиток та активність заквашувальних культур з одного боку, пов'язані з якістю сировини:

- неповноцінністю молока, як середовища для розвитку молочнокислих бактерій;
- наявністю і збереженням у молоці природних антибактеріальних систем;
- забрудненням молока антибіотиками та іншими лікарськими препаратами, які використовують у ветеринарії;
- пестицидами;
- миючими та дезінфікуючими засобами;
- іншими речовинами, які згубно діють на молочнокислі бактерії.

З іншого боку на функціонування заквашувальної мікрофлори можуть негативно впливати природні агенти — віруси бактерій — бактеріофаги, які інфікують бактерії заквасок та істотно впливають на їхню життєдіяльність.

Ураження бактеріофагами є надзвичайно небезпечним, оскільки ці живі істоти за своєю біологічною суттю є облігатними паразитами і для свого відтворення використовують енергетичні та матеріальні ресурси бактеріальної

клітини, призводячи до її руйнування. Від бактерії залишаються лише уламки, в той час як на світ з однієї клітини з'являється не менше ніж 10–300 нових фагів готових до інфікування інших клітин [15].

Слід зазначити, що проблема бактеріофагії гостро стоїть на багатьох молокопереробних підприємствах. Відповідно до даних науковців і виробників, забруднення бактеріофагами складає 33% від загальної кількості факторів, які спричинюють зниження активності заквашувальної мікрофлори. Для порівняння — залишки антибіотиків відповідають за 24% випадків незадовільної якості заквасок, низька якість молока — за 4%, а низька якість самих заквасок — за 7% від загального числа таких випадків.

Життєвий цикл бактеріофагів складається з наступних етапів:

- 1) адсорбція на клітині–хазяїна;
- 2) ін'єкція генома фага у клітину–хазяїна;
- 3) синтез компонентів фага клітиною– хазяїна;
- 4) формування нових фагових часток усередині клітини–хазяїна;
- 5) лізис клітини–хазяїна, вихід фага [16].

Це так званий літичний цикл розвитку вірулентних фагів. Існують помірні фаги, які не руйнують усі клітини, а з деякими вступають у симбіоз у вигляді профага, тобто вбудовують свій геном у хромосому бактерії і в такому умовно «сплячому» вигляді передаються від клітини до клітини в процесі її розмноження. Але, під впливом деяких стресових для клітини факторів, наприклад, температурного або фізико–хімічного впливу, опромінення ультрофіолетом і т.д., а іноді і спонтанно профаги можуть переходити до літичного життєвого циклу і призводити до лізису бактерій. Тому такі лізогенні культури закваски (що містять помірні фаги) можуть бути ще одним джерелом фагового забруднення на виробництві.

Бактеріофаги на виробництві розмножуються зі значною швидкістю. У разі інфікування культур молочнокислих бактерій вірулентними фагами спочатку відхилень у розвитку мікроорганізмів не спостерігається. Проте,

через 2–4 години більшість бактеріальних клітин лізується, молочнокисле бродіння і наростання кислотності припиняється. Після певного часового проміжку кислотність знову починає зростати (так званий «вторинний ріст») за рахунок фагорезистентних мутантів, які практично завжди присутні в популяції чутливих до фага штамів. Тому згортання молока в присутності фага відбувається не за 5–7 годин, а через 20–36 годин, або взагалі не настає [15]. Через це необхідно слідкувати за розвитком молочнокислого процесу у перші години після внесення закваски. Якщо молоко містить антибіотики чи інші інгібуючі речовини, розвиток заквашувальної мікрофлори уповільнюється або не спостерігається з моменту заквашування. Якщо ж причиною не сквашування є розвиток бактеріофагу, то спочатку спостерігається збільшення кількості клітин і нормальне зростання кислотності. А після 2–4 годин кількість життєздатних клітин закваски зменшується внаслідок фаголізу та припиняє наростати кислотність. Швидкість молочнокислого процесу практично не змінюється, якщо відбувається фаголізис одного із декількох штамів комплексної закваски. Та значно уповільнюється, коли лізуються два чи три штами закваски.

1.2.1 Бактеріофаги, що інфікують *Lactobacillus fermentum*

Lactobacillus fermentum — це облигатно гетероферментативна молочнокисла бактерія, яка бере участь у ферментації закваски для виробництва деяких пшеничних і житніх хлібів. Достовірно встановлено, що метаболічна активність лактобактерій значною мірою сприяє сенсорним якостям цих видів випічки, таким як утворення смакових сполук, реологічні характеристики м'якушки та термін зберігання. Більшість невеликих пекарень використовують натуральні культури, в яких типова мікрофлора поширюється від закваски до наступної, тоді як промислові пекарні віддають перевагу вибраним закваскам або висушеному ферментованому тісту для контролю та скорочення процесу бродіння [17]. Безперервні системи приготування

закваски вже впроваджені на хлібопекарських підприємствах. *Lactobacillus fermentum* також використовується при ферментації соєвих молочних продуктів, і він присутній як другорядний компонент у природній мікрофлорі заквасок молочної сироватки для виробництва твердих сирів, таких як Грана і Грюйер де Конте. Проводяться лабораторні та пілотні випробування для розробки промислового процесу виготовлення етанолу з соку цукрової тростини з використанням *Lact. fermentum* [18].

Однією з найбільших небезпек будь-якого технологічного процесу, заснованого на бактеріальному бродженні, є інфекція бактеріофагів, що здатна уповільнити або навіть припинити виробництво. Поведінка цих вірусів та їхні стосунки зі штамми-господарями вимагає ретельного розуміння для контролю, особливо якщо ферментація здійснюється в безперервній системі. Доступно мало інформації про наявність бактеріофагів у *Lact. fermentum* [19].

Перші міофаги *Lactobacillus* були виділені в 1965 році, і вони інфікували штамми видів *Lactobacillus fermentum*. Ще з двох *Lact.* з тих пір були виділені фаги *fermentum* зі скоротливим хвостом, а інші належать до родини *Siphoviridae* [20].

У дволанцюгових ДНК-бактеріофагів цикли інфекції завершуються лізисом клітини-господаря під дією кодованих фагом ендолізинів і холінів. Точний час лізису регулюється інгібіторами холіну, які називаються антихолінами [21]. Аналіз послідовності показав, що холини з одним трансмембранним доменом (TMD) переважають у бактеріофагах *Lactobacillus*. Бактеріофаг *Lactobacillus fermentum*, фРУВ5, має двокомпонентну лізисну касету, що містить ендолізін Lyb5 і холін Hyb5. Ген *hyb5* має довжину 465 нм, кодує 154 амінокислотні залишки з N-кінцевим TMD і великим цитоплазматичним C-кінцевим доменом. Однак N-кінець не містить мотиву подвійного початку, що свідчить про те, що олігомеризація Hyb5 може бути пригнічена специфічним антихоліном [22].

Ендолізин Lyb5, отриманий з бактеріофага помірного типу *Lactobacillus fermentum* фРҮВ5, показав широкий літичний спектр проти грампозитивних, а також грамнегативних бактерій [23].

Бактеріофаг помірного клімату фРҮВ5, виділений із штаму *Lactobacillus fermentum* YB5, має гексагональну головку, нескоротливі хвости та кілька волокон і належить до групи Б Бредлі за визначенням Міжнародного комітету з таксономії вірусів. Послідовність гена ендолізину lyb5 з геному фРҮВ5 була депонована в GenBank під інвентарним номером EF531306, і продукт гена був успішно експресований в *Escherichia coli* і показав широкий літичний спектр [24].

Індуковані фаги помірного клімату належать до найпоширенішої групи Б Бредлі, мають шестикутну голову та довгий нескоротливий хвіст. Крім того, було підтверджено, що вони є одним і тим же бактеріофагам за допомогою ідентичних моделей рестрикції. Наявність профага впливало на форму клітини та розмір колонії її лізогенного штаму [25].

1.2.2 Бактеріофаги, що інфікують *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus ADH є лізогенним і містить індукцибельний профаг, phi adh. Бактеріофаги виявляли в клітинних лізатах, індукованих обробкою мітоміцином С або УФ-світлом. Електронна мікроскопія лізатів виявила частинки фага з гексагональною голівкою (62 нм) і довгим, нескоротливим, гнучким хвостом (398 нм), що закінчується принаймні п'ятьма короткими волокнами. Фаг phi adh був віднесений до групи фагів Бредлі В1 і сімейства *Siphoviridae* [26].

Майже 60% відомих фагів *Lactobacillus* належать до сімейства *Siphoviridae*. Вони мають ікосаедричний капсид діаметром від 40 до 76 нм і хвіст довжиною від 116 до 500 нм. Деякі з них мають витягнуту голову довжиною 120–150 нм і шириною від 40 до 50 нм. Витягнуті фаги, описані на

сьогоднішній день, інфікують *Lb. delbrueckii subsp. lactis* (фаги JCL1032, 0235) і *Lb. acidophilus* (phi y8), *Lb. fermentum* (064 і 0209) і *Lb. salivarius* (phi223) [27].

Геном phi adh являє собою лінійну дволанцюгову молекулу ДНК із 41,7 кілобазових пар із згуртованими кінцями: була побудована фізична карта геному phi adh.

Незважаючи на використання *L. acidophilus* у харчових ферментаціях та як дієтичні добавки до їжі для людей та кормів для тварин, розподіл лізогенії в цих організмах не був чітко визначений. Лізогенію вперше приписували *L. acidophilus* у 1970 році. Лізати восьми з 80 штамів *L. acidophilus*, оброблених мітоміцином С, інгібували газони індикаторних штамів і містили фагоподібні частинки. Згодом досліджували 15 видів лактобактерій на індуктивний лізис. Використовуючи мітоміцин С, отримали частинки фага з одного штаму *L. acidophilus* (АТСС 19992), який інгібував газони гомологічної індикаторної культури. Характеристики фага 19992 не повідомлялися, а докази лікування та релізогенізації не були представлені.

Інші автори згодом досліджували індукований фаг *L. acidophilus* АТСС 19992, але не змогли ідентифікувати вилікувані профагом, чутливі до фагу похідні. Подальшу характеристику профага *L. acidophilus* АТСС 19992 та його геному не повідомлялося [28].

У нещодавніх роботах дослідники описують індукцибельний профаг, що міститься в лізогені, *L. acidophilus* АДН. Автори охарактеризували дволанцюгову ДНК фага adh і елегантно продемонстрували її здатність трансдукувати плазмідну ДНК у вилікувані профагом похідні батьківського штаму. Розробка додаткових систем трансдукції у *L. acidophilus* вимагає ідентифікації інших лізогенних штамів.

Як початковий крок у ідентифікації систем трансдукції, ми дослідили 36 штамів *L. acidophilus* на індуктивний лізис, очистили та частково охарактеризували помірний фаг, що міститься в одному штамі, та оцінили гомологію ДНК фага з геномом клітини-хазяїна [29].

Більшість цих фагів є видоспецифічними; деякі мають обмежену внутрішньовидову дію.

1.2.3 Бактеріофаги, що інфікують інші види роду *Lactobacillus*

Багато фагів молочнокислих бактерій стали моделями для вивчення різних аспектів біології фагів. Фаги лактобацил не є винятком.

Однією з головних проблем, що виникають під час ферментації харчових продуктів, є повсюдна присутність вірулентних бактеріофагів, які можуть змінювати якість ферментованих продуктів або затримувати процеси виробництва. Незважаючи на те, що після відкриття бактеріофагів як основної причини збоїв ферментації було введено безліч заходів контролю фагів, фаги залишаються високою небезпекою для молочної промисловості.

Через ранні досягнення методів фарбування для електронної мікроскопії, більшість фагів *Lactobacillus* були вперше охарактеризовані на морфологічному рівні. На сьогоднішній день всі вони мають ізомерний капсид і хвіст і, таким чином, належать до порядку *Caudovirales*. У 2007 році Аккерманн повідомив, що за допомогою електронного мікроскопа спостерігали 190 фагів *Lactobacillus*, у тому числі 120 з родини *Siphoviridae* (довгий нескоротливий хвіст) і 70 із родини *Myoviridae* (скоротливий хвіст). Під час власних пошуків було знайдено 231 фаг *Lactobacillus*, 186 з яких спостерігали за допомогою електронної мікроскопії, 109 належать до сімейства *Siphoviridae*, 76 до родини *Myoviridae* та лише 1 до родини *Podoviridae* [30].

Широкомасштабна ферментація молочних продуктів вимагає інокуляції молока ретельно відібраними молочнокислими бактеріями, такими як *Lactococcus* і *Lactobacillus*. Інфікування заквасок бактеріофагами призводить до відсутності або затримки ферментації, що призводить до низькоякісних молочних продуктів.

У багатьох великомасштабних харчових ферментаціях, виготовлених за допомогою лактобактерій, ризик забруднення бактеріофагами є серйозною загрозою. Фагові інфекції є шкідливими при промислових молочних або оцтовокислих ферментаціях, де рідкий стан середовища забезпечує швидке поширення вірусних частинок. Незважаючи на те, що поширення фага всередині закваски утруднено, ймовірно, через напіврідкий агрегатний стан матриксу, фаги лактобактерій вже виділені із зразків закваски і доведено, що вірусна інфекція може передаватися від одного продукту до іншого. Цікаво, що поширення фагу в закваску не вплинуло ні на підкислення, ні збільшення об'єму, ні на зниження кількості лактобактерій [31].

Фаги можуть бути найпоширенішими формами життя на Землі з глобальною популяцією близько 10³¹ року. Значна кількість даних секвенування генерується проектами фагового геному та шляхом відбору зразків ДНК у навколишньому середовищі. Власне, оскільки фаги є основними переносниками феноменів генного обміну, вони вважаються найважливішими чинниками еволюції у прокариотів. На сьогоднішній день перевірені послідовності геному 16 бактеріофагів *Lactobacillus* (включаючи профаги) доступні в базі даних еталонних послідовностей Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) (RefSeq). Наявність цих даних дає змогу порівняти вірусні геноми, щоб зрозуміти генетичні зв'язки між різними фагами та функцію передбачуваних генів.

У той час як знання про фаги та їх геноми, отримані з молочнокислих бактерій молочного середовища, збільшуються, повідомлення про фаги, що походять від ферментації зернових, все ще рідкісні [32].

1.3 Характеристика судинних рослин, що населяють Антарктику

Антарктичний континент довгий час займав важливе місце в теоріях географії рослин. Наявність масиву суші в Антарктиді, який раніше був приєднаний до інших південних земель і з теплішим кліматом, ніж зараз,

пояснюється деякими широко розрізненими розповсюдженнями судинних рослин, які сьогодні населяють частини Південної Америки, Південної Африки, Австралії, Нової Зеландія та різні острови в Південному океані [33]. Антарктида є найхолоднішим, найсухішим і найвітряннішим континентом на Землі із середньою літньою температурою повітря <0 °C у континентальній Антарктиді та між 0 і 2 °C у морській Антарктиді [34].

Лише дві судинні рослини змогли заселити деякі вільні від льоду та снігу території Антарктичного півострова: щучник антарктичний (*Deschampsia antarctica* É. Desv.) і перлинниця антарктична (*Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl.). Така низька видова різноманітність може бути пов'язана з постійною низькою температурою навіть у літній період. Крім низьких температур, антарктичні рослини повинні бути здатні справлятися з іншими серйозними фізіологічними стресовими факторами, такими як висихання, низька доступність води в ґрунті та висока освітленість. Однак ці фактори зустрічаються і в інших холодних областях земної кулі [35].

Питання про те, чому лише два види судинних рослин колонізували Антарктиду, не має повної відповіді. Унікальне поширення цих видів, включаючи Антарктичний півострів, не пов'язане з наявністю будь-яких специфічних механізмів адаптації до екстремального середовища, а скоріше є результатом поступової адаптації цих таксонів до екстремального середовища.

У морській Антарктиці, уздовж західного узбережжя Антарктичного півострова і на прилеглих островах щільність поширення популяцій обох видів судинних рослин неоднорідна. Їх популяції в основному розташовані в Південних Шотландських островах, в районі між мисом Сієрва та мисом Гарсія та біля затоки Маргеріт.

Дослідження обох видів антарктичних квіткових рослин не виявило жодних ознак, які б дозволили якісно відрізнити їх від інших полярних видів і пояснили б краще виживання цих видів у найбільш несприятливих регіонах на Землі. В цілому їх анатомія характерна для рослин, що населяють посушливі

місця. Листки мають продихи, а їх верхня сторона вкрита товстим шаром воску, що є однією з ознак посухостійких рослин [36].

В цілому фотосинтетична система судинних рослин добре пристосована до життя в умовах низьких температур. Однак у цих антарктичних видів вона стає фотосинтетично неактивною, коли температура падає нижче -2°C , як і в усіх інших судинних рослин.

Унікальне поширення та відповідна адаптація лише двох видів судинних рослин у природній флорі Антарктики залишається загадковою. Вважалося, що можливі підходи до вирішення цієї проблеми лежать у сферах субклітинного та молекулярного рівнів організації рослин із різних популяцій цих видів. Дійсно, комплексні дослідження цих аспектів судинних рослин Антарктики тільки починаються. У той же час різноманітні дані, доступні на сьогоднішній день про ці види, свідчать про те, що причини успіху *Deschampsia antarctica* і *Colobanthus quitensis* пов'язані не з якимись унікальними пристосуваннями, а з історією їх міграції та адаптації до проживання в регіоні [37].

1.3.1 Огляд *Deschampsia antarctica*

Рід *Deschampsia* налічує від 30 до 40 видів, поширених як у Північній, так і в Південній півкулях, більшість з яких є багаторічними, хоча є також група однорічних видів. Вважається, що однорічні рослини з Альп походять від багаторічних предків, які мігрували з рівнин. *D. antarctica* з Південної Америки, суб-Антарктики та морської Антарктики тісно пов'язаний з видами з півдня Аргентини та Чилі. Відмінності полягають у розмірі стебла, листя та частин квітки. Ареал поширення *D. antarctica* охоплює Аргентину, Чилі та Перу. Вид також зустрічається на Вогняній Землі та прилеглих островах, Фолклендських островах, Південній Георгії, Південних Оркнейських островах, Південних Шотландських островах. Він також присутній на одному з островів архіпелагу Південні Сандвічеві острови, а також уздовж західного

узбережжя Антарктичного півострова і прилеглих архіпелагів морської Антарктики, доходючи на південь до затоки Лазарева на острові Олександра [38].

В умовах Антарктики розвиток *D. antarctica* починається в листопаді, коли починається проростання насіння і відновлення торішніх пучків. Вид здатний до вегетативного розмноження шляхом відростання пучка і відщеплення частин пучка. Рослини *D. antarctica* часто утворюють один щільний пучок, площа якого коливається від одного до кількох сотень квадратних метрів. Також задокументовано відмирання рослин у центральних частинах пучка. Вирвана з корінням рослина здатна до відновлення після транспортування в інше відповідне місце. В результаті цієї здатності неодноразово припускали можливість розповсюдження рослин птахами (як будівельного матеріалу для гнізд).

1.3.2 Огляд *Colobanthus quitensis*

Рід *Colobanthus Bartl.* поширений в основному в Південній півкулі. Різні автори наводять різну кількість видів у роді *Colobanthus*. Таким чином, для Південної Америки список варіюється до 13 видів, частина з яких зараз включена в *Colobanthus quinsis*, а решта в *C. subulatus*. З усіх видів роду лише *C. quinsis* зустрічається в морській Антарктиці, знову досягаючи затоки Лазарева на острові Олександра. *C. subulatus* поширений на південь аж до Південної Георгії. Всього рід нараховує до 20 видів. Інші види роду, споріднені *C. quitensis*, зустрічаються на Кергелені з прилеглими островами, а також на островах Херд, Тасманія, Нова Зеландія, субантарктичних островах австралійського сектора, острів Маккуорі, а також на Фолклендських островах, Вогняній Землі та Патагонії. *C. quinsis* відрізняється низкою морфологічних ознак: характером кінчиків листя, шириною листка, відносною довжиною чашолистка та насінної коробочки, кількістю чашолиstkів. Ареал поширення *C. quinsis* охоплює Мексику, високогірні райони Еквадору, Болівії,

Чилі та Перу. Він також присутній на Вогняній Землі, Фолклендських островах, Південній Георгії, Південних Оркнейських островах, Південних Шотландських островах, а також уздовж західного узбережжя Антарктичного півострова з прилеглими архіпелагами [39].

C. quinsis - багаторічна квіткова рослина, яка утворює густі низькі округлі напівкулясті пучки і живе до 35 - 40 років. Ця рослина має стрижневий корінь, майже не здатна до вегетативного розмноження і має вікову структуру, подібну до *D. antarctica*. Вид, у більшості, якщо не у всіх випадках, є самозапильовачем. Його тичинки, розташовані перед маточкою, створюють високу ймовірність клейстогамії, що призводить до інбридингу. Урожай насіння в результаті одного самозапилення досить високий: близько 43 насінин на капсулу у рослин.

Майже немає доказів вегетативного розмноження *C. quinsis*, і всі досліджені популяції, здається, походять із насіння. При сприятливих умовах насіння цього виду здатне зберігатися тривалий час. Дослідження структури популяції *C. quinsis* виявили її надзвичайну нерегулярність. Низькі показники розмноження характерні для антарктичних і високогірних рослин, оскільки успішність насінневого розмноження і виживання розсади сильно обмежені несприятливими кліматичними факторами. На деяких островах репродуктивний успіх *C. quinsis* залежить від умов протягом конкретного року. Цей вид нерегулярно цвіте на Аргентинських островах і в інших місцях морської Антарктики [40].

1.4 Бактеріофаги, що інфікують бактерії рослин

Захворювання рослин, викликані бактеріальними інфекціями, є загально визнаною проблемою. Хвороби рослин, викликані бактеріями, є основною економічною шкодою для сільськогосподарського виробництва. Боротьба з хворобами була серйозною проблемою для багатьох бактеріальних захворювань. Ця проблема є прямим результатом варіабельності патогенів,

високої ймовірності мутації або перенесення генів у патогені при зіткненні з генною резистентністю. Боротьба із захворюваннями найкраще досягається за допомогою інтегрованого підходу до управління шляхом поєднання відповідних культурних практик, хімічних речовин, таких як бактерициди або активатори рослин, де це можливо, інтрогресії генів стійкості рослин і стратегій біологічного контролю [41].

Розвиток стійкості бактерій до фагової інфекції не обов'язково є негативним явищем у контексті фагового біоконтролю. Мутації стійкості до фагів у бактерій часто супроводжуються витратами на придатність, одним із прикладів є зниження вірулентності, що призводить до зниження тяжкості захворювання. Це пояснюється тим фактом, що молекули, які беруть участь у прикріпленні фагів, часто також беруть участь у процесі вірулентності.

Декілька відомих бактеріальних збудників, що впливають на рослини, включають *Pseudomonas syringae*, що спричиняє захворювання плямистістю та виразками; *Agrobacterium tumefaciens*, що викликає коронковий жовч; *Xanthomonas campestris*, що викликає чорну гниль і бактеріальну плямистість листя; *Ralstonia solanacearum* як збудник бактеріального в'янення картоплі; *Xanthomonas oryzae*, що викликає бактеріальний опік рису; *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, що викликає бактеріальний опік маніоки; *Erwinia amylovora* як збудник вогнівки; *Xylella fastidiosa* як збудник хвороби Пірса виноградної лози, різнокольорового хлорозу цитрусових, опіку листя мигдалю; *Dickeya dadantii* як збудник м'якої гнилі та чорної ніжки картоплі; і *Pectobacterium carotovorum* і *P. atrosepticum*, що викликають м'яку гниль і чорну ніжку тощо [42].

Існує низка важливих бактеріальних патогенів рослин, які привернули увагу для фагового біоконтролю, оскільки існуючі підходи мають обмежену ефективність або їх використання обмежене в певних регіонах світу.

1.4.1 *Dickeya* і *Pectobacterium*

І *Dickeya*, і *Pectobacterium* належать до сімейства *Enterobacteriaceae*, які разом можна назвати *Enterobacteriaceae* м'якої гнилі (SRE). Обидва роди характерно виробляють декілька ферментів, що руйнують клітинну стінку, що дозволяє їм проникати та мацерувати рослинну тканину, якою вони харчуються [43].

P. carotovorum ssp carotovorum має широкий діапазон господарів і глобальне поширення, тоді як *P. atrosepticum* зустрічається в основному в помірному кліматі, де діапазон господарів в основному обмежується картоплею. *P. wasabie* та *P. carotovurum ssp. brasiliensis* також вражає картоплю в кількох регіонах світу. Повідомляється, що в Європі *Dickeya dianthicola* дуже важлива для боротьби з хворобами картоплі, хоча останнім часом все частіше виявляють новий вид *Dickeya* під назвою *D. solani* [44].

1.4.2 *Erwinia amylovora*

Erwinia amylovora, член сімейства *Enterobacteriaceae*, є збудником опіку, який є руйнівним захворюванням, яке вражає види рослин сімейства *Rosaceae*. Захворювання було зареєстровано в 40 країнах Північної Америки, Європи, Тихоокеанського регіону та Близького Сходу.

Патогенез зазвичай передбачає потрапляння бактерії в сприйнятливую рослину-господаря через її квітки, але вона також може потрапити в рослину через інші отвори, такі як рани. Потрапляючи в рослину, він здатний пересуватися по внутрішньоклітинному простору паренхіми, де на останніх стадіях може досягати судин ксилеми. За сприятливих умов захворювання може проявлятися у вигляді в'янення, некрозу тканини та відмирання рослини [45].

1.4.3 *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum є грамнегативною ґрунтовою бактерією. Вважається одним із найбільш руйнівних фітопатогенів із діапазоном хазяїв до 200 видів рослин із понад 50 родин. Бактерія дуже гетерогенна, історично поділена на п'ять рас і п'ять біоварів. Вона викликає захворювання економічно важливих культур, наприклад, бактеріальне в'янення тютюну, бананів і помідорів, а також коричневу гниль картоплі.

Інфекція починається з того, що бактерія проникає в рослину-хазяїна через її коріння, де потім колонізує ксилему. Інфекція зазвичай призводить до розвитку пожовтіння рослини, затримки росту, в'янення та смерті, хоча бактерія також здатна до безсимптомних інфекцій [46].

1.4.4 *Pseudomonas syringae*

Бактеріальний фітопатоген *P. syringae* належить до класу гаммапротеобактерій. В даний час вид підрозділяється на більш ніж 50 патоварів, причому різні патовари представляють різні штами з різними діапазонами рослин-господарів. Плями більшості патоварів зазвичай демонструють вузькі діапазони господарів, але є винятки, які інфікують понад 80 видів рослин [47].

Хвороба знижує врожайність, а також впливає на якість плодів. Патогенез бактерії включає вторгнення в рослинну тканину з природних отворів, таких як продихи, де система секреції типу III відіграє головну роль у її вірулентності з вивільненням ефektorів для подолання імунної системи рослин. Вона поширюється зараженим насінням томатів, але також може виживати як епіфіт протягом тривалого періоду часу на поверхнях рослин томатів і розсіюватися під час дощу, що несеться вітром [48].

Pseudomonas aeruginosa є грамнегативним умовно-патогенним бактеріальним патогеном, який часто присутній у різноманітних середовищах, таких як вода, ґрунт і рослини, здатний інфікувати різні організми, включаючи

рослини, тварин і людей. Ця умовно-патогенна бактерія є однією з найпоширеніших причин захворювань рослин [49].

На сьогоднішній день встановлено, що більшість відомих фагів, націлених на рід *Pseudomonas*, належать до порядку *Caudovirales*, який включає три родини дволанцюгових ДНК фагів, що відрізняються характеристиками фагового хвоста: *Podoviridae*, з коротким і нескоротливим хвостом; *Myoviridae*, з довгим і скоротливим хвостом, і *Siphoviridae*, з довгим і нескоротливим хвостом. На даний момент секвеновано лише 8 безхвостих видів фагів *Pseudomonas*: 2 належать до родини *Inoviridae* (фаги одноланцюгової ДНК, 2 належать до родини *Leviviridae*, і 4 належать до родини *Cystoviridae* [50].

1.4.5 Вид *Xanthomonas*

Xanthomonas — це великий рід, який належить до класу гаммапротеобактерій, що містить принаймні 27 офіційних видів, багато з яких також мають декілька патоварів. У сукупності рід господарів широкий: заражає близько 400 рослин-господарів, деякі з яких є важливими культурами, такими як рис, банани, помідори та цитрусові. Види та патовари цього роду, як правило, демонструють високий ступінь специфічності як для господаря, так і для тканини, проникаючи в ксилему або міжклітинні простори тканини паренхіми мезофілу [51].

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* є збудником бактеріальної плямистості томатів і перцю, хвороба виявлена в багатьох країнах. Це захворювання томатів може бути дуже важким із втратою врожаю до 50% для помідорів, вирощених як у теплицях, так і на полях у США та Карибському басейні. Хвороба викликається бактерією, яка потрапляє в рослину через продири або рани. Потім бактерії колонізують міжклітинний простір рослини, викликаючи просочені водою пошкодження, які згодом стають некротичними, що може призвести до дефоліації та сильної плямистості плодів [52].

1.4.6 *Xylella fastidiosa*

Xylella fastidiosa належить до класу гамапротеобактерій. Це фітопатоген, обмежений ксилемою, для поширення та зараження рослин-господарів йому потрібні комахи-переносники (наприклад, стрілки). Він спричиняє захворювання ряду культур, таких як виноград, цитрусові, мигдаль, персик і кава. Незважаючи на те, що в основному він містився в Америці, останніми роками його виявили в Європі, спричиняючи захворювання на оливкових деревах. Вважається, що хвороба, спричинена бактерією, спричинена утворенням біоплівки у судинній системі, що обмежує рух поживних речовин і води по рослині [53].

1.4.7 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens є грамнегативною та паличкоподібною бактерією. *S. marcescens* була описана у зв'язку з кількома рослинами, такими як бавовник і кукурудза, рис і сосна. Ця бактерія виявляє антагоністичну дію проти фітопатогенних грибів, а геномне секвенування виявило наявність цікавої моделі систем секреції. Деякі ізоляти *S. marcescens* є умовно-патогенними мікроорганізмами, і більшість порівняльних геномних досліджень цього виду зосереджувалися виключно на його клінічній значущості. Порівняльний аналіз комах і клінічних ізолятів *S. marcescens* виявив значне генетичне різноманіття, що підтверджується відносно низькою внутрішньовидовою середньою нуклеотидною ідентичністю (ANI) 95,1% [54].

Serratia liquefaciens є типовою фітосферною бактерією, яка зустрічається на багатьох рослинах і має корисні протигрибкові властивості [55].

Фаги є біологічними об'єктами, які можуть еволюціонувати та долати біологічні зміни у своїх господарях. У природі завжди існувала постійна гонка між фагом і бактерією. На це вказує той факт, що 10–20% бактеріальних

популяцій у певних середовищах проживання щодня піддаються лізу через фагову інфекцію. У контексті стійкості до фагів виявили, що фаг phi2954 *Pseudomonas syringae* залежав від білка господаря для успішної інфекції. Мутантні штами-господарі без цього білка стійкі до фага. Тим не менш, можна виділити мутанти фага, які стали незалежними від цього білка-хазяїна для інфікування. Фаги можуть еволюціонувати, щоб подолати стійкість до фагів у цільових бактеріях, і їх назвали Н-мутантами. Це дозволило розробити фаги з більш широким діапазоном хазяїв [56].

Існує кілька потенційних переваг використання бактеріофагів для контролю захворювань:

1. Фаги самовідтворюються та самообмежують; вони реплікуються лише до тих пір, поки бактерія-хазяїн присутня в навколишньому середовищі, але швидко деградує за її відсутності.

2. Фаги є природними компонентами біосфери; їх можна легко виділити звідусіль, де присутні бактерії, включаючи ґрунт, воду, рослини, тварин і тіло людини.

3. Фаги можуть бути спрямовані проти бактеріальних рецепторів, які необхідні для патогенезу, тому вірулентність резистентних мутантів знижується.

4. Фаги нетоксичні для еукаріотичної клітини.

5. Фаги є специфічними, усуваючи лише цільові бактерії, не пошкоджуючи інших, можливо корисних, представників місцевої флори.

6. Фагові препарати досить прості та недорогі у виготовленні [57].

1.5 Літичний та лізогенний шляхи розвитку бактеріофагів

Бактеріофаги, або фаги, є вірусами членів домену *Bacteria*. Ці віруси відіграють численні ролі у формуванні різноманітності мікробних спільнот, вплив яких різниться залежно від того, які стратегії зараження використовують конкретні фаги. З прикладної точки зору, це особливі

спільноти, що містять небажані або патогенні бактерії, які можна модифікувати за допомогою фаг-опосередкованого бактеріального біоконтролю, тобто за допомогою фаготерапії [58]. Дослідники прагнуть класифікувати фаги з точки зору їх стратегій зараження, а також переглянути або запропонувати більш описову, точну або відмінну термінологію. Категорії можна диференціювати з точки зору чи відбувається вивільнення віріону (продуктивні інфекції проти лізогенії, псевдолізогенії та/або стану фагоносіїв), спосіб вивільнення віріону (літичне проти хронічного вивільнення) і ступінь, до якої фаги генетично обладнані для відображення лізогенних циклів (фаги помірного та не помірного) [59].

Фаги можна визначити як напівавтономні генетичні елементи, які в певний момент свого життєвого циклу існують як інкапсидовані геноми, зокрема інфекційні капсиди, які не знаходяться в межах клітин-хазяїв. Більшість вірусів можна визначити подібним чином, хоча особливо грибові віруси (міковіруси) не обов'язково існують у вигляді неасоційованих з хазяїном віріонів або, у деяких випадках, навіть як інкапсидовані геноми.

Фаги, з точки зору їх інкапсидзації та розташування, можуть існувати в трьох можливих станах: внутрішньоклітинно та не інкапсидовані, внутрішньоклітинні та упаковані у зрілих віріонах або інкапсидовані та позаклітинні. Перший стан можна далі розділити на те, що можна описати як «вегетативну фазу», або продуктивний цикл, проти існуючого як профаг, що натомість демонструє лізогенний цикл. Другий стан можна відрізнити від фагових геномів, які замість цього не упаковуються до етапу вивільнення віріону. Третій стан складається з вільних фагів, тобто зібраних віріонів, які більше не знаходяться в їх бактеріальному хазяїні [60].

Використання фрази «літичний або лізогенний» як засіб розрізнення типів фагів може ставати все більш поширеним. Частина проблеми з використанням фрази «літичний або лізогенний» полягає в тому, що бактерії можуть бути лізогенними, тоді як фаги можуть бути помірними, але не

навпаки. Лізогенія — це спадкова здатність продукувати бактеріофаг. Лізогенна бактерія - це бактерія, яка володіє і передає здатність продукувати бактеріофаг. Кожна бактерія лізогенного штаму дає початок лізогенному клону. Спроможність лізогенізувати є властивістю помірних фагів. Переважна більшість помірних фагів, крім того, демонструють «літичні» цикли при продуктивному зараженні, тобто замість хронічного вивільнення нащадків віріонів, звідси термін, «лізогенний», щоб описати їх.

Уявлення про бактеріальні віруси в минулому впливали здебільшого з точної роботи, проведеної з фагами, нездатними встановити лізогенний стан. Зараз швидко зростає інформація про лізогенні бактерії [61].

Було запропоновано називати помірними (на відміну від вірулентних) фаги, які здатні встановити лізогенний стан у своїх клітинах-хазяїнах. Мутації, що перетворюють помірний фаг у вірулентний, є звичайним явищем і спостерігалися з усіма добре вивченими фагами помірного клімату.

Хоча більшість фагів помірного клімату під час продуктивних циклів вивільняють віріони шляхом лізису, тобто під час літичних циклів, проте, цілком ймовірно, передбачуване використання «літичного» в «літичному або лізогенному», тобто літичні, не помірні фаги. Однак термін «вірулентний» часто використовується переважно замість «літичний, не помірний», тому можна використовувати «вірулентний або лізогенний», а не «літичний або лізогенний» [62].

Описані вище бактеріофаги, як правило, лізують уражені ними бактерії, і тому їх називають вірулентними. Деякі фаги уражають бактерії, але не розмножуються в них автономно і не викликають лізису. Такі фаги називаються помірними, а бактерії, яких вони інфікували – лізогенними. Уперше лізогенія з використанням сучасних термінів була описана у кінці 40-х років ХХ ст. А. Львовим, який працював в Інституті Пастера у Парижі. Молекулярна природа лізогенії була відкрита у дослідженнях, проведених з фагом λ . Розмноження помірних фагів проходить синхронно з розмноженням

бактерії. Лише дуже рідко, в одній з 102 –105 таких лізогенних бактерій, фаг починає спонтанно розмножуватися, і клітина піддається лізису. У цьому разі, щоб виявити вихід інфекційного фага, як індикатор потрібен інший бактеріальний штам, для якого цей фаг є вірулентним. Якщо змішати лізогенні та надлишок індикаторних бактерій і посіяти цю суміш на агаризоване середовище, то будуть рости і лізогенні, і індикаторні бактерії. Проте час від часу деякі клітини лізогенних бактерій будуть лізуватися, і фагові частини, які з них виходять, будуть уражати чутливі клітини індикаторних бактерій. Це буде супроводжуватись появою бляшок у суцільному бактеріальному газоні. Але у середині кожної такої бляшки збережеться колонія лізогенної бактерії. Лізогенним бактеріям притаманна потенційна здатність продукувати фаги, але цю здатність не можна виявити ні морфологічно, ні серологічно. Фаг у такому інфекційному стані, який передається дочірнім бактеріальним клітинам у процесі поділу, називається профагом. Подібно до інших ознак бактеріальної клітини наявність у ній профага успадковується. Оскільки все потомство лізогенної бактерії також є лізогенним, профаг, очевидно, повинен реплікуватися синхронно і регулярно разом з хромосоною бактерії [63].

Лізогенні бактерії є імунними (стійкими) до зараження тими фагами, які в них містяться у вигляді профага. Такий забезпечуваний фагами імунітет зумовлений не неможливістю адсорбції (як за стійкості до вірулентних фагів), а утворенням особливого цитоплазматичного білка-репресора, який перешкоджає розмноженню вегетативних фагів. Цей самий репресор перешкоджає зворотному переходу профага у вегетативний стан і пригнічує синтез фагових білків. Отже, виникнення лізогенного стану пов'язане з утворенням репресорного білка.

1.6 Механізми захисту бактерій від інфікування бактеріофагами

Наука пробує приручити фаги, використовуючи досить успішно в боротьбі з деякими бактеріями. Фаги, як і всі віруси - внутрішньоклітинні

паразити, адже існувати вони можуть тільки за рахунок бактеріальної клітини, самостійно вони не виробляють енергію, не синтезують білок, не розмножуються поза бактеріальної клітини. Бактеріофаги специфічні: бувають моновалентними (тобто вражають тільки один вид бактерій), типовими (вражають обрані штами всередині виду), полівалентними (вражають різні бактерії) [64].

Фаги бувають вірулентними або помірними, це залежить від способу проникнення в клітину нуклеїнової кислоти фага і механізму реплікації для виробництва потомства. Але у бактерій є механізми, якими вони захищаються, перешкоджаючи проникненню чужорідної ДНК. На сьогоднішній день вивчено 5 видів захисту бактерій від вірусів:

1 – Підміна бактеріального клітинного рецептора. Бактерії змінюють рецептори в залежності від оточуючих мікроорганізмів навколо себе, від доступності поживних речовин.

2 – Недопущення множинного інфікування. Фаг проникає в клітину двома шляхами: літичним з швидкою загибеллю зараженої бактерії і вивільненням нових вірусів і лізогенним, коли генетичний матеріал вірусу реплікується тільки разом з бактеріальною ДНК, не вбиваючи саму клітину.

В цьому випадку вступає в силу “біологічна недоцільність” зараження клітини іншим вірусом, і самі фаги перешкоджають іншим вірусам. В результаті такі бактерії отримують навіть переваги.

3 – Система руйнування всієї «чужої» неметильованої ДНК.

Ферментний захист від вірусів за допомогою генів, що кодують два ферменти – рестриктазу і метилазу.

4 – Система абортівної інфекції. Іноді клітина знищує себе разом з прониклим вірусом, це не рятує саму клітку, але зупиняє поширення вірусів, що вигідно для всієї популяції.

5 – Система CRISPR/Cas. З її допомогою бактерії здатні «записувати» у власний геном і передавати потомству інформацію про фаги, з якими вони стикалися протягом життя [65].

Наявність таких «спогадів» дозволяє розпізнавати ДНК фага і ефективніше протистояти йому при повторних інфекціях. Вона базується на «запам'ятовуванні» патогенів. Саме ця властивість бактеріального захисту стала основою для технології редагування генома CRISPR/Cas9 [66].

Висновки до розділу 1

Розглянуто характеристику основних молочнокислих бактерій, що використовуються у виробництві молочнокислої продукції, в тому числі представників родів *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*. Ці види молочнокислих бактерій належать до численних родів родини *Lactobacillaceae*. Вони є потенційними мікроорганізмами і широко застосовуються в ферментації харчових продуктів у всьому світі через їх добре відомий статус як загально визнаних безпечних мікроорганізмів (GRAS). Вони також визнані за їх ферментаційну здатність і, таким чином, підвищують безпеку харчових продуктів, покращуючи органолептичні властивості, збагачуючи поживними речовинами та підвищуючи користь для здоров'я.

Однак існує загроза бактеріофагічного забруднення молочних та молочнокислих продуктів через зараження LAB бактеріофагами. Зараз вони визнані найбільш переважаючими біологічними істотами на нашій планеті. Фаги є облігатними паразитами, і більшість циклів розмноження фагів закінчуються лізисом клітин і вивільненням сотень нових віріонів, готових інфікувати сусідні клітини. Біотехнологічний процес, який базується на використанні бактерій для виробництва молекули або продукту, може бути порушений фагами. Про проблеми, пов'язані з наявністю фагів, повідомлялося в харчовій, хімічній, фармацевтичній, кормовій та пестицидній промисловості. Проте молочна промисловість, ймовірно, є тією, в якій проблеми з фагами є найбільш задокументованими.

Останнім часом зростає інтерес до розробки різноманітних кисломолочних продуктів для інших корисних цілей, зокрема для цілей здоров'я та запобігання потраплянню токсинів, що виробляються харчовими патогенами та бактеріями псування. Такі механізми захисту бактерій від інфікування бактеріофагами в майбутньому дозволять люду зберігати якість продукції та її властивості.

Також необхідно додатково зменшити можливість фагової контамінації. Перспективними заходами запобігання розвитку фагової інфекції та забезпечення стабільності біотехнологічних процесів на виробництві є:

- 1) постійний моніторинг за наявністю бактеріофагів;
- 2) використання багатоштамових бактеріальних композицій та ротація штамів через певний період часу; використання фагостійких штамів;
- 3) дотримання вимог термообробки сировини, дезінфекції обладнання та загального санітарно–гігієнічного рівня виробництва.

Було знайдено підходи для подолання деяких із цих обмежень за допомогою формул захисту від ультрафіолетового випромінювання та визначення часу застосування фагів до культур. Окрім застосувань для біоконтролю, існує також хороший потенціал для діагностики на основі фагів для патогенних бактерій рослин з високою чутливістю, спрямованої саме на життєздатні бактерії [42].

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МЕТА ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Характеристика об'єкту дослідження

Об'єктом дослідження є бактеріофаг, виділений з ґрунту України, а саме з ґрунту клумби Святошинського району з під рослини гортензії – *Hydrangea* spp. Для виділення фагів використовували зразки харчових продуктів. Також, для виділення фагів з навколишнього середовища використовували зразки ґрунту, відібрані на території України та Антарктики.

2.1.1 Особливості об'єкту дослідження

Бактеріофаги здатні інфікувати лише клітини прокариот і не можуть інфікувати більш складні еукаріотичні організми через кардинальні відмінності будови клітинних оболонок і внутрішньоклітинних молекулярних процесів.

Бактеріофаги поширені в ґрунті, морській і річковій воді, стоках. Їх виділяють із клінічного матеріалу від хворих (гній, фекалії та ін.). Вони є майже у всіх видів бактерій. Активність бактеріофагів за певних умов проявляється у вигляді лізису (руйнування) клітин своїх хазяїнів.

Фагам притаманні виражені паразитичні властивості, що обумовлюють їх існування і розмноження тільки в культурах гомологічних мікроорганізмів. На цій основі наявність бактеріофага можна розглядати як непрямий показник інфікованості досліджуваного матеріалу відповідним мікробом.

На практиці виявлення бактеріофага здійснюють у тому випадку, коли виділення культури бактерій не дає позитивного результату, наприклад, внаслідок надзвичайно малої кількості мікроорганізмів у досліджуваному матеріалі або в разі сильного забруднення його сторонньою мікрофлорою.

2.2 Характеристика предмету дослідження

Предмет дослідження — антибактеріальний та протиплівкоутворювальний потенціали бактеріофагів, виділених з ґрунту та продуктів харчування. В роботі для дослідження і оцінки антибактеріального та протиплівкоутворювального потенціалу бактеріофагу були використані такі штами бактерій: штами молочнокислих бактерій *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, ізольований ендоситний штам з *Deschampsia antarctica* 26.7, а також *Bacillus subtilis*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas aeruginosa* 01, *Rhodococcus erythropolis*, *Escherichia coli* K12.

2.3 Методи дослідження

В роботі використовували класичні методи виділення бактеріофагів з навколишнього середовища. Визначали титр фагів методом титрування за Апельманом та Грація. Також, для виділеного фагу було проведено визначення антибактеріальної активності проти ряду бактеріальних штамів. Всі дослідження були проведені в трьох повторностях. Результати представлені у вигляді медіани та інтерквартильного розкиду. Достовірність отриманих результатів перевірена за допомогою відповідних статистичних методів.

2.3.1 Прямий метод виявлення бактеріофага

Прямий метод виділення бактеріофагів полягає у культивуванні зразків в умовах, оптимальних для вирощування чутливих до них бактерій. В якості зразків використовували харчові продукти і зразки ґрунту, відібрані на території України та Антарктики. Методика полягає в наступному: 1 г наважки зразку вносять у колбу об'ємом 50 мл, яка містить 0,1 М фосфатний буфер, рН 7,0. Вміст колби перемішують на шейкері протягом 15 хв при 37°C для зразків харчової продукції та 28°C для зразків ґрунту, потім при кімнатній температурі зразки відстоюють для того, щоб осіли частки зразка. З надосадової рідини

відбирають 2 мл і вносять у 3 мл стерильного живильного середовища – MRS бульйон (de Man, Rogosa та Sharpe бульйон) або ПБ (поживний бульйон). Посіви інкубують у термостаті за температури +37 °С або +29 °С протягом 18 – 20 год.

Після інкубації посіви фільтрують через паперовий, а потім бактеріальний фільтри з розмірами пор 0,22 мкм. Одержані фільтрати досліджують на наявність бактеріофага на щільному поживному середовищі. Як тест-культури використовували штами бактерій різних видів: *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus* для виявлення бактеріофагів у продуктах харчування та ізольований ендоефітний штам з *D. antarctica* 26.7, *B. subtilis*, *A. xylosoxidans*, *P. aeruginosa*, *R. erythropolis* та *E. coli* K12.

2.3.2 Виявлення бактеріофага на твердому середовищі

Для виявлення фагів на твердому середовищі використовують фільтрати, отримані в пункті 2.3.1. Для виявлення бактеріофагів з харчової молочно-кислої продукції використовують середовище MRS (1,4%), а для виявлення бактеріофагів з ґрунту - СПА (сухий поживний агар, 1,4%). Середовище розплавляють на водяній бані та розливають у чашки Петрі (більш висока концентрація агару пригнічує розвиток негативних колоній бактеріофага). Добре підсушені чашки з агаром засівають 3 – 6-годинною бульйонною культурою (ізольований ендоефітний штам з *D. antarctica* 26.7, *B. subtilis*, *A. xylosoxidans*, *P. aeruginosa* 01, *R. erythropolis* *E. coli* K12) або змивом з добової агарової культури (*L. fermentum*, *L. acidophilus*) бактерій, гомологічних шуканому фагу. Для отримання суцільного росту 100 мкл культури, нанесені в центр чашки, розтирають шпателем Дригальського рівномірно по всій її площі. Потім 30 – 40 хв підсушують чашку при 37°С або 28°С, накривши стерильним паперовим фільтром.

Чашку розділяють на сектори або квадрати і на підсушену поверхню засіяної бактеріальної культури по секторах наносять краплями по 5 мкл

досліджувані фільтрати. Після того, як рідина просочиться в середовище, чашки перевертають догори дном і ставлять у термостат за 37°C на 18 – 24 год.

Облік результатів: доказом наявності бактеріофага служить повна відсутність росту культури в місці потрапляння краплі фільтрату (активний бактеріофаг) або поява в цій ділянці дрібних стерильних плям-колоній бактеріофага (бактеріофаг слабкої активності).

Для збереження зразків фагів, негативні колонії в стерильних умовах виколують скальпелем з чашки Петрі та поміщають у фізіологічний розчин. Пробірки зі шматками агару в фізіологічному розчині витримують 30 хв при температурі 4-8°C. Після інкубації за температури холодильника рідини переносять у чисту пробірку і зберігають при 4-8°C протягом 3 місяців.

Для отриманих з різних зразків фільтратів як тест-культури використовують *L. fermentum*, *L. acidophilus* для виявлення бактеріофагів у продуктах харчування та ізольований ендofітний штам з *D. antarctica* 26.7, *B. subtilis*, *A. xylosoxidans*, *P. aeruginosa* 01, *R. erythropolis* та *E. coli* K12 для аналізу наявності фагів у ґрунтах.

2.3.3 Титрування фагів методом spot-тесту

В стерильній 96-лунковій платі проводять титрування отриманих зразків фагів. Для цього в 12 лунок вносять по 90 мкл стерильного фізіологічного розчину. Далі, в першу лунку вносять 10 мкл досліджуваного зразку і ретельно піпетують. Переносять 10 мкл рідини з першої лунку в другу та знову піпетують. Дану процедуру повторюють до 12-ї лунки. З останньої лунки 10 мкл рідини забирають.

На водяній бані розплавляють щільне поживне середовище MRS, та СПА. Розливають в чашки Петрі по 10 мл і витримують до повного застигання. Далі на водяній бані розплавляють напіврідке середовище MRS (0,7%), та СПА (0,7%). Розплавлене середовище розливають у стерильні автоклавовані пробірки по 5 мл і поміщають на водяну баню при 50°C. Добові культури *L.*

fermentum та *L. acidophilus* змивають фізіологічним розчином. Бульйонні культури з ізолюваного ендofітного штаму з *D. antarctica* 26.7, *B. subtilis*, *A. xylosoxidans*, *P. aeruginosa* 01, *R. erythropolis* та *E. coli* K12 використовують в оригінальній концентрації без розведень. Для засіву чутливої культури методом подвійних агарових шарів беруть пробірку з відповідним розплавленим напіврідким середовищем і охолоджують її перемішуючими рухами до температури 38-42°C. Далі, в пробірку вносять 500 мкл змиву або бульйонної культури відповідно до досліджуваного зразка. Перемішують суспензію та виливають на нижній агар, рівномірно розподіляючи суспензію по поверхні. Чашки Петрі інкубують при кімнатній температурі до повного застигання агару.

Чашки Петрі підсушують при 28°C та 37°C відповідно до чутливої культури протягом 30 хвилин. Далі, чашки розмежують маркером на дні чашки Петрі на 12 зон. Вносять по 5 мкл відповідного розведення в кожену зону одним носиком, починаючи від найбільшого до найменшого розведення (від 10^{-12} до 10^{-1}). Чашки інкубують протягом 18-24 год при 28°C або 37°C відповідно до чутливої культури. Після інкубації, враховують результати та визначають титр фага.

Для збереження зразків фагів, негативні колонії в стерильних умовах виколують скальпелем з чашки Петрі та поміщають у фізіологічний розчин. Пробірки зі шматками агару в фізіологічному розчині витримують 30 хв при температурі 4-8°C. Після інкубації за температури холодильника рідини переносять у чисту пробірку і зберігають при 4-8°C протягом 3 місяців.

2.3.4 Титрування фагів за методом Грація

Живильні середовища готують напередодні постановки досліду. У чашки Петрі розливають MRS (1,4%-й) або СПА (1,4%-й) в кількості 10 мл. Чашки із середовищем накривають стерильним фільтрувальним папером і підсушують 30 хв у термостаті при 37°C. Підготовлене середовище повинно

бути абсолютно сухим, тому що навіть незначне зволоження може змінити кількісні показники вмісту фагових частинок у досліджуваній рідині.

Напіврідкий MRS (0,7%-й) або СПА (0,7%-й) відповідно, розлитий у пробірки по 5 мл і простерилізований у них, може бути приготований за декілька днів до постановки досліду. Перед використанням цей агар витримують на водяній бані за температури +50 °С.

В стерильній 96-лунковій платі проводять титрування отриманих зразків фагів. Для цього в 12 лунок вносять по 90 мкл стерильного фізіологічного розчину. Далі, в першу лунку вносять 10 мкл досліджуваного зразку і ретельно піпетують. Переносять 10 мкл рідини з першої лунку в другу та знову піпетують. Дану процедуру повторюють до 12-ї лунки. З останньої лунки 10 мкл рідини забирають. Потім у пробірки з 0,7%-м середовищем MRS або СПА, розплавленим у водяній бані і охолодженим до температури 38 – 42°C, доливають по 100 мкл кожного з розведень титрованого фага у відповідну пробірку.

У кожену пробірку вносять по 100 мкл гомологічної до фага культури. Вміст пробірки ретельно перемішують, перекочуючи її між долонями, і виливають на чашки Петрі із шаром щільного агару, рівномірно розподіляючи суміш по його поверхні. Після охолодження чашки Петрі інкубують протягом 18-24 год при 28°C або 37°C відповідно до чутливої культури. Після інкубації, враховують результати та визначають титр фага..

Титр фага визначають шляхом підрахунку кількості негативних колоній на паралельних чашках і множення середнього значення на показник розведення.

2.3.5 Титрування фагів за методом Апельмана

Для експерименту беруть чисту лінію фага, виділену методом спот-тесту. Дванадцять пробірок, що містять по 4,5 мл ПБ або MRS бульйон, ставлять у штатив у ряд. У першу пробірку стерильною піпеткою вносять 0,5

мл досліджуваного концентрату фага. Вміст пробірки перемішують новою піпеткою і 0,5 мл рідини переносять у другу пробірку, з другої – в третю і так далі до десятої включно. Із десятої пробірки зайві 0,5 мл виливають у дезінфекційний розчин. Одинадцята і дванадцята пробірки – контрольні.

Кожне перенесення рідини з однієї пробірки в іншу здійснюють окремою стерильною піпеткою місткістю 1 мл. Таким чином, у 10 пробірках отримують розведення бактеріофага від 10^{-1} до 10^{-10} .

У всі 10 пробірок приготованого ряду розведень вносять по 0,1 мл суспензії змиву добової агарової або бульйонної культури, яка містить $1 \cdot 10^9$ мікробних клітин у 1 мл (відповідність стандарту каламутності 10 од.). Використовують бактерії, гомологічні титрованому фагу. Додана суспензія клітин не повинна містити стійких до фагу клітин.

Одинадцята пробірка – контроль культури. Вона містить 5 мл бульйону і 0,1 мл бактеріальної культури. Дванадцята пробірка – контроль на стерильність, містить 5 мл бульйону без додавання бактерій і фага. Усі пробірки струшують, штатив із ними поміщають у термостат і інкубують за температури 28°C або 37° відповідно до чутливої культури 18 – 20 год.

Облік результатів проводять одразу після інкубації. Титром вважають те максимальне розведення бактеріофага, за якого спостерігається повний лізис чутливої до нього культури. Практично це відповідає останній пробірці в ряді, у якій бульйон ще залишатиметься абсолютно прозорим.

Титрування фагів за Апельманом також проводилося мікрометодом. Для цього використовували 96-лункові планшети. В лунки вносили по 90 мкл відповідного рідкого середовища ПБ. Далі, проводили титрування фагів: в першу лунку вносили 10 мкл фагу, піпетували та переносили в другу лунку та знову піпетували. Дану процедуру проводили до 8-ї лунки, звідки 10 мкл суспензії забирали. Далі, до кожної лунки вносили по 10 мкл бульйонних культур. Паралельно готували контрольні лунки, в які не вносили фаг, а лише бульйонну культуру. Планшети інкубували 24 або 48 год та використовували

для визначення сили плівок, відсотку живих клітин та антиадгезивної активності зразку фагу.

2.3.6 Дослідження оптичної густини за допомогою спектрофотометра

В роботі використовують зразки отримані при титруванні фага за методом Апельмана у пробірках або мікрометодом у 96-лункових чашках Петрі.

В першу кювету вливають 2,5-3 мл контрольного зразку (дистильована вода) і поміщають у кюветний відділ. В другу кювету влити аналогічний об'єм досліджуваного зразку і помістити у кюветний відділ. Після цього встановлюють довжину хвилі, яка відповідає верхній або нижній границі досліджуваного діапазону. Вимірюють оптичну густину досліджуваного зразку відносно контрольного. Після виміру дістають кювету із досліджуваним зразком, промивають її дистильованою водою і підсушують за допомогою фільтрувального паперу. Таким чином вимірюють оптичну густину всіх дослідних зразків.

2.3.7 Визначення сили біоплівки

Для досліду використовують зразки отримані при титруванні фага за методом Апельмана у пробірках або мікрометодом у 96-лункових чашках Петрі. В роботі визначали силу добових і 2-денних плівок.

Для обрахунку міцності біоплівки використовують скляні кульки діаметром 2 мм. За допомогою пінцета в кожну лунку опускають по одній скляній кульці і спостерігають чи вона залишилась на поверхні, чи опустилась на дно. У випадку, якщо кулька затримується на біоплівці, до неї додають ще одну скляну кульку. Дану процедуру проводять до тих пір, поки кульки не почнуть опускатись на дно.

В результати вносять лише ту кількість кульок, яка тримались на

поверхні біоплівки до моменту її розриву.

2.3.8 Визначення антибактеріальної дії фага

Для визначення антибактеріальної дії фага визначали кількість живих бактерій в суспензії – використовували метод із використанням резауринату натрію. Для досліду використовують проінкубовані 96-лункові планшети, отримані в пункті 2.3.5.

В кожному лунку плашки вносять по 100 мкл розчину резауринату натрію в кінцевій концентрації 11,2 мкМ/мл. Після цього плашку поміщають в термостат при 37°C і залишають на 40 хв до зміни кольору суспензії з фіолетового на рожевий.

Оптичну густину зразків вимірювали за допомогою мікропланшетного рідера з вертикальним променем при довжинах хвиль 568 нм та 620 нм. Отримані значення оптичної густини зразків були використанні для обрахунку кількості живих клітин відносно контролю (лунок, до яких була внесена лише бактеріальна культура).

Для визначення титру бактеріофага використовували метод підрахунку титру за Рідом і Менчем, описаний формулою 2.1:

$$\log ED_{50} = \log B - \left[\frac{(b-50)}{(b-a)} \right] \cdot \log d \quad (2.1)$$

де, $\log B$ – логарифм титру фага, при якому кількість живих клітин більше, ніж 50 %, b – кількість живих клітин при $\log B$, a – кількість живих клітин в зразку, в якому дане значення менше 50%, $\log d$ – крок розведення.

2.3.9 Антиадгезивна дія

Для визначення антиадгезивних властивостей фага використовували метод із використанням спиртового розчину кристалічного фіолетового. Для досліду використовують проінкубовані 96-лункові планшети, отримані в пункті 2.3.5. Плашку обережно промивають під проточною водою і

підсушують за допомогою фільтрувального паперу.

В кожну лунку плашки вносять по 100 мкл розчину спиртового кристалічного фіолетового та інкубують 5 хв. Після інкубації фарбника його відбирають з лунок плашки. Планшети промивають від надлишку фарбика. Для розчинення адсорбованого на адгезованих клітинах фарбника вносять до лунок по 100 мкл 70%-го розчину спирту.

Оптичну густину зразків вимірювали за допомогою мікропланшетного рідера з вертикальним променем при довжині хвилі 568 нм. Отримані значення оптичної густини зразків були використанні для обрахунку кількості адгезованих клітин відносно контролю (лунок, до яких була внесена лише бактеріальна культура).

2.3.10 Статистичний аналіз

В роботі, всі результати представлені у вигляді медіани та інтерквартильного розкиду. Для обробки результатів було використано програмне забезпечення Microsoft Office Excel 2016. Для оцінки правильності нульової гіпотези застосовували непараметричні методи статистичного аналізу. Для малих вибірок значень, таких, як ми отримали в роботі, використали статистичний метод порівняння залежних пар Вілкоксона.

Висновки до розділу 2

Прямий метод виділення бактеріофага ґрунтується на фільтруванні досліджуваного матеріалу. Твердий досліджуваний матеріал (зразки ґрунту, харчові продукти) попередньо подрібнюють у ступці, емульгують, фільтрують через паперовий, потім через бактеріальний фільтри. Наявність фага в отриманому фільтраті визначають на щільних чи рідких живильних середовищах.

Поява прозорих колоній на твердому середовищі чи просвітлення рідкого середовища в ході культивування фільтрату з культурою гомологічних бактерій вказує на наявність у матеріалі відповідного фага.

Якісні методи визначення бактеріофагів передбачають встановлення факту наявності фага в досліджуваному зразку та рівня його активності щодо до тест- культури, а також дозволяють зробити попередній висновок про вміст бактеріофага в матеріалі за ефективністю просвітлення рідкого живильного середовища або за щільністю росту на твердому середовищі.

Використання твердого середовища дозволяє якісно визначити бактеріофаг у багатьох зразках одночасно. Для досліду достатньо однієї чашки Петрі з оптимальним для тест-культури живильним середовищем, на яке її висівають. Потім чашку ділять на сектори, на кожен із яких наносять фільтрати з різних досліджуваних зразків. Слід підкреслити, що у відфільтрованих досліджуваних зразках найчастіше міститься невелика кількість фагів. З урахуванням цієї обставини застосовують методи збагачення, зокрема спот-тест.

Чашки з плямами лізису використовують для отримання концентрованих препаратів окремих видів бактеріальних вірусів. Однак слід зазначити, що зразок може містити субпопуляції декількох видів фагів, тому виникає потреба в одержанні чистих ліній фагів, специфічних для певних бактерій.

Після виявлення бактеріофага в досліджуваному матеріалі необхідно

визначити його кількісний вміст або, як прийнято говорити, знайти титр фага. Для вираження титру бактеріофага можна застосовувати два показники: кількість активних частинок бактеріофага, що містяться у 1 мл досліджуваного матеріалу, або величину найбільшого розведення, за якого бактеріофаг проявляє свою літичну дію.

Для титрування бактеріофага існують різні методи, однак найбільшого поширення набули титрування в рідких живильних середовищах, яке запропонував Апельман, і метод агарових шарів Грація – титрування на твердих середовищах.

Титр бактеріофага можна визначити за ступенем максимального розведення досліджуваного фаголізату, за якого ще спостерігається повний лізис чутливої до нього бактеріальної культури. Отриману величину виражають негативним десятковим логарифмом, де степінь вказує на розведення фага. Такий спосіб титрування проводять у рідкому середовищі за методом Апельмана. Застосування цього методу недороге і не потребує спеціальних навичок, але очікувані результати не дають кількісної достовірності про інфекційний титр фагової суспензії, як за методом агарових шарів.

Метод Апельмана заснований на внесенні різних кількостей титрованого бактеріофага в бульйон, засіяний однією і тією ж дозою культури гомологічних мікробів, з метою отримання феномена бактеріофагії.

Фотометричне вимірювання є базовим принципом роботи для багатьох приладів, що використовуються в клінічній хімії. Основними причинами цього є простота вимірювання, задовільні точність і надійність, а також зручність фотометричних методик при їх застосування в автоматичних приладах.

Здатність до утворення біоплівки залежить від адгезійних властивостей власне вірусу. Одним із факторів, які впливають на формування мікробної біоплівки є властивості поверхні технологічного устаткування. Дослідження

властивостей біоплівки встановили, що здатність мікроорганізмів приєднуватися до поверхні залежить від фізико-хімічної структури поверхні.

Існує кілька методів кількісного визначення бактеріальних клітин, кожен з яких має переваги та недоліки. Найпоширенішим методом є бактеріальний посів, перевага якого полягає в тому, що він дозволяє оцінювати живі клітини за допомогою підрахунку колонієутворюючих одиниць, але не підходить для високопродуктивного скринінгу. З іншого боку, спектрофотометрія адаптована до застосувань високопродуктивного скринінгу, але не розрізняє мертві та живі бактерії та має низьку чутливість.

Всі дослідження проводили з використанням сучасних та робочих методів. Всі результати є достовірними, оскільки був проведений відповідний статистичний аналіз.

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Результати дослідів

Для експериментів, в якості досліджуваних зразків, були використані різноманітні продукти, як то: кефір, йогурт, сметана, деякі види сирів, квашені огірки, морква, капуста, а також зразки ґрунтів, відібрані з різних місць України та Антарктики. Як тест-культури використовували штами бактерій різних видів: *L. fermentum*, *L. acidophilus* для виявлення бактеріофагів у продуктах харчування та ізольований ендоефітний штам з *D. antarctica* 26.7, *B. subtilis*, *A. xylooxidans*, *P. aeruginosa* 01, *R. erythropolis* і *E. coli* K12 для аналізу наявності фагів у ґрунтах.

3.1.1 Прямий метод виявлення бактеріофага

Для контролю наявності бактеріофагів проводили візуальне виявлення негативних колоній на поверхні твердого живильного середовища. Всі зразки (див. Рис.3.1) одну добу культивували в умовах, оптимальних для вирощування чутливих бактерій.



Рис.3.1 Дослідні зразки

Отримані зразки через добу після інкубації у відповідних сприятливих до чутливих культур умовах було очищені методом подвійної фільтрації спочатку через паперовий автоклавований фільтр, а потім через мембранний бактеріальний фільтр з розмірами пор 0,22 мкм. Отримані зразки були використані на наступному етапі роботи.

3.1.2 Виявлення бактеріофага на твердому середовищі

Для виявлення фагів на твердому середовищі використовували фільтрати з пункту 3.1.1. Виділення бактеріофага проводили за методом, описаном в пункті 2.3.2. Для достовірності отриманих результатів наносили по 5 мкл отриманого зразку на 9 секторів чашки Петрі з відповідною чутливою бактеріальною культурою.

Серед всіх досліджуваних штамів бактерій вдалося виділити фаг проти культури ендоситного штаму з *D. antarctica* 26.7 (Рис.3.2).

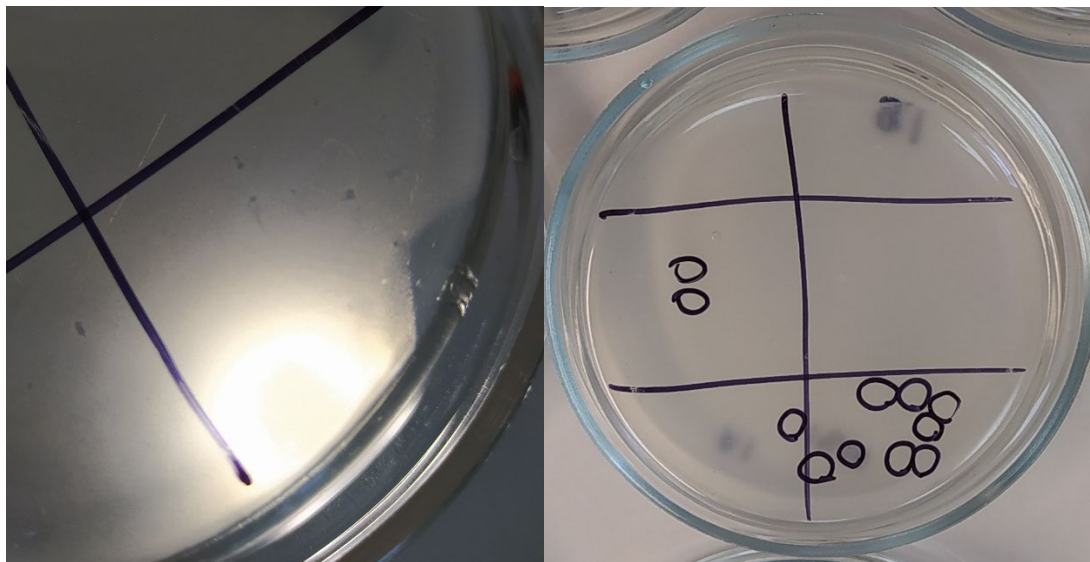


Рис.3.2 Негативні колонії на чашці Петрі з культурою ендоситного штаму з *D. antarctica* 26.7

Наявність фагу була оцінена візуально по наявності негативних колоній на поверхні суцільного шару бактерії. Отримані негативні колонії були

вирізані з товщою агару та поміщені у фізіологічних розчин. Отримана суспензія фагу була використана для подальших досліджень.

3.1.3 Титрування фагу методом spot-тесту

Отримана у попередньому пункті суспензія фага була використана для визначення титру досліджуваного фага. Результати титрування наведені на Рис.3.3 (негативні колонії – візуальний результат наявності фагу).

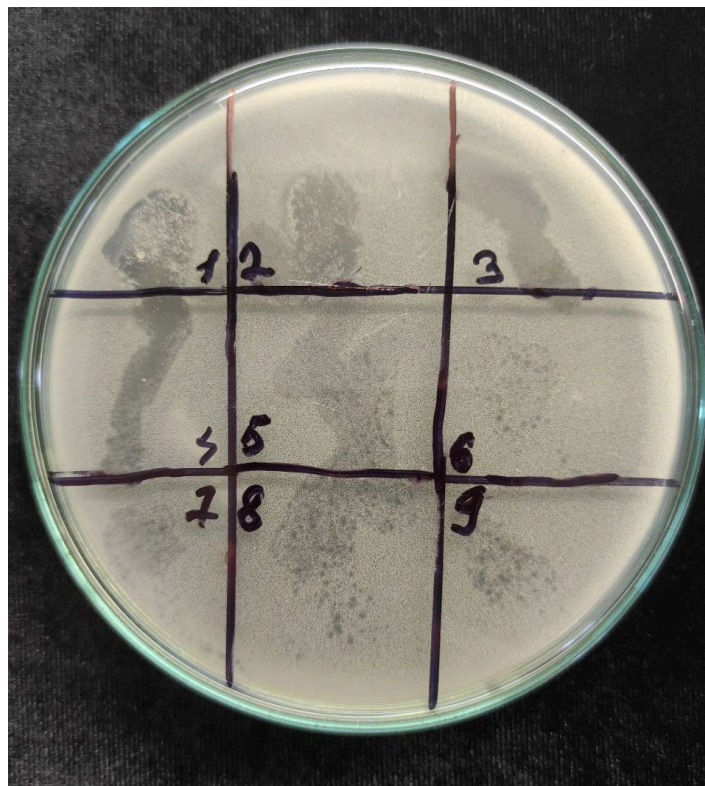


Рис.3.3 Результати spot-тесту з ендоефітним штамом з *D. antarctica* 26.7

Серед всіх досліджуваних зразків виділений фаг проти ендоефітного штаму з *D. antarctica* 26.7, виявився активним(див. Рис.3.3). Логарифм титру фагу складає більше, ніж 9, що відповідає титру 10^{10} фагових часток у 1 мл фаголізату. Отримані результати є попередніми, тому для більш точного визначення титру фага були використані інші методи.

3.1.4 Титрування фагів за методом Грація

Для проведення обліку результатів дослідження, заснованого на титруванні фагів за методом Грація, відібрали такі чашки Петрі, на яких виявлено ізольовані негативні колонії фага (прозорі плями) (Рис. 3.4). Для визначення кількості частинок фага в 1 мл вихідного матеріалу користувались формулою:

$$n = y \cdot x, \quad (3.1.)$$

де n – число частинок; y – кількість колоній фага, x – розведення фага.

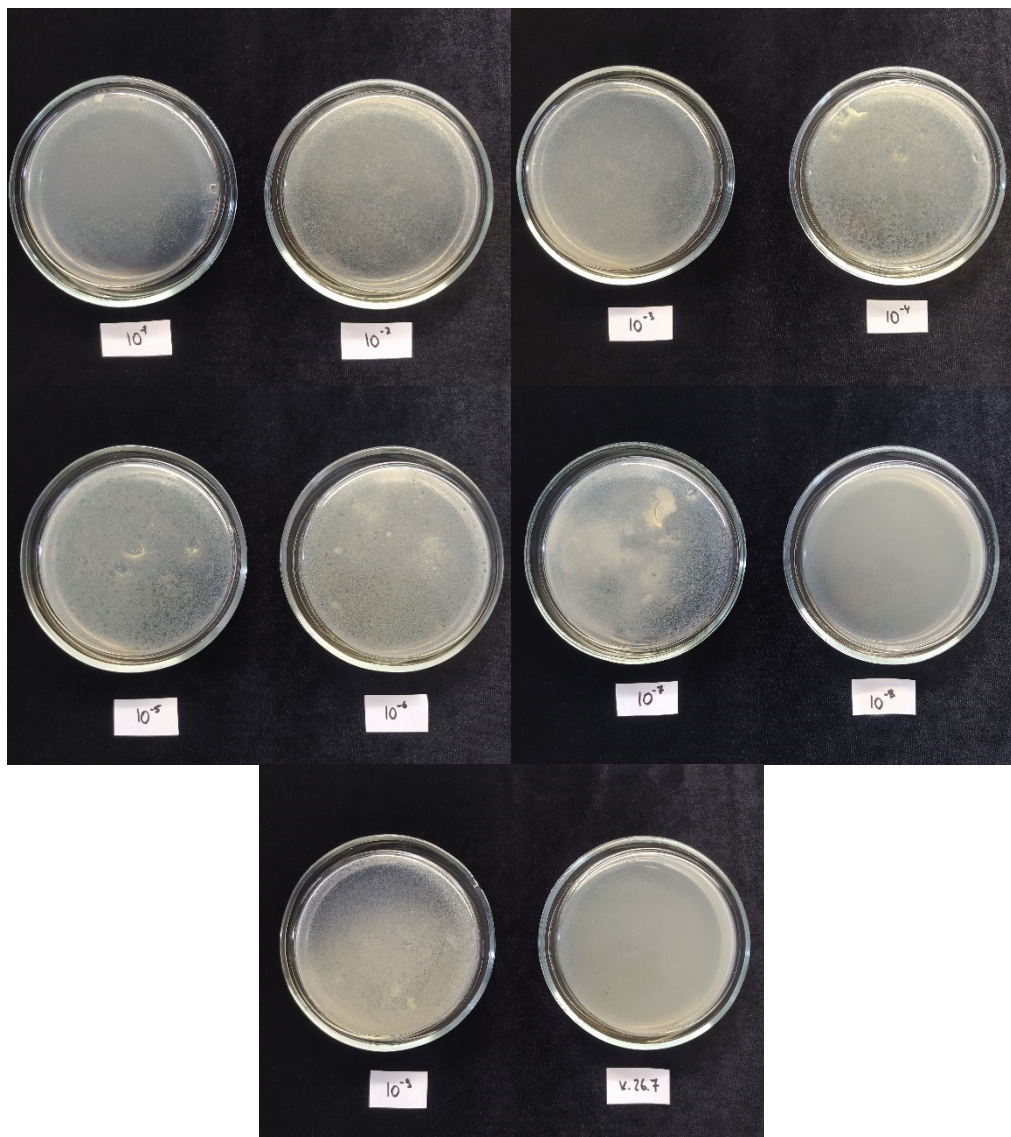


Рис.3.4 Титрування фагів за методом Грація на тест-культурі ендоефітного штаму з *D. antarctica* 26.7

У чашках з розведенням фагу 10^{-1} - 10^{-5} виросло багато ізольованих негативних колоній, що унеможливило їх підрахунок (див. Рис.3.4).

У чашці з розведенням фагу 10^{-6} виросло 37 БУО. Після обрахування визначили, що титр фаголізату дорівнює $3,7 \cdot 10^7$ фагових часток у 1 мл (Рис.3.4.).

У чашці з розведенням фагу 10^{-7} виросло 15 БУО, що свідчить про наявність $1,5 \cdot 10^8$ фагових часток у 1 мл фаголізату.

Чашки з розведеннями фагу 10^{-8} та 10^{-9} не мають негативних колоній та виглядають так само, як і контроль бактеріальної культури.

3.1.5 Титрування фагів за методом Апельмана

Облік результатів провели одразу після добової інкубації. У пробірці "КК", куди була внесена лише бактеріальна культура – спостерігається помутніння середовища; у пробірці "КБ", куди вносили фаг стерильний, середовище прозоре (Рис.3.7).



Рис.3.7 Титрування фагів за методом Апельмана

Оскільки в контрольних пробірках усе гаразд, ураховували результат у дослідних пробірках, починаючи з 1-ї. У пробірках, де фаг достатньо активний, поживне середовище залишається прозорим – фаг спричинив лізис культури. У пробірках, де міститься занадто розведений фаг і нездатний розчинити культуру мікроорганізмів, спостерігається помутніння поживних середовищ за рахунок розмноження культури.

3.1.6 Дослідження оптичної густини за допомогою спектрофотометра

Для опосередкованої оцінки кількості бактеріальних клітин при дії фагу на тест-культуру ендofітного штаму з *D. antarctica* 26.7 використали метод спектрофотометрії та виміряли оптичну густину зразків при 600 нм. Отримані результати використали для обчислення відсотку живих клітин (Рис.3.8).

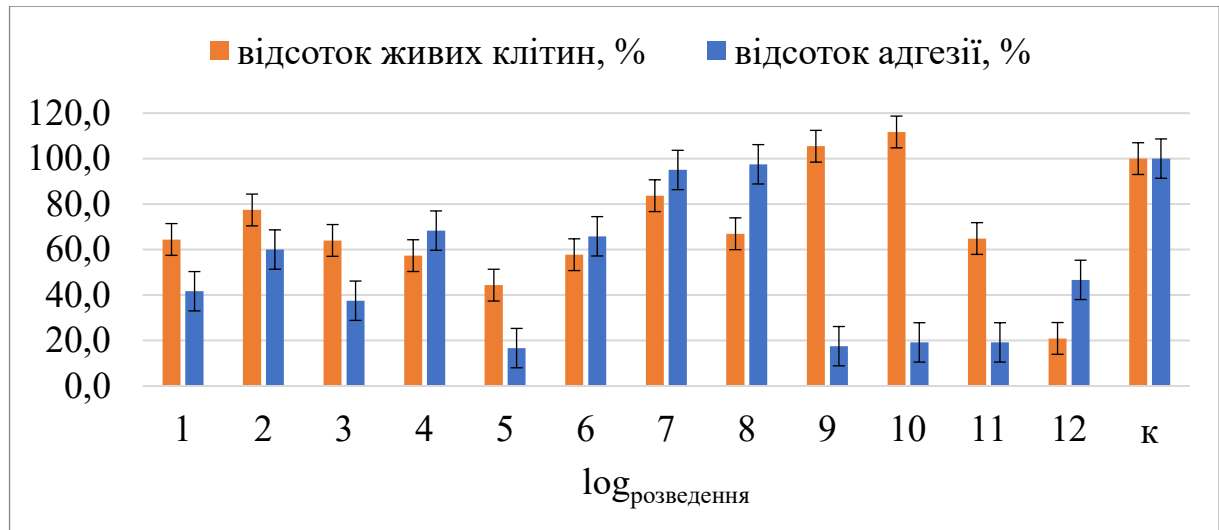


Рис.3.8 Вживаність клітин та адгезивна активність ендofітного штаму з *D. antarctica* 26.7 при бактеріофагічній інфекції

Після вимірювання оптичної густини при 600 нм, зразки були використані для визначення адгезивної активності. Для цього, пробірки звільнили від культури, вносили по 5 мл спиртового розчину кристалічного

фіолетового та проводили фарбування адгезованих клітин протягом 10 хвилин. Після завершення інкубації, фарбник забирали, залишки фарбника відмивали дистильованою водою, після чого адсорбований барвник розчиняли 70%-м розчином етанолу. Проводили вимірювання зразків при 568 нм. Результати представлені у відсотках адгезованих клітин (Рис.3.8).

Аналіз отриманих результатів показав, що є певна залежність між титром бактеріофагу і відсотком живих клітин. Варто зазначити, що в розведеннях 11 та 12 спостерігається менший відсоток живих клітин, що може вказувати на перехід більшої біомаси бактеріальних клітин в біоплівку. Цікаво, що здатність до адгезії при цьому дещо втрачається. На даному етапі, можна сказати, що титр бактеріофагу проти ендofітного штаму з *D. antarctica* 26.7 досягає логарифму 5. Варто зазначити, що саме при логарифмі розведення 5 здатність клітин до адгезії втрачається найбільше. Отримані результати потребують розширення та доповнення, саме тому був використаний мікрометод для визначення описаних показників.

3.1.7 Визначення сили біоплівок

Визначення сили біоплівок проводили з використанням скляних кульок діаметром 2 мм. Результати підрахунку кількості кульок, необхідних для розриву біоплівки представлені у вигляді медіани з інтерквартильним розкидом.

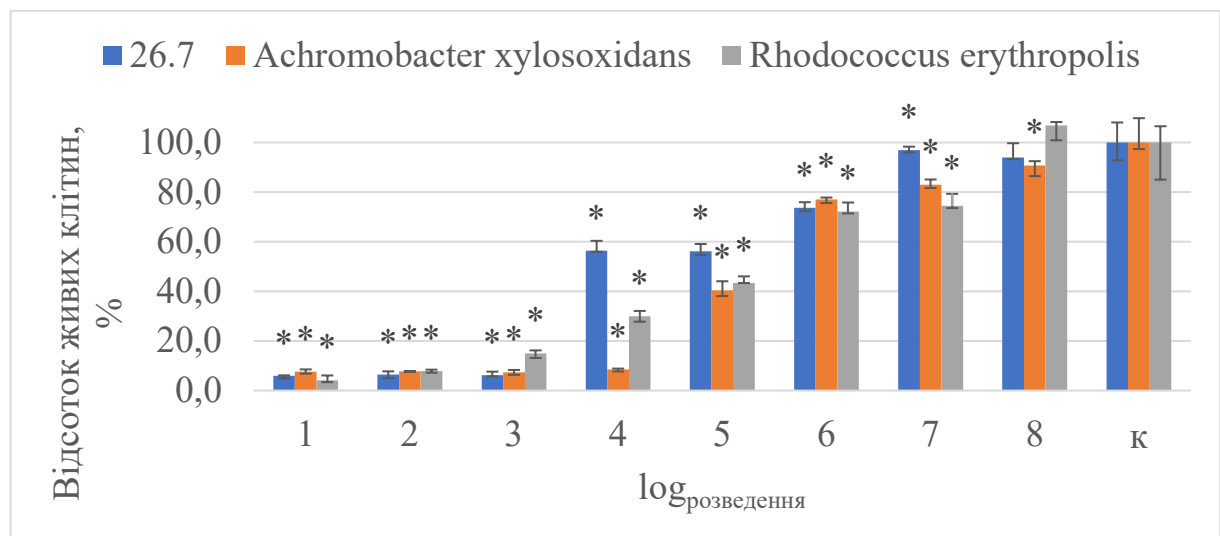
Було виявлено, що і добові, і 2-денні культури майже не формують біоплівок як в присутності фага, так і в контрольних зразках. Зразок, до якого був внесений виділений фаг в титрі 10^{-1} на культурі *Bacillus subtilis*, мав сформовану біоплівку у кількості кульок 1,1 [10,5; 17,5]. Також зразки на тест-культурі ендofітного штаму з *D. antarctica* 26.7 продемонстрували наступні результати: в пробірках з фагом в титрі 10^{-1} – 1 кулька, 10^{-6} – 4 кульки, 10^{-7} – 1 кулька, 10^{-9} – 2 кульки, 10^{-11} – 1 кулька, 10^{-12} – 1 кулька.

3.1.8 Дослідження антибактеріальної дії досліджуваного фага

Для визначення кількості живих бактерій в суспензії використовували метод із використанням резазуринату натрію. Для досліду використовують проінкубовані 96-лункові планшети, отримані в пункті 2.3.5.

Визначали кількість живих клітин у відсотках проти контролю – бактерії, що вирощувалися на відповідному середовищі ПБ без додавання фагів. Визначали антибактеріальну дію фагу проти ряду бактеріальних штамів: ендofітний штам з *D. antarctica* 26.7, *B. subtilis*, *A. xylosoxidans*, *P. aeruginosa* 01, *R. erythropolis* і *E. coli* K12.

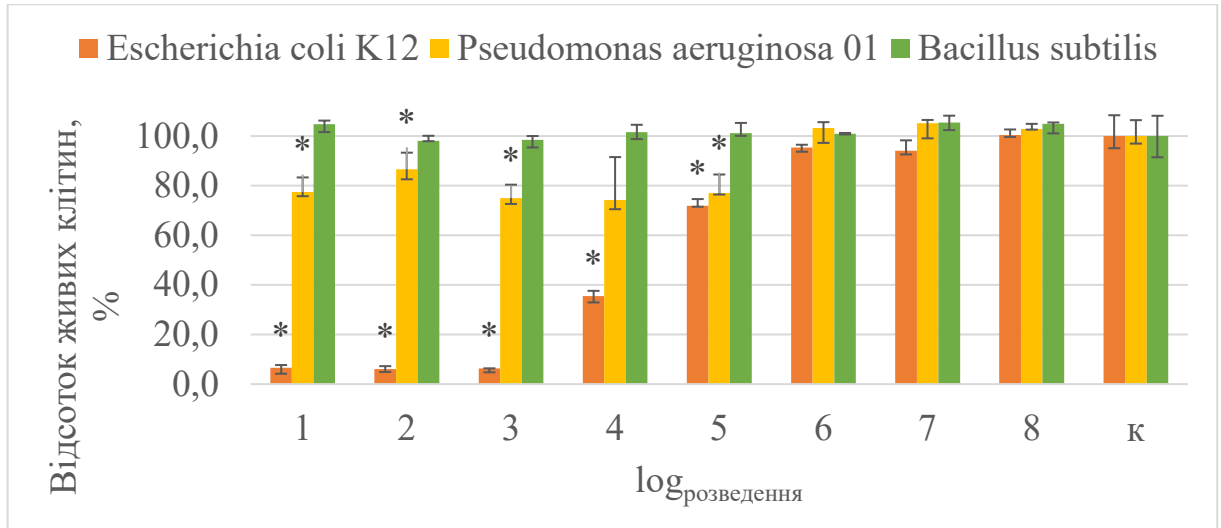
Найефективнішу антибактеріальну дію досліджений фаг проявив проти культур ендofітного штаму з *D. antarctica* 26.7, *A. xylosoxidans*, *R. erythropolis* і *E. coli* K12 (Рис. 3.9 та Рис. 3.10).



* – $p \leq 0.05$

Рис. 3.9 Визначення антибактеріальної активності фагу проти одностенних культур ендofітного штаму з *D. antarctica* 26.7, *A. xylosoxidans* та *R. erythropolis*

Логарифм титру фагу проти бактерій ізольованого ендofітного штаму з *D. antarctica* 26.7, *A. xylosoxidans* та *R. erythropolis* склав 3,9 [3,8; 3,9], 5,3 [5,2; 5,3] та 5,2 [5,1; 5,2] відповідно.

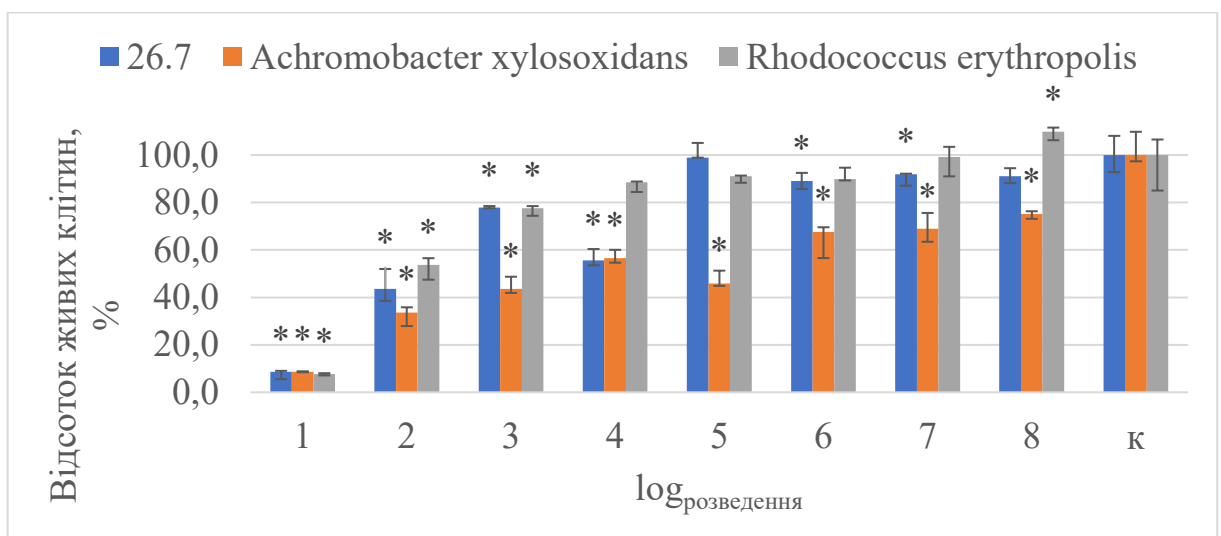


* – $p \leq 0.05$

Рис. 3.10 Визначення антибактеріальної активності фагу проти одноденних культур *E. coli* K12, *P. aeruginosa* 01, *B. subtilis*

Логарифм титру досліджуваного фагу проти *E. coli* K12 складає 4,3 [4,2; 4,3]. Досліджуваний фаг не проявив ніякої антибактеріальної дії проти *B. subtilis* та *P. aeruginosa* 01 після однієї доби інкубації з досліджуваним фагом.

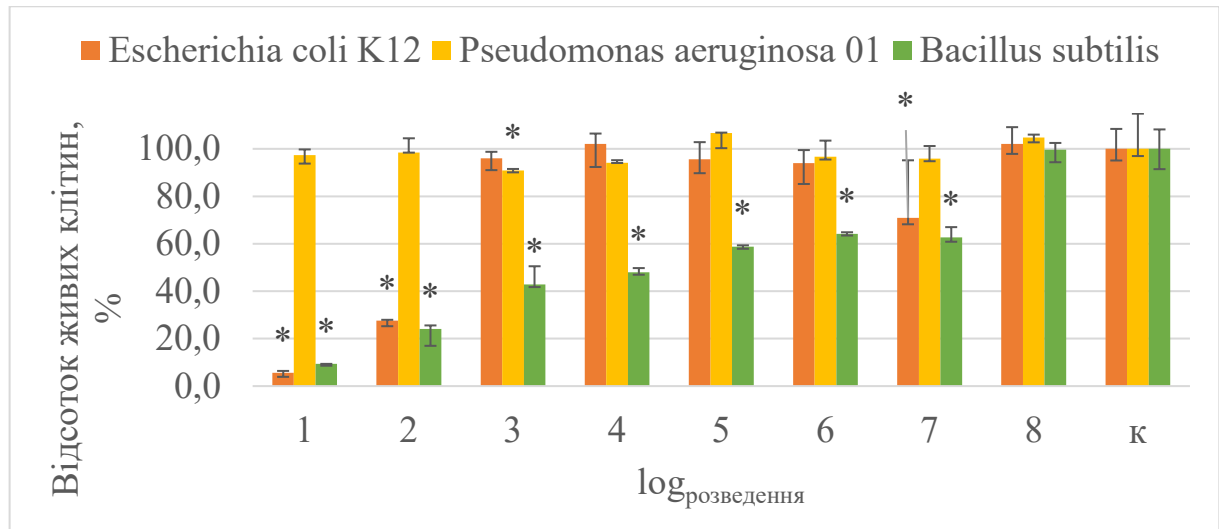
Наступний етап роботи був дослідити антибактеріальну дію проти дводобових культур бактерій (Рис.3.11 та Рис. 3.12).



* – $p \leq 0.05$

Рис. 3.11 Визначення кількості живих бактерій дводенних культур

Логарифм титру фагу на культурах ендофітного штаму з *D. antarctica* 26.7, *A. xylosoxidans* та *R. erythropolis* складає 2,2 [1,8; 2,3], 3,6 [3,2; 3,6] та 1,9 [1,9; 2,1] відповідно.



* – $p \leq 0.05$

Рис. 3.12 Визначення кількості живих бактерій дводенних культур

Логарифм титру фага проти *B. subtilis* та *E. coli* K12 складає 4,2 [3,5; 4,3] та 2,3 [2,3; 2,4]. Антибактеріальної дії проти *P. aeruginosa* 01 досліджуваний фаг не проявив ні на одnodенній, ні на дводенній культурі.

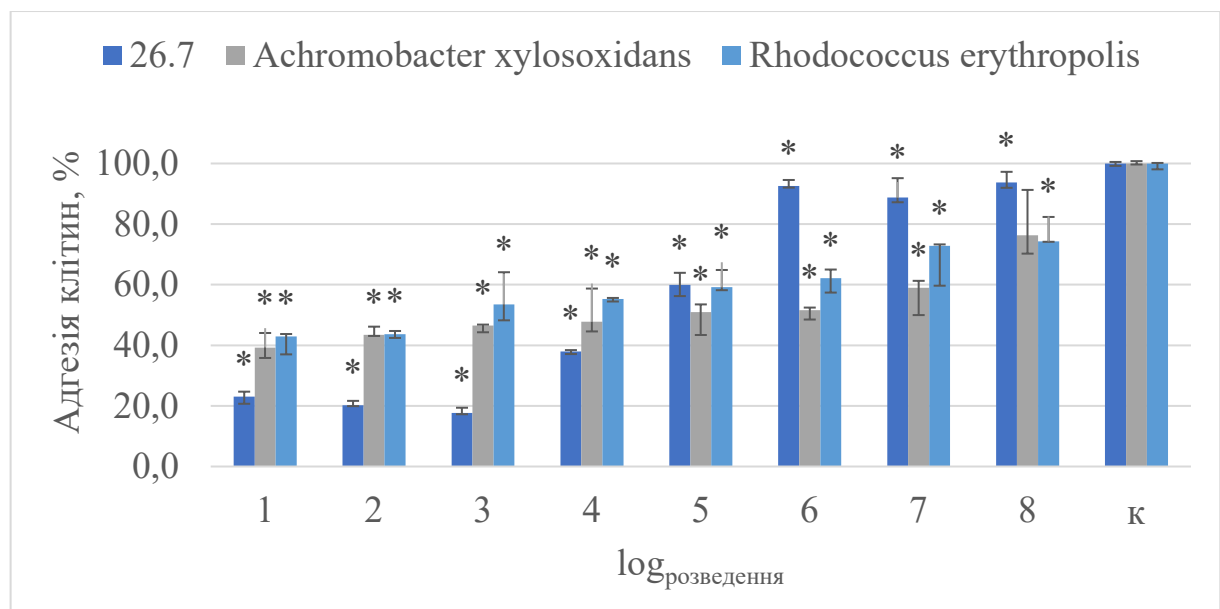
Досліджуваний фаг проявляє різну антибактеріальну активність на одnodенних та дводенних культурах. Так, логарифм титру фагу на культурах ізольованого ендофітного штаму з *D. antarctica* 26.7, *A. xylosoxidans*, , *R. erythropolis* і *E. coli* K12 на другий день культивування знизився на 43,6%, 58,6%, 58,0% та 49,8% відповідно. Тобто, ефективність антибактеріальної дії досліджуваного фагу знизилася на другу добу майже в половину.

Однак, проти культури *B. subtilis* на першу добу культивування не було виявлено антибактеріальної дії, проте на другу добу досліджуваний фаг виявив достатньо ефективну антибактеріальну дію. Отримані результати можуть бути пояснені особливістю розвитку вірусної інфекції саме на культурі *B. subtilis*, що потребує додаткових досліджень.

3.1.9 Антиадгезивна дія досліджуваного фага

Для визначення антиадгезивних властивостей фага використовували метод із використанням спиртового розчину кристалічного фіолетового. Дослідження проводились на одно- та дводенних культурах.

При дослідженні впливу досліджуваного фага на адгезивну здатність одноденних бактеріальних культур ендofітного штаму з *D. antarctica* 26.7, *A. xylosoxidans* та *R. erythropolis* було встановлено, що найменшу адгезивну активність культури проявляли при логарифмі титру фага 1-5 (Рис. 3.13).



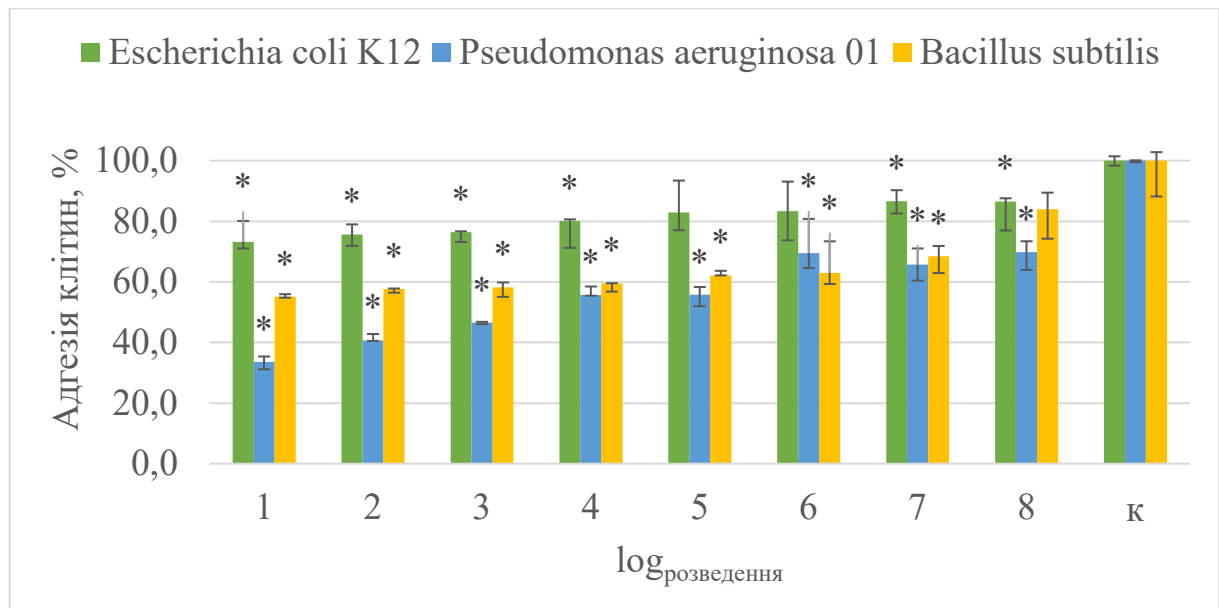
* – $p \leq 0.05$

Рис. 3.13 Визначення антиадгезивних властивостей фага проти добових культур ендofітного штаму з *D. antarctica* 26.7, *A. xylosoxidans* та *R. erythropolis*

Для всіх культур ендofітного штаму з *D. antarctica* 26.7, *A. xylosoxidans* та *R. erythropolis* адгезія клітин збільшувалася з більшим логарифмом титру фагу (більшим розведенням або меншою концентрацією фагу в культуральній рідині) – від 17,6% до 93,8%. Найбільший вплив на адгезивну активність бактеріальних клітин досліджуваній фаг проявляє на ендofітному штамі з *D.*

antarctica 26.7 – відсоток адгезованих клітин на одnodенній культурі складає при логарифмі фагу від 1 до 3 23,0 [20,7; 24,7]%, 20,2 [19,9; 21,7]% та 17,6 [17,2; 19,4]% відповідно.

Також, майже у всіх досліджуваних розведеннях фаг впливає на антиадгезивну здатність клітин бактерій *B. subtilis*, *P. aeruginosa* 01 і *E. coli* K12 (Рис. 3.14).

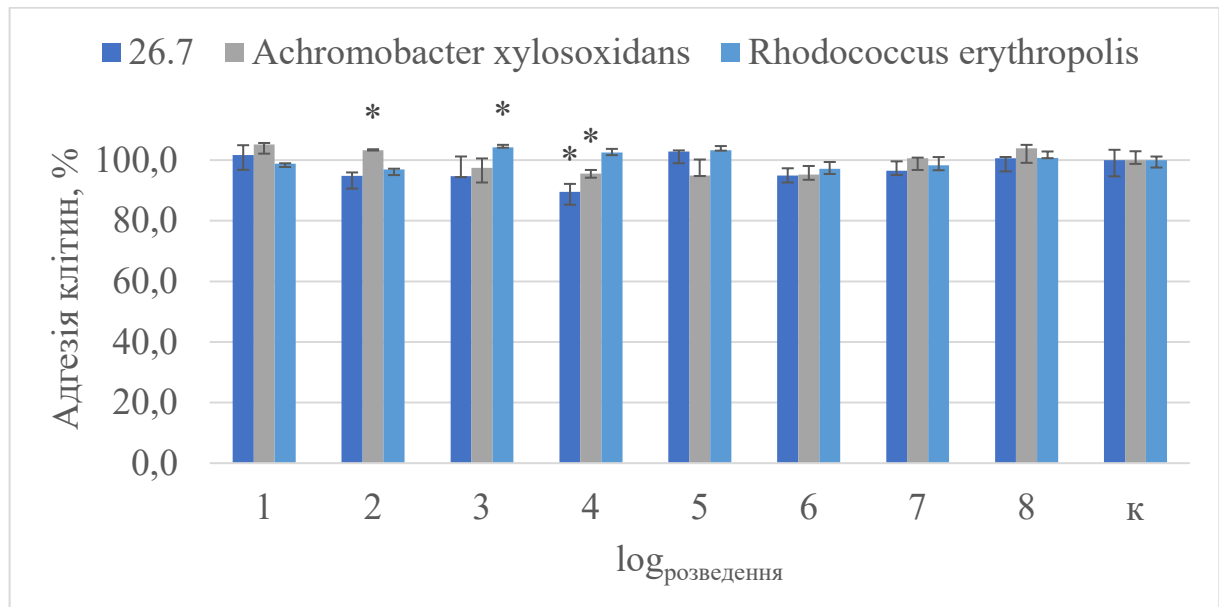


* – $p \leq 0.05$

Рис. 3.14. Визначення антиадгезивних властивостей проти одnodенних культур *B. subtilis*, *P. aeruginosa* 01 і *E. coli* K12

Варто зазначити, що для культур *B. subtilis*, *P. aeruginosa* 01 і *E. coli* K12 антиадгезивна активність досліджуваного фагу дещо менша – в середньому відсоток адгезії для всіх штамів бактерій складає від 33,6% до 86,6%.

Наступний етап дослідження – встановити антиадгезивний потенціал досліджуваного фагу проти дводенних культур. Результати антиадгезивної дії досліджуваного фагу проти ендодфітного штаму з *D. antarctica* 26.7, *A. xylosoxidans* та *R. erythropolis* наведені на Рис. 3.15. Варто зазначити, що достовірної антиадгезивної активності досліджуваний фаг не проявляє.



* – $p \leq 0.05$

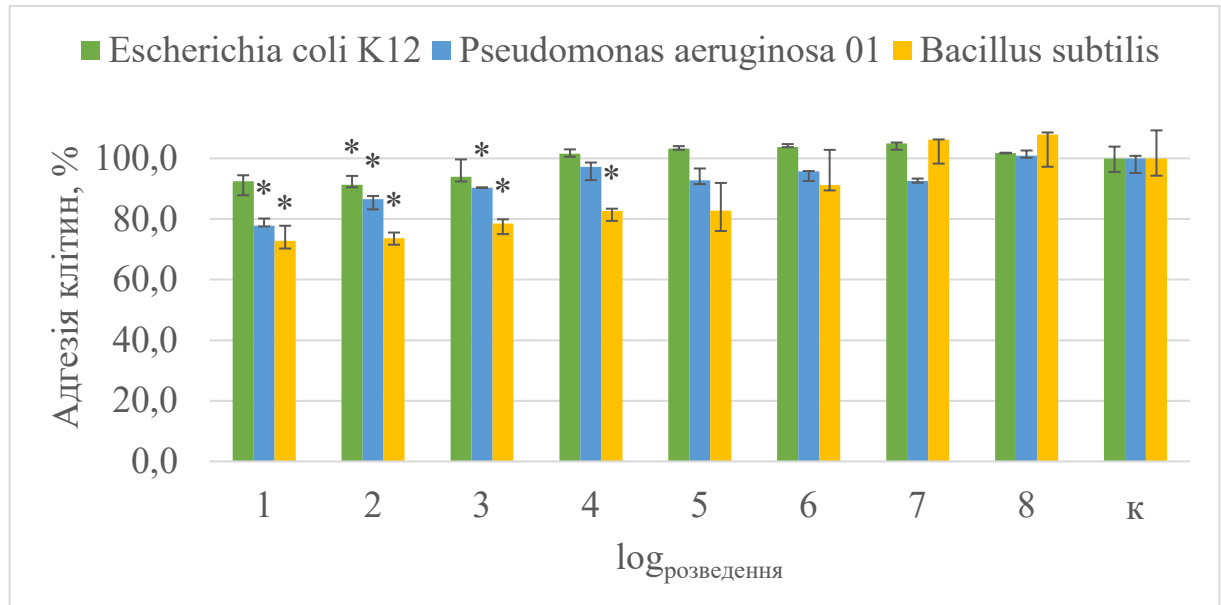
Рис. 3.15. Визначення антиадгезивних властивостей фагу проти дводенних культур ендofітного штаму з *D. antarctica* 26.7, *A. xylosoxidans* та *R. erythropolis*

Незначне зменшення адгезивної властивості бактеріальних клітин досліджуваного фагу проявляє на культурі ендofітного штаму з *D. antarctica* 26.7 в логарифмі розведення 4 – 89,5 [85,3; 92,2]% та на культурі *A. xylosoxidans* також в логарифмі розведення фагу 4 – 95,5 [94,2; 96,8]%.

Отримані результати свідчать про те, що бактеріальні клітини відновлюють свої адгезивні властивості протягом двох діб культивування з досліджуваним фагом. Дана властивість демонструє, що не дивлячись на ефективну антибактеріальну дію, все-одно частина бактеріальних клітин залишиться адгезованими, що може призвести до повторного розвитку бактеріальної інфекції. Дана тенденція також підтверджується зменшенням титру вірусу на другу добу культивування з бактеріальними культурами.

При дослідженні антиадгезивної активності досліджуваного фагу проти дводенних культур *B. subtilis*, *P. aeruginosa* 01 і *E. coli* K12 було показано, що

зменшення адгезивної властивості бактеральних культур спостерігається лише при логарифмі титру фагу 1-3 для культури *P. aeruginosa* 01, 1-4 для культури *B. subtilis* та 2 для культури *E. coli* K12 (Рис. 3.16).



* – $p \leq 0.05$

Рис. 3.16. Визначення антиадгезивних властивостей фагу проти дводенних культур *B. subtilis*, *P. aeruginosa* 01 і *E. coli* K12

Найбільше адгезивну активність бактеріальних клітин досліджуваний фаг зменшує по відношенню до культури *B. subtilis* – від 72,8% до 82,6% в розведеннях фагу від 1 до 4 відповідно.

Аналогічно із дослідженнями по визначенню антибактеріальної дії, вплив фагу на адгезивну активність зменшується на другу добу культивування. Отримані результати демонструють, що отриманий фаг проявляє ефективну антибактеріальну дію, як на першу добу, так і на другу добу культивування з бактеріальними культурами. Вплив на адгезивну здатність бактеріальних клітин фагу значно менший.

Висновки до розділу 3

В роботі для аналізу властивостей бактеріофагів та дослідження антибактеріального та протиплівкоутворювального потенціалу бактеріофагу, виділеного з ґрунту було проведено ряд досліджень визначення властивостей було проведено ряд досліджень з метою вивчення властивостей бактеріофагів та поглиблення знань про них.

Дослідні зразки отримані з продуктів, доступних на ринках та в магазинах України, а також із ґрунтів України і Антарктики, штами з яких наявні в навчальній лабораторії.

В роботі ми відзначили появу негативних колоній на твердому середовищі в процесі дослідження дослідних зразків. Ми достовірно змогли підтвердити наявність бактеріофагу в зразках продуктах харчування і ґрунті, оскільки провели низку дослідів для визначення наявності фагу в зразках і всі вони дали позитивний результат.

В ході досліджень виявлено, що маємо досить активний штам бактеріофагу, виділений з ґрунту Антарктики. Найкраще він культивується на тест-культурах таких як культура ізольованого ендofітного штаму з *D. antarctica* 26.7, *B. subtilis*, *E. coli* K12. На рівні з цим було визначено титр досліджуваного бактеріофага, - а саме 10^{-12} .

В процесі роботи було виявлено, що утворені бактеріофагами біоплівки не мають достатньої сили, щоб утримати навіть одну скляну кульку. Також виявлено пряму залежність антиадгезивних властивостей від наявності в суспензії живих бактерій та часу культивування клітин. Під час дослідження одно- та дводобових культур з'ясували, що чим більшу кількість бактерій містить титр фагу, тим більшу антиадгезивну дію він має.

ВИСНОВКИ

1. З ряду досліджуваних зразків, таких як кефір, йогурт, сметана, деякі види сирів, квашені огірки, морква, капуста, а також зразків ґрунтів, відібраних з різних місць України та Антарктики, було виділено літичний фаг до ендоефітного штаму з *D. antarctica* 26.7.

2. За допомогою методів накопичення фагів на твердому середовищі виділений фаг було накопичено та збережено при 4°C для подальших досліджень. Було проведено визначення титру фагу за методом Апельмана, spot-тесту та Грація – 10^5 , 10^{10} , та $1,5 \cdot 10^8$ фагових часток у 1 мл фаголізату відповідно на чутливій культурі ендоефітного штаму з *D. antarctica* 26.7.

3. Серед всіх досліджених штамів бактерій, було визначено спектр чутливих штамів: ендоефітний штам з *D. antarctica* 26.7, *A. xylosoxidans*, *R. erythropolis* і *E. coli* K12.

4. Виділений з ґрунту бактеріофаг має такі логарифми титрів проти досліджених чутливих бактерій *D. antarctica* 26.7, *A. xylosoxidans*, *R. erythropolis* і *E. coli* K12: 3,9, 5,3, 5,2 та 4,3 відповідно на добових культурах та 2,2, 3,6, 1,9 та 2,3 відповідно на дводобових культурах, що вказує на ефективну бактеріальну дію бактеріофагу, що зменшується з часом. Логарифм титру фага на культурі *P. aeruginosa* 01 складає 4,2 на дводобовій культурі, що відкриває потенціал використання цієї бактерії саме для профілактики інфекцій викликані *P. aeruginosa*. Виділений фаг зменшує адгезивну здатність бактеріальних клітин ендоефітного штаму з *D. antarctica* 26.7, *B. subtilis*, *A. xylosoxidans*, *P. aeruginosa* 01, *R. erythropolis* і *E. coli* K12 до 4 логарифму розведення бактеріофагу на одноденних культурах. На жаль, дана антиадгезивна активність втрачається для всіх досліджених культур, окрім *B. subtilis* та *P. aeruginosa* 01. Також, варто зазначити, що майже у всіх досліджених розведеннях фагу він зупиняє утворення біоплівки.

5. Виділений з ґрунту бактеріофаг продемонстрував ефективну

антибактеріальну дію проти ряду штамів бактерій. Також, він має гарні протиплівкоутворюючі властивості. Отримані результати можуть бути доповнені та використані для розробки антибактеріального препарату на основі бактеріофагу широкого спектру дії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Олабоді О. В. Технологія молока і молочних продуктів. Київ : ДеЛіпринт, 2017. 28 с.
2. Carr F. J., Chill D., Maida N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 2002. Т. 28, № 4. С. 281–370.
3. Khalid K. An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences (IJB)*. 2011. С. 1-13.
4. Salminen S. Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. 4-те вид. Boca Raton : Taylor & Francis, 2012.
5. Hammes W. P., Vogel R. F. The genus *Lactobacillus*. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Boston, MA, 1995. С. 19–54.
6. Wood B. J. B., Holzapfel W. H. Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy. Wiley & Sons, Incorporated, John, 2014. 632 с.
7. In vitro evaluation of antimicrobial potential and ability of biofilm formation of autochthonous *Lactobacillus* spp. And *Lactococcus* spp. isolated from traditionally made cheese from Southeastern Serbia / M. Ž. Muruzović та ін. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2018. Т. 42, № 11. С. e13776.
8. Molecular genetics of bacteriophage and natural phage defence systems in the genus *Lactococcus* / P. Garvey та ін. *International Dairy Journal*. 1995. Т. 5, № 8. С. 905–947.
9. The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. *Choice Reviews Online*. 2007. Т. 45, № 01. С. 45–0025–45–0025.
10. Teuber M. The genus *Lactococcus*. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Boston, MA, 1995. С. 173–234.
11. CASALTA E., MONTEL M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*. 2008. Т. 126, № 3. С. 271–273.

12. Mattarelli P., Biavati B. The genera *Bifidobacterium*, *Parascardovia* and *Scardovia*. *Lactic Acid Bacteria*. Chichester, UK, 2014. С. 509–541.
13. Sgorbati B., Biavati B., Palenzona D. The genus *Bifidobacterium*. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Boston, MA, 1995. С. 279–306.
14. Полтавська О. А., Коваленко Н. К. BIFIDOBACTERIA AND THEIR BIOLOGICAL PROPERTIES. *Microbiology&Biotechnology*. 2008. № 1(2). С. 8–17.
15. Науменко О. В. Проблеми бактеріофагії у виробництві ферментованих молочних продуктів. *Молокопереробка*. 2011. 3 (66). С. 15–21.
16. Кігель Н., Шульга Н. Кефір: сучасний погляд на мікрофлору та технологію. *Молокопереробка*. 2010. Т. 7. С. 16–21.
17. Foschino R., Perrone F., Galli A. Characterization of two virulent *Lactobacillus fermentum* bacteriophages isolated from sour dough. *Journal of Applied Bacteriology*. 1995. Т. 79, № 6. С. 677–683.
18. Genome analysis of *Lactobacillus fermentum* temperate bacteriophage ФРҮВ5 / X. Zhang та ін. *International Journal of Food Microbiology*. 2011. Т. 144, № 3. С. 400–405.
19. Bacteriophage application restores ethanol fermentation characteristics disrupted by *Lactobacillus fermentum* / M. Liu та ін. *Biotechnology for Biofuels*. 2015. Т. 8, № 1.
20. Foschino R., Picozzi C., Galli A. Comparative study of nine *Lactobacillus fermentum* bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology*. 2001. Т. 91, № 3. С. 394–403.
21. Functional analysis of the N-terminal region of endolysin Lyb5 encoded by *Lactobacillus fermentum* bacteriophage фРҮВ5 / T. Guo та ін. *International Journal of Food Microbiology*. 2015. Т. 203. С. 1–7.
22. A Cytoplasmic Antiholin Is Embedded In Frame with the Holin in a *Lactobacillus fermentum* Bacteriophage / T. Guo та ін. *Applied and Environmental Microbiology*. 2018. Т. 84, № 6.

23. Wang S., Kong J., Zhang X. Identification and characterization of the two-component cell lysis cassette encoded by temperate bacteriophage ϕ PYB5 of *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Applied Microbiology*. 2008. T. 105, № 6. C. 1939–1944.
24. Characterization of a Novel LysM Domain from *Lactobacillus fermentum* Bacteriophage Endolysin and Its Use as an Anchor To Display Heterologous Proteins on the Surfaces of Lactic Acid Bacteria / S. Hu та ін. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010. T. 76, № 8. C. 2410–2418.
25. Zhang X., Kong J., Qu Y. Isolation and characterization of a *Lactobacillus fermentum* temperate bacteriophage from Chinese yogurt. *Journal of Applied Microbiology*. 2006. T. 101, № 4. C. 857–863.
26. Molecular Evidence for Lysogeny in *Lactobacillus acidophilus* and Characterization of a Temperate Bacteriophage / S. F. Barefoot та ін. *Journal of Dairy Science*. 1990. T. 73, № 9. C. 2269–2277.
27. Characterization of the temperate bacteriophage phi adh and plasmid transduction in *Lactobacillus acidophilus* ADH. / R. R. Raya та ін. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989. T. 55, № 9. C. 2206–2213.
28. Nes I. F., Brendehaug J., von Husby K. O. Characterization of the bacteriophage B2 of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. *Biochimie*. 1988. T. 70, № 3. C. 423–427.
29. DE KLERK H. C., COETZEE J. N., THERON J. J. The Characterization of a Series of *Lactobacillus* Bacteriophages. *Journal of General Microbiology*. 1963. T. 32, № 1. C. 61–68.
30. The genome of the *Lactobacillus sanfranciscensis* temperate phage EV3 / M. A. Ehrmann та ін. *BMC Research Notes*. 2013. T. 6, № 1.
31. *Saccharomyces cerevisiae* expressing bacteriophage endolysins reduce *Lactobacillus* contamination during fermentation / P. A. Khatibi та ін. *Biotechnology for Biofuels*. 2014. T. 7, № 1. C. 104.

32. Yoon B. H., Chang H. I. Complete genomic sequence of the *Lactobacillus* temperate phage LF1. *Archives of Virology*. 2011. T. 156, № 10. C. 1909–1912.
33. Wace N. M. Vascular Plants. *Biogeography and Ecology in Antarctica*. Dordrecht, 1965. C. 201–266.
34. Photosynthetic limitations in two Antarctic vascular plants: importance of leaf anatomical traits and Rubisco kinetic parameters / P. L. Sáez та ін. *Journal of Experimental Botany*. 2017. T. 68, № 11. C. 2871–2883.
35. Ecophysiological traits of Antarctic vascular plants: their importance in the responses to climate change / L. A. Cavieres та ін. *Plant Ecology*. 2016. T. 217, № 3. C. 343–358.
36. Olech M., Chwedorzewska K. J. Short Note: The first appearance and establishment of an alien vascular plant in natural habitats on the forefield of a retreating glacier in Antarctica. *Antarctic Science*. 2011. T. 23, № 2. C. 153–154.
37. Gremmen N. J. M., Smith V. R. New records of alien vascular plants from Marion and Prince Edward Islands, sub-Antarctic. *Polar Biology*. 1999. T. 21, № 6. C. 401–409.
38. Fowbert J. A., Smith R. I. L. Rapid Population Increases in Native Vascular Plants in the Argentine Islands, Antarctic Peninsula. *Arctic and Alpine Research*. 1994. T. 26, № 3. C. 290.
39. Ecophysiology of Antarctic vascular plants / M. Alberdi та ін. *Physiologia Plantarum*. 2002. T. 115, № 4. C. 479–486.
40. Parnikoza I., Kozeretska I., Kunakh V. Vascular Plants of the Maritime Antarctic: Origin and Adaptation. *American Journal of Plant Sciences*. 2011. T. 02, № 03. C. 381–395.
41. Bacteriophages for Plant Disease Control / J. B. Jones та ін. *Annual Review of Phytopathology*. 2007. T. 45, № 1. C. 245–262.
42. Kassa T. Bacteriophages Against Pathogenic Bacteria and Possibilities for Future Application in Africa. *Infection and Drug Resistance*. 2021. Volume 14. C. 17–31.

43. Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases / C. Buttmer та ін. *Frontiers in Microbiology*. 2017. Т. 8.
44. New bacteriophages that infect the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* / T. Yamada та ін. *Microbiology*. 2007. Т. 153, № 8. С. 2630–2639.
45. Rangaswami G. Bacterial plant diseases in India. New York : Asia Pub. House, 1962. 163 с.
46. First complete genome sequence of a virulent bacteriophage infecting the opportunistic pathogen *Serratia rubidaea* / S. Xing та ін. *Archives of Virology*. 2017. Т. 162, № 7. С. 2021–2028.
47. Fahy. Plant Bacterial Diseases. Academic Press, 1983. 393 с.
48. Hertveldt K., Lavigne R. Bacteriophages of *Pseudomonas*. *Pseudomonas*. Weinheim, Germany. С. 255–291.
49. Phage Therapy: a Step Forward in the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections / D. P. Pires та ін. *Journal of Virology*. 2015. Т. 89, № 15. С. 7449–7456.
50. Isolation and Characterization of Bacteriophages Against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Causing Bacterial Canker Disease in Kiwifruit / J.-G. Yu та ін. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2016. Т. 26, № 2. С. 385–393.
51. Shoda M. Bacterial control of plant diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2000. Т. 89, № 6. С. 515–521.
52. Dowson W. J. Manual of Bacterial Plant Diseases. London : Adam and Charles Black, 1949.
53. Considerations for using bacteriophages for plant disease control / J. B. Jones та ін. *Bacteriophage*. 2012. Т. 2, № 4.
54. Genome sequencing and assessment of plant growth-promoting properties of a *Serratia marcescens* strain isolated from vermicompost / F. P. Matteoli та ін. *BMC Genomics*. 2018. Т. 19, № 1.

55. Characterization of Six Bacteriophages of *Serratia liquefaciens* CP6 Isolated from the Sugar Beet Phytosphere / K. E. Ashelford та ін. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999. Т. 65, № 5. С. 1959–1965.
56. Mishra S. R. Bacterial Plant Diseases. Discovery Publishing House, 2003.
57. Potential usefulness of bacteriophages that infect *Bacteroides fragilis* as model organisms for monitoring virus removal in drinking water treatment plants. / J. Jofre та ін. *Applied and environmental microbiology*. 1995. Т. 61, № 9. С. 3227–3231.
58. Revisiting Bistability in the Lysis/Lysogeny Circuit of Bacteriophage Lambda / M. Bednarz та ін. *PLoS ONE*. 2014. Т. 9, № 6. С. e100876.
59. Linking the lytic and lysogenic bacteriophage cycles to environmental conditions, host physiology and their variability in coastal lagoons / C. F. Maurice та ін. *Environmental Microbiology*. 2013. Т. 15, № 9. С. 2463–2475.
60. Lytic and Lysogenic Infection of Diverse *Escherichia coli* and *Shigella* Strains with a Verocytotoxigenic Bacteriophage / C. E. James та ін. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001. Т. 67, № 9. С. 4335–4337.
61. Bertani G. LYSOGENIC VERSUS LYTIC CYCLE OF PHAGE MULTIPLICATION. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1953. Т. 18. С. 65–70.
62. Hobbs Z., Abedon S. T. Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with ‘Lytic or lysogenic’. *FEMS Microbiology Letters*. 2016. Т. 363, № 7. С. fnw047.
63. Скроцька О.І., Пирог Т.П. Загальна вірусологія. Київ : НУХТ, 2011. 137 с.
64. Bacterial Retrons Function In Anti-Phage Defense / A. Millman та ін. *Cell*. 2020. Т. 183, № 6. С. 1551–1561.e12.
65. A chemical defence against phage infection / S. Kronheim та ін. *Nature*. 2018. Т. 564, № 7735. С. 283–286.

66. Labrie S. J., Samson J. E., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*. 2010. T. 8, № 5. C. 317–327.

Додаток А



Міністерство освіти і науки України
Житомирський державний університет імені Івана Франка

Сертифікат

Цей документ засвідчує, що

**Хмельницька Юлія
Олександрівна**

взяла участь

у XIII Всеукраїнській науково-практичній конференції
«Біологічні дослідження – 2022»

Проректор з наукової
і міжнародної роботи



10 жовтня 2022 року
м. Житомир

Тетяна БОЦЯН

бул. Велика Бердичівська, 40 м. Житомир, Україна, 10008
тел./факс: +380 412 43-14-17 e-mail: zu@zu.edu.ua



Продовження Додатку А

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЖИТОМИРСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА
ІНСТИТУТ ГІДРОБІОЛОГІЇ НАН УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ЗООЛОГІЇ ІМ. І. І. ШМАЛЬГАУЗЕНА НАН УКРАЇНИ
ГІДРОЕКОЛОГІЧНЕ ТОВАРИСТВО УКРАЇНИ
УКРАЇНСЬКЕ НАУКОВЕ ТОВАРИСТВО ПАРАЗИТОЛОГІВ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВОЛОДИМИРА ГНАТЮКА

БІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ – 2022

ЗБІРНИК НАУКОВИХ ПРАЦЬ

*За матеріалами
XIII Всеукраїнської науково–практичної конференції
від 10–11 жовтня 2022 р.*

Житомир
Видавець ПП «Євро-Волинь»
2022

Продовження Додатку А

<i>І. І. Петриченко</i> БІОЛЮМІНЕСЦЕНТНИЙ РЕЗОНАНСНИЙ ПЕРЕНОС ЕНЕРГІЇ ДЛЯ ВИМІРЮВАННЯ ЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ БАКТЕРІЙ	221
<i>С. П. Прилуцький</i> ОСОБЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ ТЕХНОЛОГІЙ ТРАНСГЕНЕЗУ ЕУКАРІОТІВ У ГЕНЕТИЧНІЙ ІНЖЕНЕРІЇ	222
<i>А. М. Прокопало, Н. С. Щеглова, О. В. Карпенко, В. І. Лубенець</i> КОМПОЗИЦІЙНІ НАНОЧАСТИНКИ РАМНОЛІПІДІВ ІЗ ТІОЕСТЕРАМИ	224
<i>М. Р. Розова, В. І. Коваленко, І. М. Волошина</i> ВИКОРИСТАННЯ НАНОЧАСТОК ОКСИДУ ТИТАНУ ТА ОКСИДУ ЦИНКУ ЯК СОНЦЕЗАХИСНИХ ФІЛЬТРІВ	226
<i>Ю. О. Хмельницька, О. А. Шидловська</i> ХАРАКТЕРИСТИКА ФАГУ РНІВ, ВИДІЛЕНОГО З <i>LACTOBACILLUS DELBRUECKII</i>	229
<i>О. Ю. Чернобров</i> ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕЗУ РОСЛИН <i>MUSCARI</i> <i>ARMENIACUM LEICHTLIN EX BAKER IN VITRO</i>	231
<i>І. Petrychenko</i> BIOLUMINESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER FOR <i>MEASURING BACTERIA LUMINESCENCE</i>	233
СЕКЦІЯ 14. СУЧАСНІ ПРОБЛЕМИ ПАРАЗИТОЛОГІЇ	
<i>Д. О. Ананенко, І. О. Погоріла</i> ЛЯМБЛІОЗ В УКРАЇНІ	235
<i>А. Ю. Філіпова, О. В. Павлюченко</i> ІНВАЗІЙНІ ХВОРОБИ ЛЮДИНИ ТА ЇХ ПРОФІЛАКТИКА	238
<i>Д. Р. Щербанюк, І. О. Погоріла</i> РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ІКСОДОВИХ КЛІЩІВ В УКРАЇНІ	240
СЕКЦІЯ 15. ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ ТА ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА	
<i>С. В. Батог, С. С. Дубняк, Н. О. Іванова</i> ТРАНСФОРМАЦІЯ ГІДРОЛОГІЧНИХ УМОВ ПАЛЛАДІНСЬКИХ СТАВКІВ ВНАСЛІДОК ЛАНДШАФТНОЇ РЕКОНСТРУКЦІЇ ПАРКУ «ФЕОФАНІЯ»	244
<i>Н. С. Вандюк</i> ВПЛИВ СКИДНИХ ВОД З ТРИПІЛЬСЬКОЇ ТЕС НА ТЕРМІЧНИЙ РЕЖИМ КАНІВСЬКОГО ВОДОСХОВИЩА	247
<i>Н. В. Герман</i> УНІКАЛЬНІ ЛІСИ ТА ДЕРЕВА ПОЛІССЯ РІВНЕНЩИНИ	249
<i>В. О. Гребенищikov</i> ВИВЧЕННЯ РІЗНОМАНІТТЯ МІКОБІОТИ НПП «ЧЕРЕМОСЬКИЙ» ТА ПРИЛЕГЛИХ ТЕРИТОРІЙ ЯК НЕВІД'ЄМНА СКЛАДОВА РАЦІОНАЛЬНОГО ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ	251

Продоаження Додатку А

8. Nohynek G. J., Lademann J., Ribaud C., Roberts M. S. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Crit Rev. Toxicol.* 2007. № 37. P. 251–277. DOI: 10.1080/10408440601177780.

9. Schafer-Korting M., Korting H. C., Ponce-Poschl E. Liposomal tretinoin for uncomplicated acne vulgaris. *Clin Investig* 1994. № 72. P. 1086–1091.

10. Soni M., Taylor S., Greenberg N., Burdock G. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: A review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology.* 2002. № 40(10). P. 1335–1373. DOI:10.1016/s0278–6915(02)00107–2.

11. Borm P. J., Robbins D., Haubold S., Kuhlbusch T., Fissan H., Donaldson K., et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol.* 2006. № 3. P. 11.

УДК 578.81:579.66

**ХАРАКТЕРИСТИКА ФАГУ PHIJВ, ВИДІЛЕНОГО
З *LACTOBACILLUS DELBRUECKII***

Ю. О. Хмельницька, О. А. Шидловська

Київський національний університет технологій та дизайну, вул. Немировича-Данченка, 2, Київ, 01011, Україна

Lactobacillus delbrueckii є однією із найбільш широко використовуваних молочнокислих бактерій в харчовій промисловості для виробництва молочнокислої продукції. Враховуючи економічну значимість, дослідження фагів *L. delbrueckii* мають надзвичайне значення. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SDMCC050201 є одним із комерційних штамів закваски для бродіння йогурту. В даній роботі проведено аналіз властивостей та відомих характеристик профага phiJB виділеного з *L. delbrueckii* SDMCC050201.

У порівнянні з вірулентними фагами, що інфікують *Lactobacillus delbrueckii* під час процесів бродіння молока, інформація про помірні фаги *Lactobacillus delbrueckii* обмежена. Можлива причина полягає в тому, що більшість постачальників стартових культур перевіряють свої штами на наявність профагів. Зазвичай лізогенні штами, що несуть профаг, який легко індукується, не мають виходу до комерційних продуктів. Проте, недостатня точність методів контролю, випадкова контамінація молочної сировини може призвести до втрати готової молочно-кислої продукції.

Виділений з молочнокислої бактерії *L. delbrueckii* бактеріофаг PhiJB має ікосаедричний капсид і нескоротливий хвіст. За своєю морфологією phiJB належить до родини *Siphoviridae* за даними Міжнародного комітету з таксономії вірусів. Геном PhiJB – лінійна дволанцюгова ДНК, розміром 36 969 bp із загальним вмістом GC 47,7 %. Геном phiJB містить 46 відкриті рамки зчитування (orf), що охоплюють 92,3% усієї довжини геному. 43 з 46 orf орієнтовані в одному напрямку, тоді як orf 12, 13 і 14 розташовані на комплементарному ланцюзі. 89 % початкових кодонів є AUG [2]. У геномі phiJB не виявлено тРНК. Як і багато фагів молочнокислих бактерій, геном

Продовження Додатку А

phiJB організований у такі функціональні модулі: упаковка ДНК, морфогенез голови та хвоста, лізис клітин, інтеграція, лізогенія та модулі реплікації ДНК.

Модуль лізису містить гени холіну та ендолізину, кодовані *orf 6* та *orf 7*. *Orf 6* демонструє 88% ідентичності з білком холіну і містить один трансмембранний домен між залишками 6 і 28. *Orf 7* демонструє схожість послідовності з мурамідазою і літичним ферментом, який кодується фагом *mv4*. N-кінець *orf 7* містить домен *Glyco_25*, який класифікується як ендон-ацетилмурамідаса на основі пошуку в базі даних збережених доменів NCBI [1].

Структура модуля реплікації phiJB дуже нагадує структуру фага JCL1032, що складається з NTP-зв'язування, хелі-корпуса, одноланцюгового зв'язуючого білка та праймази. Таким чином, реплікація ДНК phiJB належить до геліказно-праймазного типу $\phi P4\alpha$ [3].

Послідовність геному phiJB демонструє кілька цікавих особливостей. По-перше, phiJB може зазнавати швидкої еволюції разом зі своїм господарем. GC3 (54,6 %) значно вищий, ніж загальний вміст GC (47,7 %), що узгоджується зі штамом хазяїна *L. delbrueckii* subsp. *bul garicus*. По-друге, часто відбувається горизонтальний перенос генів через геном phiJB, і всі ці вставні фрагменти мають походження від *Lactobacillus* sp. Це вказує на те, що попередник phiJB може поширюватися у відносно широкому діапазоні хазяїв. Крім того, показана можливість злиття генів, яка може бути досягнута точковими мутаціями в початкових (або кінцевих) кодонах і каскаді споріднених генів. Іншою цікавою особливістю геному phiJB є модуль реплікації ДНК, зібраний з десяти бактеріальних генів і двох вірусних генів. Це підтверджує, що phiJB інфікує різні штами *Lactobacillus*. PhiJB належить до групи А фагів *Lactobacillus*. Фаги LL-N, *mv4*, LL-Ku та *c5*, що входить до складу тієї ж групи, мають тип «ініціатор-завантажувач гелікази», тоді як phiJB має тип «гелікази-праймази типу $\phi P4\alpha$ », подібний до фага групи с JCL1032. Склад і тип модуля реплікації ДНК значною мірою відображає генетичне різноманіття phiJB. Його геномна ДНК має гомологію з фагом *L. delbrueckii* LL-N. За своїми морфологічними та генетичними ознаками phiJB належить до групи фагів *L. delbrueckii* [4].

Аналіз результатів дослідження вказує на те, що профаг phiJB з *L. delbrueckii* SDMCC050201 має здатність інфікувати широкий спектр хазяїв. Це є небезпечною характеристикою, оскільки фаг phiJB здатний до горизонтального переносу генів. Дана властивість може змінювати характеристики промислового штаму *L. delbrueckii*, що в свою чергу вплине на якість кінцевого продукту. Більше того, індукція профагу становить потенційний ризик для використання закваски під час процесів бродіння молока. Даний аналіз дає розуміння молекулярно-генетичних механізмів реплікації та експресії генів фагу phiJB.

Література

- Guglielmotti D., Marcó M. B., Vinderola C., de los Reyes Gavilán C., Reinheimer J., Quiberón A. Spontaneous *Lactobacillus delbrueckii* phage-resistant mutants with acquired bile tolerance. *International Journal of Food Microbiology*. 2007. Vol 119, No 3. P. 236–242.

Продоаження Додатку А

2. Guo T., Zhang C., Xin Y., Xin M., Kong J. A novel chimeric prophage vB_LdcS-phiJB from commercial *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2016. Vol. 43, No 5. P. 681–689.

3. Suárez V., Zago M., Quiberoni A., Carminati D., Giraffa G., Reinheimer J. Lysogeny in *Lactobacillus delbrueckii* strains and characterization of two new temperate prolate-headed bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology*. 2008. Vol. 105, No 5. P. 1402–1411.

4. Wang S., Kong J., Gao C., Guo T., Liu X. Isolation and characterization of a novel virulent phage (phiLdb) of *Lactobacillus delbrueckii*. *International Journal of Food Microbiology*. 2010. Vol. 137, No 1. P. 22–27.

УДК 57.085:635.925

**ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕЗУ РОСЛИН *MUSCARI ARMENIACUM*
LEICHTLIN EX BAKER IN VITRO**

О. Ю. Чернобров

Науково-дослідна лабораторія біотехнології рослин, Відокремлений підрозділ Національного університету біоресурсів і природокористування України «Боярська лісова дослідна станція», вул. Лісодослідна, 12, Боярка, 08150, Україна

Розроблення ефективної технології масового тиражування *in vitro* високодекоративних рослин одне із актуальних завдань промислового квітникарства. До таких відносять *Muscari armeniacum* Leichtlin ex Baker – дрібно цибулинна рослина (до 40–60 см заввишки), що має пучок з двох-семи м'ясистих прикореневих листків. Квітки сині, блакитні або фіолетові, на коротких квітконіжках. Ареал роду охоплює Європу, Північну Африку й Західну Азію, але найбільшого різноманіття сягає у Середземномор'ї. Зростає на трав'янистих спадах, у лісовому поясі гір; деякі види натуралізувалися у Північній Америці і Австралії. Традиційно культуру розмножують дочірніми цибулинами, однак такий метод зумовлює поширення низки захворювань бактеріальної й грибної природи [2]. Застосування мікроклонального розмноження дозволяє одержувати достатню кількість оздоровлених рослин-регенерантів упродовж року [1; 7].

У світовій практиці актуальним наразі є розроблення протоколу регенерації *in vitro* [8; 9]; дослідження соматичного ембріогенезу *Muscari azureum* Fenzl [8]; здійснення поліплоїдизації *Tulipa gesneriana* L. [6]; вивчення антиоксидантної та цитотоксичної активності ендемічних та зникаючих геофітів *Muscari neglectum* Guss. ex Ten., *Muscari muscarimi* Medik. [3; 5]; дослідження каріоморфології та асиметрії хромосом, таксономічних зв'язків та відмінностей всередині роду [10]. Мета дослідження – визначення морфогенетичної активності тканин рослин *M. armeniacum* за дії компонентів живильного середовища для масового одержання регенерантів.



The 9th International Conference on Advanced Materials and Systems
-ICAMS 2022-
26-28 October 2022, Online Event

Bucharest, October 10th, 2022

CONFIRMATION OF PAPER ACCEPTANCE

Dear Olga Shydlovska,

We are pleased to inform you that your paper *L. Lactis Bacteriophages and Methods of Their Elimination from Dairy Products*, authors Olga Shydlovska, Yuliia Khmelnytska, was accepted for **presentation** in the 9th International Conference on Advanced Materials and Systems which will be held online, on October 26th – 28th, 2022.

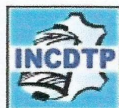
A tentative program of the Conference will be soon posted on the conference website.

We thank you for making this conference a challenging, interesting and enjoyable event! We look forward to seeing you online, on October 26th – 28th, 2022.

On behalf of the ICAMS 2022 Scientific Committee,

Dr. Laurenția Alexandrescu

Chair - Organizing Committee of the 9th International Conference on Advanced Materials and Systems



Organized by
INCDTP - Division: Leather and Footwear Research Institute
93 Ion Minulescu St., 030215, Bucharest, Romania
Phone/Fax: +4021.323.52.80
www.icams.ro www.icpi.ro



L. LACTIS BACTERIOPHAGES AND METHODS OF THEIR ELIMINATION FROM DAIRY PRODUCTS

Olga Shydlovska¹, Yuliia Khmelnytska¹

¹*Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, Ukraine*

Dairy products are important in human diet and nutrition. That is why dairy production is critical not only economically, but also socially and medically. In recent decades, dairy production has had problems with disturbances in fermentation processes caused by bacteriophage contamination. It is important to note that every year there are new reports about newly discovered bacteriophages that disrupt fermentation processes in the production of kefir, yogurt, and various types of cheese. *Lactococcus lactis* strains are of particular importance in dairy technology, as they are used for the production of various yogurts and cheeses. The study of the spectrum of bacteriophages infecting this strain can help to monitor the evolutionary changes of viruses and the horizontal transfer of genes. In this paper, an analysis of phages infecting *L. lactis* was carried out. Most bacteriophages belong to the *Siphoviridae* and *Podoviridae* families. Moreover, the authors analyzed approaches that can be used to reduce bacteriophage contamination in the production of dairy products. It has been shown that the use of disinfectants, such as ethanol or sodium hypochlorite, can reduce the titer of bacteriophages and protect products from the development of viral infection. It is also possible to use membrane filtration with UV irradiation. Moreover, all these approaches can be combined to achieve the most effective result.

Key words: bacteriophages, *Lactococcus lactis*, biotechnology

INTRODUCTION

Bacteriophages are the most common viruses on planet Earth. This is because their hosts – bacteria – inhabit the most diverse ecological niches, namely soil, water, thermal springs, the bottom of the ocean, the surface of human skin, the gastrointestinal tract of animals, etc. It is clear that where bacteria live, we can also find bacteriophages (Batiniovic, S. et al. (2019)).

This work is devoted to the review of bacteriophages infecting *Lactococcus lactis*, their characteristics and properties. The authors of the paper paid special attention to the analysis of possible methods of combating bacteriophage contamination of dairy production. This work shows that the development of effective methods of combating bacteriophage contamination is an important issue and requires in-depth study, since a universal and effective method has not yet been invented.

The main source of phages entering dairies is through raw milk, which can contain up to 10⁴ IU/ml. Milk often contains phages for *Lactococcus lactis* and *Streptococcus* spp. The temperature and time combinations commonly used for pasteurization, i.e., low temperature/long time (63°C, 30 min) or high temperature/short time (72°C, 15 s), are largely insufficient to eliminate most LAB phages. Work surfaces such as floors, walls, stairs, doorknobs, office desks, equipment, detergents, and pipes can also be a source of contamination. Phages cannot be eliminated in the dairy environment because they are naturally present in raw milk, withstand most common heat treatments, spread among production facilities through liquid splashes and airborne particles, persist on equipment surfaces and biofilms, and can be found in high titers in cheese whey or other industrial effluents (Pujato, S. A. et al. (2019)).

REVIEW OF BACTERIOPHAGE STRAINS INFECTING LACTOCOCCUS LACTIS

L. lactis strains are widely used in the production of numerous fermented dairy products and are among the most economically important lactic acid bacteria (LAB) (Yerlikaya, O. (2019)). All lactococcal phages belong to the order *Caudovirales*, families *Siphoviridae* (most lactococcal phages) and *Podoviridae* (few lactococcal phages). Bacteriophages infecting *L. lactis* have been divided into 10 species, and those belonging

Продовження Додатку Б

to c2, 936 or P335 species are more common in dairies. At present, 28 genomes of lactococcal bacteriophages isolated during the last 3 decades as a result of failed fermentation in dairies around the world have been identified. The GC content of the analyzed bacteriophages ranges from 34 to 36.4%. The genome length of isolates ranges from 20 to 23.2 kb for c2 phages, from 25.3 to 32.6 kb for species 936 phages, and from 25.3 to 32.6 kb for Bk5-T members. The number of putative ORFs ranges from 34 to 42 among c2 species, from 46 to 62 among 936 phages, and from 51 to 60 for Bk5-T isolates (Marcelli, B. et al. (2020)).

RESISTANCE OF *L. LACTIS* TO BACTERIOPHAGES

The type III-A system provides persistent phage immunity in part due to the absence of PAM sequence requirements (adjacent protospacer motif), tolerance of nucleotide mismatches in the target sequence (protospacer), and the efficiency of inhibition from a single spacer, especially when targeting important genes. The genetic similarity between the *L. lactis* type III-A CRISPR and other type III-A systems may predict a similar function. The *in vivo* functionality of the type III-A lactococcal system is consistent with the mechanism of action of similar systems found in *S. epidermidis*, *S. thermophilus*, and *Thermus thermophilus*. The flexibility in spacer targeting and the strength of immunity derived from a single spacer, especially when targeting essential genes, offer significant advantages for the generation of industrial strains with enhanced and programmed phage resistance (Millen, A. M. (2019)).

In the study of the authors Marcelli, B. et al. (2019) showed that the resistance mechanism of four bacteriophage-insensitive mutants of *L. lactis* involves changes in the phage receptor. For example, phage CHPC971 shows a low or very low adsorption rate for all four bacteriophage-insensitive mutant *L. lactis* strains compared to its sensitive strains CH LC01 and CH LC02. The studied phage is able to adsorb on *L. lactis* CH LC01 and CH LC02 strains, while on the other four *L. lactis* strains, adsorption was not observed or was very weak. It is important to note that rhamnose plays a direct role in the work of this receptor and may be a key molecule that provides resistance to bacteriophages.

METHODS OF REDUCING BACTERIOPHAGE CONTAMINATION IN FERMENTED *LACTOCOCCUS LACTIS* PRODUCTS

Complete inactivation of lactococcal phages can be achieved by treatment at 90°C for 5 minutes. Among alcohols (ethanol and isopropanol), ethanol in a concentration of 75% or more has an effective antiviral effect. Sodium hypochlorite in concentrations above 100 ppm (the maximum commercial concentration used is 200 ppm) is also capable of completely suppressing viral activity. The most effective agent widely used in the dairy industry is peracetic acid. At a concentration (0.15%, 40 °C) rapidly inactivates phage suspensions (the number of viruses below the detection limit, <10 PFU/ml) after 5 minutes of treatment (Marçó, M. B. et al. (2019))

Authors Michel, C. et al. (2021) investigated an orthogonal process strategy (cross membrane filtration combined with UV-C irradiation or heat treatment) to dramatically reduce the number of bacteriophages in filtered whey. An effective mode of bacteriophage elimination was membrane filtration followed by UV irradiation at 2.25 J cm². At the same time, no option with heat treatment of whey was effective – mild pasteurization conditions (72–75 °C, 15–30 s, whey protein denaturation by approximately 1%) and higher combinations of temperature and time (for example, 216 s at 75 °C for P008 phage or 10.5 min at 95 °C for P680 phage; whey protein denaturation

Продовження Додатку Б

>5% to >90%, respectively). Although this technology is pilot, it can be considered for scaling up the process of purifying serum from bacteriophages on an industrial scale. It is important to note that even in an industrial pasteurizer it is possible to achieve a certain decrease in the titer of bacteriophages, the conditions of industrial pasteurization of milk (72°C for 15 s) are not sufficient for effective inactivation of even the heat-sensitive model phage P008 (Wagner, N. (2018)).

An interesting approach to combating bacteriophage contamination is the development of transgenic strains of *L. lactis* bacteria. The authors performed plasmid transduction and proved the effectiveness of this procedure under certain circumstances. The selected phage must be able to infect both donor and recipient strains and encode a terminase that can bind plasmid DNA and package it into nascent phage heads (Marcelli, B. (2020)).

CONCLUSIONS

Most of the bacteriophages that infect *Lactococcus lactis* belong to the *Sifoviridae* and *Podoviridae* families. Even though *L. lactis* strains resistant to phages have been isolated, the threat of reducing the efficiency of fermentation processes still exists. This is due to the ultra-fast evolution of viruses. However, today there are quite effective approaches to fight against bacteriophage contamination. Among the most common and easy to use is the use of ethanol and sodium hypochlorite solutions. Furthermore, a more serious approach of combining methods of membrane filtration and treatment of raw materials with UV irradiation can significantly reduce the titer of bacteriophages. Among the latest approaches, the development of recombinant strains can be singled out, but this technology can be too expensive for dairy industries. Today, we can conclude that the search for new approaches and the improvement of old approaches to fight against bacteriophage infections on dairy farms needs more attention from scientists and researchers. It can be said that a combination of different approaches and techniques can provide greater efficiency in reducing the phage titer in raw materials. Moreover, it can help in the complete elimination of phage from dairy raw materials. The most promising methods currently are the combination of ultrafiltration with UV irradiation.

REFERENCES

- Batinovic, S., Wassef, F., Knowler, S. A., Rice, D. T., Stanton, C. R., Rose, J. and Franks, A. E. (2019). "Bacteriophages in natural and artificial environments", *Pathogens*, 8(3), 100-119
- Marcelli, B., de Jong, A., Janzen, T., Serrano, M., Kok, J. and Kuipers, O. P. (2020). "Complete genome sequences of 28 lactococcal bacteriophages isolated from failed dairy fermentation processes", *Microbiology resource announcements*, 9(12), e01535-19.
- Marcelli, B., de Jong, A., Karsens, H., Janzen, T., Kok, J. and Kuipers, O. P. (2019). "A specific sugar moiety in the *Lactococcus lactis* cell wall pellicle is required for infection by CHPC971, a member of the rare 1706 phage species", *Applied and environmental microbiology*, 85(19), e01224-19.
- Marcelli, B., Karsens, H., Nijland, M., Oudshoorn, R., Kuipers, O. P. and Kok, J. (2020). "Employing lytic phage-mediated horizontal gene transfer in *Lactococcus lactis*", *Plos one*, 15(9), e0238988-9008.
- Marco, M. B., Suárez, V. B., Quikeroni, A. and Pujato, S. A. (2019). "Inactivation of dairy bacteriophages by thermal and chemical treatments", *Viruses*, 11(5), 480-428.
- Michel, C., Samtlebe, M., Wagner, N., Neve, H., Franz, C. M., Hinrichs, J., & Atamer, Z. (2021). 'Orthogonal processing strategies to create "phage-free" whey—Membrane filtration followed by thermal or ultraviolet C treatment for the reduction of *Lactococcus lactis* bacteriophages', *International Dairy Journal*, 122, 105149-105159.
- Millen, A. M., Samson, J. E., Tremblay, D. M., Magadán, A. H., Rousseau, G. M., Moineau, S., & Romero, D. A. (2019). *Lactococcus lactis* type III-A CRISPR-Cas system cleaves bacteriophage RNA. *RNA biology*, 16(4), 461-468.

Продовження Додатку Б

- Pujato, S. A., Quiberoni, A. and Mercanti, D. J. (2019). "Bacteriophages on dairy foods", *Journal of applied microbiology*, 126(1), 14-30.
- Yedilova, O. (2019). "Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains", *Journal of dairy science*, 102(1), 124-134.
- Wagner, N., Matzer, S., Walz, H. G., Neve, H., Franz, C. M., Heller, K. J. and Hammer, P. (2018). "Extreme thermal stability of *Lactococcus lactis* bacteriophages: Evaluation of phage inactivation in a pilot-plant pasteurizer", *LWT*, 92, 412-415.