

Bakteriofágy a priemyselné fermentácie

MARIÁN MAČOR

SÚHRN. V úvode článku sú popísané základné charakteristiky bakteriofágov ako je morfológia, štruktúra nukleových kyselín, receptory hostiteľských buniek, adsorpcia fágov na bunky, prienik nukleovej kyseliny do buniek, replikácia fágového genómu a následná expresia fágovej DNA. V ďalšej časti práce sme uviedli stručnú klasifikáciu bakteriofágov a charakterizovali sme ich úlohu v priebehu lyzogénneho a lytického cyklu. V záverečnej časti podávame prehľad najvýznamnejších skupín bakteriofágov a ich úlohu v biotechnologických procesoch.

Bakteriofágy tvoria samostatnú skupinu vírusov. Boli objavené o 20 rokov neskôr ako rastlinné a živočíšne vírusy, teda začiatkom nášho storočia (1915-1917). K objavu bakteriofágov prispeli najmä Twort u mikrokokov a d'Herelle u buniek *Shigella*. Obaja autori nezávisle na sebe pozorovali spontánnu lýzu patogénnych baktérií. d'Herelle nazval tento fenomén bakteriofágia - požíranie baktérií [1]. Spočiatku po objave bakteriofágov sa predpokladalo ich využitie u medicínsky významných baktérií v období pred objavom antibiotík. Toto výrazne stimulovalo výskum fágov. V rokoch 1917 - 1956 bolo publikovaných asi 6000 prác v tejto oblasti. Vývoj fág-rezistentných baktérií a objavy účinných antibakteriálnych látok presunuli význam fágov z medicínskej do všeobecne biologickej polohy. Výrazný pokrok nastal súbežne s rozvojom molekulárnej biológie. Výskum fágov na molekulárnej úrovni priniesol základné informácie o replikačných a transkripčných mechanizmoch, pri stanovení polohy niektorých génov, pri syntéze bielkovín, pri génových manipuláciách a pri príprave klonovacích a expresných vektorov. Najväčší pokrok pri výskume fágov sa dosiahol za posledných 20 rokov.

Iná oblasť dôležitá z medicínskeho hľadiska, kde sa uplatňuje vplyv fágov, je prenos toxínov, produkovaných baktériami a zodpovedných za ochorenie človeka, z patogénnych mikroorganizmov do nepatogénnych. Je to napr.

RNDr. Marián MAČOR, CSc., Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava.

fágom sprostredkovaný prenos toxínu spôsobujúci šarlach, alebo prenos botulínového toxínu. Nemenej významnou oblasťou je prenos rezistencií voči antibiotikám. Gény R prechádzajú pomocou transpozície z plazmidu na fág, alebo na chromozóm a opačne. Pod selekčným tlakom určitých antibiotík môžu vzniknúť klony veľkého počtu kmeňov rezistentných voči antibiotikám, čo má výrazne negatívny vplyv v nemocničných zariadeniach a predstavuje celosvetový problém v zdravotníctve.

Inou motiváciou, ktorá stimulovala výskum fágov bola ich negatívna úloha v biotechnologických prevádzkach, najmä v tých, ktoré spracovávali mliečne suroviny, alebo produkovali významné metabolity ako antibiotiká, aminokyseliny a pod.

Častica bakteriofága sa skladá z dvoch základných zložiek a to nukleovej kyseliny (DNA alebo RNA) a bielkovinového obalu (kapsid), prípadne z obalu pozostávajúceho z bielkovín a lipidov. Bakteriofágy sa môžu množiť iba ako vnútrobunkoví paraziti. Po infekcii vhodného bakteriálneho hostiteľa prinúti jeho biosyntetický aparát produkovať virióny, ktoré sú schopné ďalej sa rozmnožovať v nových hostiteľoch. Mimo svojho bakteriálneho hostiteľa sa nemôžu rozmnožovať. Vo výbere hostiteľov prejavujú bakteriofágy užšiu, alebo voľnejšiu špecificitu. Niektoré bakteriofágy sú schopné rozmnožovať sa na viacerých rodoch, iné iba na konkrétnom druhu.

Špecifický proces, pri ktorom sa fág stáva integrálnou súčasťou chromozómu bakteriálnej bunky v stave tzv. profága, nemusí viesť k zániku hostiteľskej bunky. Je to tzv. lyzogénny vývoj fága. Alternatívne funkcie zabezpečujúce reprodukciu fága sú potlačené napr. fágom kódovaným represorom. Takýto profág môže byť stabilne uchovávaný po mnoho generácií v lyzogénnych bunkách. Profág môže zahájiť lytický cyklus spontánne, alebo vplyvom fyzikálnych, alebo chemických činiteľov (UV žiarenie, mitomycín C atď.). Bunka, ktorá stratí profága (curing) sa stáva trvale bezfágovou.

Klasifikácia bakteriofágov

Bakteriofágy sú veľmi rôznorodou skupinou. Líšia sa typom nukleovej kyseliny, morfológiou a štruktúrou kapsidu, jeho rozmermi a hmotnosťou, imunologickými vlastnosťami, rozsahom hostiteľov a citlivosťou na rôzne chemické a fyzikálne faktory. Pri súčasných poznatkoch o približne 3000 fágoch je skutočne značne problematické vytvoriť prehľadný systém ich klasifikácie. Najjednoduchšie základné členenie bakteriofágov je na veľké, stredne veľké a malé fágy. Veľkosť bakteriofágov kolíše v rozpätí 3,5 - 200 kb.

Medzi veľké virulentné fágy patria fágy s dvojvláknovou DNA napr. fág T4, medzi stredne veľké bakteriofágy lambda fág a Mu fág a medzi malé napr. bakteriofágy M13, MS2 a pod. Pri zatriedovaní fágov sa používa najmä systém podľa D. E. Bradleya, ktorý vychádza z tvaru viriónu a typu nukleovej kyseliny [2]. Medzinárodná komisia pre taxonómiu vírusov (ICTV) pri zaraďovaní bakteriofágov berie do úvahy tieto kritériá:

Vlastnosti genómu:

- typ nukleovej kyseliny (DNA alebo RNA),
- jednovláknová, dvojvláknová,
- veľkosť genómu,
- tvar genómu (lineárny, kruhový, segmentovaný, kohezívne konce, terminálna redundancia, permutácia a pod.),
- prítomnosť alebo neprítomnosť terminálne viazaného polypeptidu,
- sekvencia nukleotidov a ich homológia.

Vlastnosti viriónu:

- morfológia a symetria,
- veľkosť,
- prítomnosť alebo neprítomnosť obalov alebo lipidy obsahujúcich vrstiev.

Vlastnosti fágových proteínov:

- počet, veľkosť, funkcia, poradie aminokyselín.

Replikácia fágov:

- typ adsorpčného receptora,
- virulentný typ, temperovaný fág,
- tvorba konkatemérnych foriem,
- uvoľňovanie progénov fága počas lýzy buniek,
- čas a latentná fáza.

Fyziologické vlastnosti fága:

- hmotnosť častíc fága,
- denzita,
- inaktivácia fyzikálnymi, alebo chemickými činidlami.

Biologické vlastnosti:

- rozsah hostiteľov,
- veľkosť plakov,
- antigénne vlastnosti, imunologické vlastnosti bielkovín kapsidu.

Na základe týchto kritérií sa bakteriofágy zaradili do čeľadí a rodov (12 čeľadí, 16 rodov, niekoľko tisíc druhov). Toto rozdelenie nie je však konečné, pretože rekombináciou vznikajú životaschopné hybridy. Prehľad klasifikácie fágov je v tabuľke 1. [1,3].

TABUĽKA 1. Prehľad základných skupín bakteriofágov [2].
TABLE 1. Characteristics of the main phage groups [2].

Čeľaď ¹	Nukleová kyselina ²	Tvar ³	Charakteristika ⁴	Predstavitelia ⁵
<i>Myoviridae</i>	lineárna ds DNA	s chvostíkom	kontraktilný chvostík	T4, P1, P2, Mu
<i>Siphoviridae</i>	lineárna ds DNA	s chvostíkom	dlhý nekontraktilný chvostík	Lambda, Φ105, T1
<i>Podoviridae</i>	lineárna ds DNA	s chvostíkom	krátky chvostík	T7, N4, P22
<i>Microviridae</i>	kruhová ss DNA	kubický	nápadné kapsoméry	ΦX174, G4, S13
<i>Corticoviridae</i>	kruhová ds DNA	kubický	komplexný kapsid, lipidy	PM2
<i>Leviviridae</i>	lineárna ss RNA	kubický	komplexná štruktúra	MS2, f2, R17
<i>Techiviridae</i>	lineárna ds DNA	kubický	dvojité kapsid, lipidy	PRD1, L17, P4, P7
<i>Cystoviridae</i>	lineárna ds RNA	kubický	proteínový kapsid, lipidový obal	φ6
<i>Inoviridae</i>	kruhová ss DNA	vláknitý	dlhé a krátke paličky	fd, MVL1, L51, f1
<i>Plasmaviridae</i>	lineárna ds DNA	pleomorfný	lipidový obal bez kapsidu	MVL2, L2
<i>Lipothruxviridae</i>	lineárna ds DNA	s obalom	obal, lipidy	TTV1, TTV4
<i>Fuselloviridae</i>	lineárna ds DNA	s obalom	citrónovitý tvar	SSV1

ss - jednovláknová DNA, ds - dvojitá vlákna DNA.

1 - family, 2 - nucleic acid, 3 - form, 4 - characteristics, 5 - representatives, ss - single strand DNA, ds - double strand DNA.

Reprodukčný cyklus bakteriofágov

Prvým stupňom interakcie bakteriofága s hostiteľskou bunkou je prichytenie fága na stenu bunky. Vonkajšia štruktúra bakteriálnej bunky tvorí veľmi komplexnú štruktúru. Je zložená z rôznych druhov makromolekúl, ako sú proteíny, lipopolysacharidy, glykoproteíny a pod., a ďalej z prídavných receptorov ako sú bičiky a pili. Fágy môžu interagovať s týmito komponentami a táto interakcia je prvým stupňom preniknutia fágového genómu do bunky. Na adsorpciu vplýva fyziologický stav buniek, prítomnosť a koncentrácia iónov (horčík, vápnik a pod.), rôzne kofaktory (napr. L-tryptofán) a pod. Po irreverzibilnej väzbe nastáva fáza preniknutia fágovej nukleovej kyseliny do buniek, pričom kapsid fágov ostáva mimo bunky. U fágov s kontraktílnym chvostíkom sa uplatňuje injekčný mechanizmus. Úlohu hrá aj elektrochemický potenciál a proteíny, ktoré obaľujú fágovú nukleovú kyselinu. Bakteriofágy, ktoré majú lipidový obal môžu vstúpiť do hostiteľskej bunky mechanizmom membránovej fúzie [4,5], alebo aj počas konjugácie môže byť fágová nukleová kyselina prenesená z jednej bunky do druhej [1]. Vstupom fágovej nukleovej kyseliny do bunky je zahájený proces, pri ktorom sa rozhodne o lytickom vývoji fága, alebo o lyzogénnom vývoji. Je zahájený proces prepisu skorých a neskorých fágových génov, syntézy ich produktov a dochádza k replikácii nukleovej kyseliny. V bunke sa môže vytvoriť 100 až niekoľko tisíc kópií fágového genómu. Vnútro bunkový vývoj sa ukončí dozrievaním (proces maturácie), kedy sa skompletizujú fágové obaly, dochádza k vbalovaniu nukleovej kyseliny, deštrukcii hostiteľskej bunky a k uvoľneniu zrelých fágov do prostredia. Je to typický proces u virulentných fágov, spôsobujúcich lýzu bunkovej kultúry. U niektorých fágov po preniknutí do bunky sa tieto stávajú integrálnou súčasťou bakteriálneho chromozómu (rekombinujú s bakteriálnym chromozómom polohovo špecificky napr. fág lambda, alebo nešpecificky napr. fág Mu, alebo si zachovávajú charakteristické znaky plazmidov napr. fág P1). Integrovaná forma fágovej DNA sa nazýva profág. Navodenie stavu profága sa nazýva lyzogenizácia, alebo lyzogénny vývoj fága. Baktérie nesúce profág sa nazývajú lyzogénne baktérie. Pre bakteriofágy schopné lyzogenizovať hostiteľské bunky sa používa termín mierne fágy (temperate phages). Navodenie a udržanie lyzogénneho stavu je komplexný proces, na ktorom sa zúčastňujú produkty fágových a bunkových génov. Typickým predstaviteľom takéhoto fága je bakteriofág lambda. Lambda fág sa v bunkách *Escherichia coli* môže vyskytovať v dvojakej forme:

1. V lyzogénnej forme, v ktorej je genóm fága integrovaný v špecifickej oblasti chromozómu bunky. Represor replikácie fága je aktívny a potláča lytické funkcie genómu fága.

2. V lytickej forme, v ktorej sa represor inaktivuje a genetické funkcie sa postupne vyjadrujú. DNA fága sa uvoľňuje z chromozómu do cytoplazmy, kde sa nadmerne replikujú. Sprievodným znakom týchto javov je lýza bunky a uvoľnenie častíc fága do vonkajšieho prostredia [6].

Metódy detekcie bakteriofágov

Na zistenie počtu bakteriofágov vyskytujúcich sa v určitej bakteriálnej kultúre sa suspenzia citlivého kmeňa baktérií vyleje pomocou Top agaru na povrch Petriho misky so stuhnutým agarom, obsahujúcim všetky živiny potrebné pre rast baktérií. Po stuhnutí vrchnej vrstvy so suspenziou baktérií sa povrch misky postrieka so suspenziou fága. Po krátkej inkubácii pri teplote 37 °C baktérie narastú na povrchu misky. Na miestach, kde fág infikoval bunky vzniknú prázdne miesta nazývané plaky. Počet plakov na agarovej miske zodpovedá počtu bakteriofágov v pôvodnej suspenzii [6,7]. Titer fága je množstvo infekčných častíc v 1 ml fágového lyzátu. Udáva sa v hodnote PFU na 1 ml (plak formujúce jednotky). Pre zistenie počtu bakteriofágov vyskytujúcich sa vo fágovom lyzáte je potrebná suspenzia citlivého detekčného kmeňa. U *E. coli* to zvyčajne nebýva problémom, ale u iných druhov sa môžeme stretnúť so značnými ťažkosťami. Definitívnym potvrdením môže byť elektronmikroskopická vizualizácia, ktorá je však veľmi náročná a nevhodná pre bežné použitie. Podobným spôsobom (pomocou plakov) sa deteguje aj fág v lyzogénnej kultúre, pretože s nízkou frekvenciou dochádza k spontánnej indukcii profága, čo sa prejaví lyzovanou zónou na indikátorovom kmeni baktérií. Každý fág tvorí plaky charakteristického tvaru, veľkosti a turbidity. Virulentné fágy tvoria väčšinou jasné plaky, zatiaľ čo zakalené (turbídne) plaky sú charakteristické pre lyzogénne kultúry. Mutované fágy majú väčšinou väčšie plaky, alebo majú napr. jasne ohraničený okraj.

Z ďalších metód, ktoré možno použiť pri detekcii bakteriofágov sú známe predovšetkým imunologické metódy, kde sa využívajú protilátky proti fágovým povrchovým proteínom. DNA hybridizačné techniky využívajú génové sondy a tiež možno využiť elektroforézu na polyakrylamidových géloch a restriekčnú analýzu.

Prenos génov, rekombinácia a transdukcia

Všeobecná transdukcia bola prvýkrát popísaná Zinderom a Lederbergom v roku 1952, ako prenos dedičných znakov medzi kmeňmi *Salmonella typhimurium* s využitím filtrovateľného agens [8]. Bolo potvrdené, že takéto transdukčné častice, ktoré fungovali ako vektor pri prenose bakteriálnych génov z jednej bunky do druhej, boli častice bakteriofága P22. Asi 2 % týchto častíc divokého fága P22 po zlyzovaní buniek obsahovalo časť hostiteľskej bakteriálnej DNA. Neskôr sa potvrdilo, že ktorýkoľvek bakteriálny genetický marker môže byť nabalený do hlavičky fága a prenesený transdukciou do inej bunky. V tom čase robil experimenty s temperovaným bakteriofágom P1 Lennox [9]. Potvrdil, že aj tento fág sa môže použiť ako vektor pre všeobecnú transdukciu génov *E. coli*. Neskôr bolo zistené, že transdukčné častice tvoria asi 0,3 % fágových partikul v P1 lyzáte [10]. P1 bakteriofág môže prenášať segmenty DNA dvakrát väčšie ako bakteriofág P22. Účinná transdukcia bakteriálnych génov sa teda dosiahne infekčným bakteriofágovým lyzátom donorového kmeňa do recipientného kmeňa za podmienok, ktoré umožnia prežitie buniek infikovaných transdukčnými časticami. Rozlišujeme generalizovanú transdukciu a špecializovanú transdukciu. U generalizovanej transdukcie fágové hlavičky zvyčajne obsahujú iba bakteriálnu DNA. Typickým predstaviteľom generalizovaného transdukčného fága je P1 bakteriofág, ktorý dokáže nabaliť až 2 % chromozómu *E. coli* [11,12]. Špecializované transdukčné fágy majú bakteriálnu DNA kovalentne spojenú s fágovou DNA [13]. Zvyčajne sa týmto spôsobom môže preniesť iba niekoľko génov hostiteľského chromozómu ako napr. u fága lambda. Ak fragment DNA nie je integrovaný do chromozómu recipientnej bunky, je degradovaný. V špeciálnych prípadoch môže však dôjsť k jeho dočasnému exprimovaniu, čo vyústi do procesu nazývaného abortívna transdukcia [11].

K rekombinácii medzi bakteriofágmi môže dôjsť v dôsledku súčasnej infekcie bunky dvoma, prípadne viacerými časticami fága. Experimentálne sa dokázalo, že fágové dvojvláknové DNA môžu v priebehu intracelulárneho vývoja viacnásobne rekombinovať. Frekvencia týchto rekombinácií je podmienená genetickými vlastnosťami fágov. Fág T4 má napr. podstatne vyššiu rekombinačnú aktivitu ako fág lambda. Štúdium transkripcie fágových génov prinieslo v roku 1984 zaujímavý objav - intrón aj v géne T4 bakteriofága pre tymidylát syntetázu. Neskôr sa u T4 objavili ďalšie dva gény s intrónom. Intróny sa autokatalyticky vyštiepujú (self-splicing). Charakterizáciou intrónov sa dokázalo, že patria do I. triedy intrónov. Z tohoto hľadiska sa ukázalo, že bakteriofág T4 patrí medzi najzaujímavejšie bakteriofágy, na ktorých sa študujú mechanizmy rekombinácie [14].

Lambda fág sa integruje do bakteriálneho chromozómu vo forme kruhovej DNA. K rekombinácii dochádza v špecifických miestach fágovej DNA (*attP*) a bakteriálneho chromozómu (*attB*), za účasti fágovej integrázy a hostiteľských bielkovín. Za vhodných podmienok dochádza v hostiteľskej bunke k rekombinácii s chromozomálnou DNA, čo sa môže prejaviť genetickou zmenou recipientnej bunky [11]. Analýza rekombinantov významne prispela k lokalizácii génov a konštrukcii genetických máp bakteriofágov [15].

Bakteriálne obranné mechanizmy

Fágová infekcia môže byť neúspešná v dôsledku mutácie (mutual exclusion), alebo homoimunity voči superinfekcii, alebo z iných príčin. Zložky bunkovej steny môžu prekryvať receptory nevyhnutné pre fága, alebo zmena v receptorovom géne hostiteľa môže vyústiť do štrukturálnej zmeny receptora. Častou príčinou neúspechu fágovej infekcie bývajú restriktomodifikačné systémy hostiteľa. Restriktčné enzýmy môžu štiepiť fágovú DNA v špecifických sekvenciách, pričom vlastná DNA je chránená metyláciou [16].

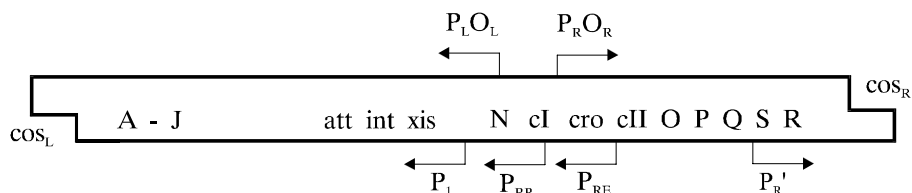
Fágy majú tiež mechanizmy, ktorými môžu uniknúť restriktnému zničeniu hostiteľskými enzýmami. Je to v prvom rade metylácia vírusovými metylázami, ďalej je to prítomnosť nezvyčajných nukleotidov, ktoré tiež bránia štiepeniu restriktnými enzýmami. Nakoniec špecializované fágové proteíny priamo zasahujú do aktivity restriktčných enzýmov hostiteľa, prípadne degradujú ich kofaktory.

Prehľad najdôležitejších bakteriofágov

1. Bakteriofágy *Escherichia coli*

Fág lambda [15,17]

je najlepšie preštudovaný temperovaný fág. Skladá sa z ikosaedrálnej hlavičky (dvadsaťsten) priemeru 54 nm a z flexibilného chvostíka dlhého 150 nm. Hlavička obsahuje dvojvláknovú DNA v linearizovanej forme (obr. 1.). Adsorpcia na *E. coli* je iniciovaná vtedy, keď jednotlivé chvostíkové vlákna interagujú s MalB proteínom na vonkajšej membráne *E. coli*. Na interakcii sa podieľa špecifická permeáza (mannose specific). Do bunky *E. coli* je potom injektovaná lineárna DNA (48 502 bp) [18,19]. Z ľavého promótoru (P_L) vo fáze veľmi skorej transkripcie na matrixi kruhovej DNA



OBR. 1. Zjednodušená mapa genómu bakteriofága lambda.

FIG. 1. Schematic genetic map of bacteriophage lambda.

A-J - neskoré gény kódujúce kapsidové bielkoviny hlavičky a chvostíka, P_R , P_L - promótory, O_L , O_R - operátory, cos_R , cos_L - kohezívne konce, att - miesto pre integráciu na fágovej DNA, int - gén pre integrázu, xis - gén pre uvoľnenie z profágového stavu, N - pozitívny regulátor transkripcie, cI - represor pre udržanie lyzogénneho stavu, cro - represor lyzogénneho vývoja, cII - represor lytického vývoja, O, P - gény pre iniciáciu replikácie DNA, S, R - neskoré gény, ktorých produkty sa zúčastňujú na lýze bunky, Q - pozitívny regulátor transkripcie neskorých génov.

A-J - late genes for coding capsid proteins for head and tail, P_R , P_L - promoters, O_L , O_R - operators, cos_R , cos_L - cohesive ends, att - site for integration of phage DNA, int - gene for integrase, xis - gene for release from prophage state, N - positive transcription regulator, cI - represor for lysogenic state, cro - represor of lysogenic cycle, cII - represor of lytic cycle, O, P - genes for initiation of replication, S, R - late genes for products for lysis cycle of the cells, Q - positive regulator of transcription of late genes.

(cirkularizuje pomocou 12 bp kohezívnych koncov) sa syntetizuje mRNA pre bielkovinu N. Z pravého promótoru (P_R) sa syntetizuje mRNA pre bielkovinu cro. Transkripcia oboch mRNA je ukončená pravým a ľavým terminátorom. Bielkovina N funguje ako pozitívny regulátor transkripcie a umožňuje prepis génov cII, replikačných génov O a P, génu pre Q bielkovinu a génov, ktorých produkty sú potrebné pre navodenie integrovaného stavu. O charakte vývoja rozhodujú hladiny bielkovín cII a cro. Ak je koncentrácia prvého z nich nízka, cro bielkovina sa viaže na oba operátory (O_L a O_R) a blokuje syntézu represorového génu cI, ktorého produkt je potrebný na udržanie integrovaného stavu. Lambda fág sa integruje do bakteriálneho chromozómu vo forme kruhovej DNA. Integrovaná forma lambda fága (profág) je udržiavaná optimálnou hladinou represora cI. Pod vplyvom niektorých faktorov (teplota) dochádza k vyštípeniu profága z chromozómu a nasleduje lytická forma vývoja. Pri uvoľnení z chromozómu sa môže spolu s fágovou DNA vyštípiť aj časť bakteriálneho chromozómu. Vznikajú tak fágy, ktoré okrem vlastného genómu nesú aj bakteriálne gény a po následnej infekcii môžu byť vnášané do nových hostiteľov transdukciou [20-24]. Deriváty fága lambda sú dodnes široko využívané pre molekulárne klonovanie [25]. Cudzorodá DNA (asi 25 kb) môže byť prenášaná virulentným

fágom. Tento systém sa využíva predovšetkým pre konštrukciu génových knižníc [26]. Dôkladná znalosť mechanizmov lyzogénie a lýzy sa prakticky využíva pri konštrukcii klonovacích vektorov charónov. Charóny sú vlastne dômyselným spôsobom upravené deriváty lambda fága, ako aj iných lambdoidných fágov. Väčšina z nich využíva poznatok, že na lytický vývoj fága stačí 60 % genómu a do fágovej hlavičky sa môže vbaľiť len DNA s obmedzenou dĺžkou. Podľa spôsobu prípravy rozdeľujeme charóny na inzerčné a substitučné. Inzerčné charóny môžu prijať fragment DNA zakončený rovnakými kohéznymi koncami, pričom súčet veľkosti charónu a fragmentu musí byť menší než 105 % veľkosti lambda genómu. Substitučné charóny sa konštruujú tak, že po štiepení restriktázou sa neesenciálny úsek nahradí donorovou DNA [6].

Temperovaný fág Mu [2,6,27,28]

37 kb veľký lineárny dvojvláknový genóm fága Mu sa vyznačuje tým, že má menšiu špecifickosť väzbových štruktúr na integráciu do bakteriálneho chromozómu. Viaz sa na jeho viac oblastí. Zároveň je akýmsi prototypom inzerčných elementov baktérií. Okrem osobitnej schopnosti integrovať sa na rozličných miestach rôznych replikónov, zapríčiňuje vsunutie Mu fága na týchto miestach zmeny funkcií susedných génov alebo delécie, alebo polárne mutácie, teda poškodenie niektorých genetických funkcií bunky - odtiaľ názov mutátor [6]. Ďalšou zvláštnosťou fága Mu je jeho okruh hostiteľov, ktorý môže byť menený inverziou jeho úseku DNA (tzv. G segment) [29,30]. Labilný prenášateľný segment G je pripojený k segmentu alfa a beta DNA bakteriofága Mu krátkymi obrátenými poradiami báz (asi 20 báz). Spolu tvoria typickú inzerčnú sekvenciu schopnú integrovať sa kamkoľvek na chromozóme hostiteľa. Vzniká tzv. vsúvací bublina (insertion bubble). Častice fága Mu pozostávajú z ikosaedrálny hlavičky (54 nm) a kontraktilného chvostíka so 6 chvostíkovými vláknami (18 x 100 nm). Ako receptor slúži lipopolysacharid. Vbalovalenie fágovej DNA prebieha mechanizmom tzv. plnej hlavičky z miesta pac. Po 45 až 60 min po infekcii sa z bunky uvoľňuje 50 - 200 fágov. Mu transpozícia sa mnohostranne využíva pre génové inžinierstvo nielen u *Escherichia coli*. Pre tento účel sú vhodné najmä mini Mu deriváty [31].

Bakteriofág P1 [2, 12, 32, 33]

Podrobne o bakteriofágu P1 sa zdieľujeme v článku Mačor a kol. [99].

Bakteriofág T4 [2]

Bakteriofág T4 je typickým predstaviteľom veľkých virulentných fágov [34,35]. V hlavičke tohoto fága (85 x 115 nm) je lineárna dvojvláknová DNA o veľkosti 166 kb s terminálnou redundanciou 5 kb. Kontraktilný chvostík

(110 nm) je pripevnený na bazálnu platničku so 6 chvostíkovými vláknami. Ako receptor rozoznáva proteín vonkajšej membrány (ompC) alebo lipopolysacharidy. Fágová DNA kóduje asi 200 génov pre tvorbu 24 fágových proteínov hlavičky a 26 štruktúrnych proteínov pre stavbu chvostíka. Enzýmy tohoto fága sa široko využívajú v laboratóriách napr. T4 DNA-ligáza, T4 RNA-ligáza, T4 DNA-polymeráza, T4 polynukleotidkináza a iné.

Vláknité bakteriofágy [2,36]

Vláknité (filamentózne) fágy sú malé vírusy s jednoduchou stavbou opakujúceho sa helikálneho proteínu (dĺžka vlákna 900 nm, hrúbka 6 - 10 nm). Ako receptor väčšinou využívajú F pili. Genóm má veľkosť iba 6,4 kb jednovláknovej DNA. Kóduje 10 génov [37,38]. Zvláštnosťou je tvorba intermediárnej dvojvláknovej DNA (replikatívna forma). Progény fága sa uvoľňujú bez toho, aby poškodili bunky hostiteľa. Najväčšie výhody týchto fágov spočívajú v:

- možnosti získať pomerne veľké množstvo jednovláknovej DNA vo veľmi čistom stave,
- možnosti priameho využitia pri sekvenovaní DNA Sangerovou metódou,
- možnosti využitia signálnych sekvencií pre replikáciu DNA a pre vbaľovanie z týchto fágov do plazmidových vektorov, ktoré majú väčšiu stabilitu ako fágové vektory [39].

Fágy s jednovláknovou RNA

Sú to malé, veľmi jednoduché fágy. U *E. coli* sú to fágy MS2, QB, SP a pod. Ikosaedrálna hlavička (25 nm) pozostáva zo 180 kópií kapsidového proteínu a 1 kópie adsorpčného proteínu. Genóm má veľkosť 3,5 až 4,3 kb [40,41]. Ako receptor využívajú pili u *E. coli*, *Proteus*, *Caulobacter* a pod. Jednovláknová RNA slúži ako mRNA pre transláciu vírusových proteínov, ale aj ako templát pre replikáciu RNA.

2. Bakteriofágy z iných čeľadí ako *Enterobacteriaceae*

Fágy z čelade Methanobacteriaceae

Čeľaď baktérií produkujúcich metán má 3 rody (*Methanobacterium*, *Methanosarcina*, *Methanococcus*) [42]. Z tejto čelade bol izolovaný virulentný fág Ψ M1 [43,44]. Má lineárnu dvojvláknovú DNA o veľkosti okolo 30 kb, ktorá je cyklicky permutovaná a vykazuje terminálnu redundanciu okolo 10 %. Fág je schopný pomocou generalizovanej transdukcie prenášať chromozomálne markery [45].

Fágy z čeľade Methylomonadaceae

Boli izolované fágy z rodu *Methylomonas* [46,47] a z niektorých iných rodov napr. z rodu *Acetobacter* [48-50]. Transdukcia pomocou týchto fágov nebola zatiaľ úspešná.

Fágy z čeľade Bacillaceae

Táto čeľaď obsahuje rody: *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus* a pod. [51]. Najviac fágov bolo izolovaných a charakterizovaných z rodu *Bacillus*, ktorý je z grampozitívnych baktérií najlepšie preštudovaný [52]. Všetky tieto fágy majú dvojvláknovú DNA. Temperované fágy z rodu *Bacillus* boli rozdelené do piatich skupín [53,54]:

1. skupina - zástupca fág Φ 105
2. skupina - zástupca fág SPO2
3. skupina - zástupca fág SP β
4. skupina - zástupca fág SP16
5. skupina - obsahuje defektné fágy

Väčšina týchto fágov bola využitá ako klonovacie vektory, ktoré boli schopné prenášať cudzorodú DNA.

a) fágy z rodu *Bacillus*

Z virulentných fágov rodu *Bacillus* treba spomenúť fága Φ 29 [55,56] fága SPO1 [57] a fága SPP1 [58]. Tieto fágy a ich deriváty boli úspešne využité ako klonovacie a expresné vektory. Boli schopné generalizovanej transdukcie, napr. fág PBS1 je schopný nabaliť 150 - 200 kb veľké chromozomálne fragmenty [59-61]. Nakoniec treba ešte spomenúť kappa fágy [62] a theta fágy [63].

b) fágy z rodu *Lactobacillus*

Boli izolované virulentné chvostíkaté fágy obsahujúce dvojvláknovú DNA [64-68]. Temperované fágy z tohoto rodu sú menej preštudované [69].

c) fágy z rodu *Clostridium*

Rovnako ako u predošlého rodu boli izolované chvostíkaté fágy s dvojvláknovou DNA [70-72]. V tejto skupine boli intenzívne študované najmä fágy patogénnych druhov klostrídií predovšetkým tie, ktoré produkujú toxíny a tie, ktoré vytvárajú spóry [73-77].

Fágy z čeľade Pseudomonadaceae

Najviac fágov v tejto čeľadi bolo izolovaných z druhu *Pseudomonas aeruginosa*. Sú to rôznorodé fágy (chvostíkaté, vláknité, sférické). Najväčšie

uplatnenie získal fág M13 112 a jeho deriváty pri genetických manipuláciách, pri klonovaní, inzerčnej mutagenéze a pod. [78]. Zvláštny je fág $\Phi 6$, ktorý obsahuje dvojvláknovú RNA [4] a fág PM2, ktorý obsahuje lipidový obal [79].

Fágy z čeľade Streptomycetaceae

Z tejto čeľade, ktorá patrí do radu *Actinomycetales* [80] boli získané virulentné aj temperované fágy. Všetky obsahujú dvojvláknovú DNA a chvostík [81, 82]. Je to predovšetkým fág SV1 [83], fág $\Phi S1$ [84] a fág $\Phi C31$ [82, 85].

Fágy z čeľade Corynebacteriaceae a Brevibacteriaceae

Z týchto čeľadí boli izolované virulentné fágy s chvostíkom a s dvojvláknovou DNA [86-89]. Niektoré z nich boli využité ako klonovacie vektory [90-92].

Bakteriofágy v priemyselných fermentáciach

Priemyselné fermentácie sa opierajú o rast produkčného kmeňa mikroorganizmov a vytváranie žiadaného produktu. Akýkoľvek negatívny zásah do tohoto procesu má za následok ekonomické straty. Bakteriofágy sú jedným z faktorov, ktoré môžu ohroziť produkčný kmeň, môžu účinne zlikvidovať fermentačné baktérie a preto predstavujú reálne nebezpečenstvo [7]. Vzhľadom na ich biologickú povahu, bakteriofágy môžu kedykoľvek zasiahnuť do procesu fermentácie, ich kontrola je veľmi obtiažna a môžu byť príčinou závažných problémov. Fágy môžu vstúpiť do fermentačných procesov z vonkajších zdrojov (vzduch, zariadenie pre fermentáciu, suroviny) a z vnútorných zdrojov (samotná produkčná kultúra). Hlavné úsilie je nasmerované na zabránenie vstupu fágov do fermentačného systému. Toto je veľkým problémom v prípadoch, kedy fermentácia beží za semisterilných podmienok, napr. mliečne fermentácie, výroba syrov a pod. Kontrola v priemyselných fermentáciách je viacstupňová a pozostáva:

- z efektívnej sanitácie,
- zo správnej prípravy štartovacej kultúry,
- z použitia inhibičných médií voči fágom a z protifágových chemikálií,
- zo správnej a rýchlej detekcie fága, ktorý vošiel do fermentačného procesu,
- z izolácie a vývoja produkčného kmeňa rezistentného voči fágom.

Biologická povaha a genetické vybavenie produkčných kmeňov a prítomnosť fága vo fermentačnom procese určuje rýchlosť a rozsah fágom spôsobenej deštrukcie. Niektoré fágy sa veľmi rýchlo rozmnožujú a veľmi rýchlo lyzujú hostiteľské bunky. Iné sa vyvíjajú pomaly a nemajú významný vplyv na bakteriálny rast a metabolizmus.

Nie všetky zlyhania biotechnologických procesov sú spôsobené fágmi. Prítomnosť chemických inhibítorov, antibiotík, kolísanie fyzikálnych parametrov (teplota, pH, prevzdušňovanie, živiny) a nesprávna príprava štartovacieho inokula môže byť príčinou zlyhania. Prítomnosť bakteriofágov musí byť stanovená a musí sa teda odlíšiť od iných príčin. Keďže bakteriofágy nie sú viditeľné voľným okom, ani vo svetelnom mikroskope, museli byť vyvinuté alternatívne metódy detekcie ich prítomnosti - lyzogénne zóny, tvorba plakov a lýza citlivej kultúry [6,7]. Avšak laboratórne testy na prítomnosť fágov tiež nemusia dať jednoznačné výsledky, pretože u niektorých skupín mikroorganizmov nemáme k dispozícii také citlivé indikátorové kmene, ako je to v prípade *Escherichia coli*.

Fágom spôsobené problémy boli pozorované pri produkcii kyseliny glutámovej, butanol-acetónu, antibiotík, enzýmov, kazeínu, v mäsovom priemysle, vo vinárstve, v pekárstve a v mliekarenskom priemysle. Z produkčných kmeňov bol problém fágovej infekcie zaznamenaný u rodov *Clostridium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptomyces*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* a pod. Mliečne baktérie bývajú najviac postihnuté infekčnými fágmi. Mliečne baktérie využívané pri širokej škále potravín (syrov, jogurtov, mliečnych výrobkov) sú atakované fágmi, čo sa prejaví v kvalite výrobkov (vôňa, chuť, štruktúra, trvanlivosť). Veľmi významná je kontrola fágov v biotechnológiách, ktoré používajú bakteriálne produkčné kmene pre produkciu eukaryotických proteínov ako interferón, inzulín, chymozín, ľudský rastový hormón, hovädzí somatropín, tkanivové aktivátory a pod., ktoré sú veľmi nákladné a kde zlyhanie má za následok veľké ekonomické straty.

V boji proti fágovej infekcii sa musí postupovať komplexne. Personál, vstupný materiál, kvalitné prevzdušňovanie, sterilizácia a sanitácia zariadení pomáhajú znižovať možnosť infekcie fágom. Ďalej je to príprava štartovacej produkčnej kultúry, využitie inhibičných médií proti fágom. Pre mnohé fágy sú nevyhnutné dvojmocné kationy vápnika a horčíka, aby sa mohli prichytiť na povrch buniek. Tieto kationy môžu byť chelátované fosfátmi, citrátmi alebo oxalátom. Ďalej je to využitie protifágových chemikálií (ako napr. neiónové detergenty, antibiotiká, kyselina askorbová, spermin, glutatión a dvojmocné železo) a vývoj kmeňov rezistentných voči fágom. V laboratóriu sa pomerne ľahko získa rezistentný kmeň voči konkrétnemu fágu. Spon-

tánne mutácie prebiehajú v jednej z 10 až 100 tisíc buniek. Avšak takéto mutované bunky sú rezistentné iba voči konkrétnemu fágovi a nie voči širšiemu okruhu fágov. Okrem toho nie je žiadny vzťah medzi rezistenciou voči fágom a produkčnou aktivitou týchto mikroorganizmov, takže fág-rezistentný kmeň nemusí byť produkčne výkonný vo fermentácii. Preto nie je jednoduché získať taký kmeň, ktorý by mal požadované produkčné vlastnosti a okrem toho by bol rezistentný voči širokému spektru fágov. Tu sa využívajú predovšetkým rekombinačné techniky napr. zásah do génov zodpovedných za adsorpciu fága na bunku, zásah do transkripcie a translácie fágovej DNA, využitie restriktívno-modifikačného systému bunky a pod. U niektorých produkčných kmeňov *Lactobacillus* používaných v mliečnych fermentáciách boli transformované plazmidy, ktoré kódujú gény rezistencie voči fágom. Táto metóda bola založená na charakterizovaní génov zodpovedných za rezistenciu voči fágom, vnesenie týchto génov do vhodného hostiteľského kmeňa a selekciu rekombinantov s vysokou expresiou týchto génov a so stabilným prenášaním plazmidu. V inom prípade u produkčného kmeňa *Escherichia coli* pre produkciu inzulínu boli vnesené gény pre restriktívno-modifikačný systém HhaII. Expresiou týchto génov sa dosiahlo podstatné zníženie prežívania fága v bunkách. Ako predvoj budúcich metód bunkovo riadenej rezistencie voči fágom možno považovať experimenty s expresiou antisense mRNA cielene proti niektorým fágovým génom. Celé úsilie smeruje k takej konštrukcii produkčných kmeňov mikroorganizmov, ktoré získajú trvalú rezistenciu voči fágom. Použitie takýchto produkčných kmeňov, sanitácia zariadenia a surovín a stála kontrola procesov počas fermentácie je cestou, ktorá v budúcnosti odstráni negatívny vplyv fágov na fermentačné procesy [93-98].

Autor pripravuje ďalšiu publikáciu týkajúcu sa bakteriofágov a mliečnych fermentácií.

Literatúra

1. SANDMEIER, H. - MEYER, J.: Bacteriophages. In: Biotechnology. Ed. H. J. Rehm et al. Vol. 1. Biological fundamentals. Ed. H. Sahm. 2. vyd. Weinheim, VCH 1993, s. 544-575.
2. CAMPBELL, A. M.: Bacteriophages. In: Fields virology. Ed. B. N. Fields - D. M. Knipe - P. M. Howley et al. 3. vyd. Philadelphia, Lippincott Raven Publishers 1996, s. 587-607.
3. MANILOFF, J. - ACKERMAN, H. W. - JARVIS, A.: Bacteriophage taxonomy and classification. In: Encyclopedia of virology. Vol. 1. Ed. R. G. Websters - A. Granoff. New York, London, Academic Press 1994, s. 93-100.

4. BAMFORD, D. H. - RAMANTSCHUK, M. - SOMERHARJU, P. J.: Membrane fusion in prokaryotes: bacteriophage $\Phi 6$ membrane fuses with the *Pseudomonas syringae* outer membrane. EMBO J., 6, 1987, č. 5, s. 1467-1473.
5. MINDICH, L. - BAMFORD, D. H.: Lipid containing bacteriophages. In: The bacteriophages. Vol. 2. Ed. R. Calendar. New York, Plenum Press 1988, s. 475-519.
6. TURŇA, J. - KRČMÉRY, V. - KETTNER, M. - ANTAL, M. - AUGUSTÍN, J.: Rekombinantné DNA a biotechnológia. Bratislava, Alfa 1990. 689 s.
7. PEITERSEN, N.: Practical phage control. Bull. int. Dairy Fed., 263, 1991, č. 1, s. 1-43.
8. ZINDER, N. D. - LEDERBERG, J.: Genetic exchange in *Salmonella*. J. Bact., 64, 1952, s. 679-699.
9. LENNOX, E. S.: Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. Virology, 1, 1955, s. 190-206.
10. IKEDA, H. - TOMIZAWA, J.: Transducing fragments in generalized transduction by phage P1. III. Studies with small phage particles. J. molec. Biol., 14, 1965, s. 120-129.
11. MARGOLIN, P.: Generalized transduction. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Ed. F. C. Neidhardt. Washington, D.C., American Society for Microbiology 1987, s. 1154-1168.
12. STERNBERG, N. L. - MAURER, R.: Bacteriophage-mediated generalized transduction in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Meth. Enzymol., 204, 1991, č. 1, s. 18-42.
13. WEISBERG, R. A.: Specialized transduction. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Ed. F. C. Neidhardt. Washington, D.C., American Society for Microbiology 1987, s. 1169-1176.
14. KREUZER, N. K.: Bacteriophage recombination. In: Encyclopedia of virology. Vol. 1. Ed. R. G. Webster - A. Granoff. New York, Academic Press 1994, s. 83-92.
15. KÚDELA, O.: Bakteriofágy. In: Všeobecná virológia. Ed. J. Žemla - F. Čiampor - Leššo. Bratislava, SAP 1995, s. 171-178.
16. WILSON, G. G. - MURRAY, N. E.: Restriction and modification systems. A. Rev. Genet., 25, 1991, s. 585-627.
17. HENDRIX, R. W. - ROBERTS, J. W. - STAHL, F. W. - WEISBERG, R. A.: Lambda II. 1988. In: Biotechnology. Ed. H. J. Rehm et al. Vol. 1. Biological fundamentals. Ed. H. Sahm. 2. vyd. Weinheim, VCH 1993, s. 562.
18. SANGER, F. - COULSON, A. R. - HONG, G. F. - HILL, D. F. - PETERSEN, G. B.: Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. J. molec. Biol., 162, 1982, s. 729-773.
19. DANIELS, D. L. - SCHROEDER, J. L. - SZYBALSKI, W. - SANGER, F. - COULSON, A. R. - HOHG, G. F. - HILL, D. F. - PETERSEN, G. B. - BLATTNER, F. R.: Complete annotated lambda sequence. In: Lambda II. Ed. Hendrix et al. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1983, s. 519-576.
20. YEN SEN HO - ROSENBERG, M.: The structure and function of the transcription activator protein cII and its regulatory signals. In: The bacteriophages. Vol. 2. Ed. R. Calendar. New York, Plenum Press 1988, s. 725-756.
21. FRIEDMAN, D. I.: Regulation of phage gene expression by termination and antitermination of transcription. In: The bacteriophages. Vol. 2. Ed. R. Calendar. New York, Plenum Press. 1988, s. 263-319.
22. GUARNEROS, G.: Retroregulation of bacteriophage lambda int gene expression. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 136, 1988, s. 1-19.
23. LANDY, A.: Dynamic structural and replicatory aspects of lambda site-specific recombination. A. Rev. Biochem., 58, 1989, s. 913-949.
24. PTASHNE, M.: A genetic switch. In: Biotechnology. Ed. H. J. Rehm et al. Vol. 1. Biological fundamentals. Ed. H. Sahm. 2. vyd. Weinheim, VCH 1993, s. 562.

25. MURRAY, N. E.: Special uses of lambda phage for molecular cloning. *Meth. Enzymol.*, 204, 1991, s. 280-304.
26. COLLINS, J. - HOHN, B.: Cosmids: A type of plasmid gene-cloning vector that is package-able in vitro in bacteriophage lambda heads. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 75, 1978, s. 4242-4246.
27. HARSHEY, R. M.: Phage Mu. In: *The bacteriophages*. Vol. 1. Ed. R. Calendar. New York, Plenum Press 1988, s. 193-224.
28. PATO, M. L.: Bacteriophage Mu. In: *Mobile DNA*. Ed. D. E. Berg - M. M. Howe. Washington, D.C., American Society for Microbiology 1989, s. 23-52.
29. KOCH, C. - MERTENS, G. et al.: The invertible G segment. In: *Phage Mu*. Ed. N. Symonds et al. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1987, s. 75-91.
30. GLASGOW, A. C. - HUGHES, K. T. - SIMON, M. I.: Bacterial DNA inversion system. In: *Mobile DNA*. Ed. D. E. Berg - M. M. Howe. Washington, D. C., American Society for Microbiology 1989, s. 637-659.
31. GROISMAN, E. A.: In vivo genetic engineering with bacteriophage Mu. *Meth. Enzymol.*, 204, 1991, s. 180-212.
32. STERNBERG, N. - HOESS, R.: The molecular genetics of bacteriophage P1. *A. Rev. Genet.*, 17, 1983, s. 123-154.
33. YARMOLINSKY, M. B. - STERNBERG, N.: Bacteriophage P1. In: *The bacteriophages*. Vol. 1. Ed. R. Calendar. New York, Plenum Press 1988, s. 291-438.
34. MATHEWS, C. K. - KUTTER, E. M. - MOSIG, G. - BERGET, P. B.: Bacteriophage T4. In: *Biotechnology*. Ed. H. J. Rehm et al. Vol. 1. Biological fundamentals. Ed. H. Sahm. 2. vyd. Weinheim, VCH 1993, s. 563.
35. MOSIG, G. - EISERLING, F.: Phage T4 structure and metabolism. In: *The bacteriophages*. Vol. 2. Ed. R. Calendar. New York, Plenum Press 1988, s. 521-605.
36. RASHED, I. - OBERER, E.: Ff coliphages: structural and functional relationship. *Microbiol. Rev.*, 50, 1986, s. 401-427.
37. ZINDER, N. D. - HORIUCHI, K.: Multiregulatory element of filamentous bacteriophages. *Microbiol. Rev.*, 49, 1985, s. 101-106.
38. MODEL, P. - RUSSEL, M.: Filamentous phages. In: *The bacteriophages*. Vol. 2. Ed. R. Calendar. New York, Plenum Press 1988, s. 375-456.
39. GEIDER, K.: DNA cloning vectors utilizing replication functions of the filamentous phages of *Escherichia coli*. *J. gen. Virol.*, 67, 1986, s. 2287-2303.
40. FIERS, W.: RNA bacteriophages. *Comp. Virol.*, 13, 1979, s. 69-204.
41. VAN DUIN, J.: The single-stranded RNA bacteriophages. In: *The bacteriophages*. Vol. 1. Ed. R. Calendar. New York, Plenum Press 1988, s. 117-168.
42. BRYANT, M. P.: Methane producing bacteria. In: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Ed. R. E. Buchanan - N. E. Gibbons. Baltimore, The Wiliams and Wilkins Company 1975, s. 472-477.
43. JORDAN, M. - MEILE, L. - LEISINGER, T.: Organization of *Methanobacterium thermoautotrophicum* bacteriophage Ψ M1 DNA. *Mol. gen. Genet.*, 220, 1989, s. 161-164.
44. MEILE, L. - JENAL, U. - STUDER, D. - JORDAN, M. - LEISINGER, T.: Characterization of Ψ M1 a virulent phage of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Marburg. Arch. Mikrobiol.*, 152, 1989, s. 105-110.
45. LEISINGER, T. - MEILE, L.: Approaches to gene transfer in methanogenic bacteria. In: *Microbiology and biochemistry of strict anaerobes involved in interspecies hydrogen transfer*. Ed. J. P. Belaich - M. Bruschi - J. L. Garcia. New York, Plenum Press 1990, s. 11-23.
46. ISCHIKAWA, T. - TAHARA, T. - HOSHINO, J.: Isolation and characterization of bacteriophages active against methanol-assimilating bacteria. In: *Abstract of II. International*

- symposium on microbial growth on C compounds. Pushchino, USSR Moscow, Nauka 1978, s. 47.
47. OKI, T. - NISHIDA, H. - OZAKI, A.: Deoxyribonucleic acid bacteriophage of *Methanomonas methylovora*. J. Virol., 9, 1972, s. 544-546.
 48. KIESEL, B. - MAMAT, U. - WUNNSCHE, L.: Phagen methylotropher Bakterien. Math. Naturwiss. R., 38, 1989, s. 287.
 49. WUNSCHE, L. - FISCHER, H. - KIESEL, B.: Lysogenie und lysogene Konversion bei methylotrophen Bakterien. I. Nachweis des lysogenen Zustandes des fakultativ methanolassimilierenden Stammes *Acetobacter* MB58/1 und Charakterisierung seines temperenten Phagen MO1. Z. allg. Mikrobiol., 23, 1983, s. 81-94.
 50. WUNSCHE, L. - KIESEL, B. - FISCHER, H.: Lysogenic und lysogene Konversion bei methylotrophen Bakterien. II. Lysogene Konversion bei fakultativ methanolassimilierenden *Acetobacter* Stämmen. Z. allg. Mikrobiol., 23, 1983, s. 189.
 51. COWAN, S. T. - HOLT, J. G. - LISTON, J. - MURRAY, R. G. E. - NIVEN, C. F. - RAVIN, A. W. - STANIER, R. Y.: Endospore forming rods and cocci. In: Bergey's manual of determinative bacteriology. Part 15. Ed. R. E. Buchanan - N. E. Gibbons. Baltimore, The Wilkins and Wilkins Company 1975, s. 529-575.
 52. HEMPHILL, H. E. - WHITELEY, H. R.: Bacteriophages of *Bacillus subtilis*. Bact. Rev., 39, 1975, s. 257-315.
 53. RUTBERG, L.: Temperate bacteriophages of *Bacillus subtilis*. In: Molecular biology of the *Bacilli*. Ed. D. A. Dubnau. New York, Rudberg, Academic Press 1982, s. 247-268.
 54. ZAHLER, S. A.: Temperate bacteriophages of *Bacillus subtilis*. In: The bacteriophages. Vol. 1. Ed. R. Calendar. New York, Plenum Press 1988, s. 559-593.
 55. SALAS, M.: Phages with proteins attached to the DNA ends. In: The bacteriophages. Vol. 1. Ed. R. Calendar. New York, Plenum Press 1988, s. 169-191.
 56. SALAS, M.: Initiation of DNA replication by primer proteins: Bacteriophage F29 and its relatives. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 136, 1988, s. 71-88.
 57. STEWART, C.: Bacteriophage SPO1. In: The bacteriophages. Vol. 1. Ed. R. Calendar. New York, Plenum Press 1988, s. 477-516.
 58. HOET, P. P. - COENE, M. M. - COCITO, C. G.: Replication cycle of *Bacillus subtilis* hydroxymethyluracil-containing phages. A. Rev. Microbiol., 46, 1992, s. 95-116.
 59. DEDONDER, R. A. - LEPESANT-KEJZLAROVA, J. A. - BILLAULT, A. - STEINMETZ, M. - KUNST, F.: Construction of a kit of reference strains for rapid genetic mapping in *Bacillus subtilis* 168. Appl. env. Microbiol., 33, 1977, s. 989-993.
 60. PIGGOT, P. J. - HOCH, J. A.: Revised genetic linkage map of *Bacillus subtilis*. Microbiol. Rev., 49, 1985, s. 158-179.
 61. HOCH, J. A.: Genetic analysis in *Bacillus subtilis*. Meth. Enzymol., 204, 1991, s. 305-320.
 62. THORNE, C. B. - KOWALSKI, J. B.: Temperate bacteriophages for *Bacillus licheniformis*. In: Microbiology. Ed. D. Schlesinger. Washington, D. C., American Society for Microbiology 1976, s. 303-314.
 63. DOSKOČIL, J. - ŠTOKROVÁ, J. - ŠTORCHOVÁ, H. - FORSTOVÁ, J. - MEYER, J.: Correlation of physical maps and some genetic functions in the genomes of the kappa-theta phage family of *Bacillus licheniformis*. Mol. gen. Genet., 214, 1988, s. 343-347.
 64. JARVIS, A. W. - MEYER, J.: Electron microscopic heteroduplex study and restriction endonuclease cleavage analysis of the DNA genomes of three lactic streptococcal bacteriophages. Appl. env. Microbiol., 51, 1986, s. 566-571.
 65. TEUBER, M. - LOOF, M.: Genetic characterization of lactic streptococcal bacteriophages. In: Streptococcal genetics. Ed. J. J. Ferretti - I. R. Curtis. Washington, D. C., American Society for Microbiology 1987, s. 250-258.

66. BRAUN, JR. - HERTWIG, S. - NEVE, H. - GEIS, A. - TEUBER, M.: Taxonomic differentiation of bacteriophages of *Lactococcus lactis* by electron microscopy, DNA-DNA hybridization, and protein profiles. J. gen. Microbiol., 135, 1989, s. 2551-2560.
67. NEVE, H. - TEUBER, M.: Basic microbiology and molecular biology of bacteriophage of lactic acid bacteria in dairies. Bull. int. Dairy Fed., 263, 1991, s. 3-15.
68. TEUBER, M. - GEIS, A. - NEVE, H.: The genus *Lactococcus*. In: The prokaryotes. 2. vyd. Ed. A. Balows et al. New York, Springer Verlag 1992, s. 1482-1501.
69. DAVIDSON, B. E. - POWELL, I. B. - HILLIER, A. J.: Temperate bacteriophages and lysogeny in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 87, 1990, s. 79-90.
70. OGATA, S. - HONGO, M.: Bacteriophages of the genus *Clostridium*. Adv. appl. Microbiol., 25, 1979, s. 241-273.
71. NIEVES, B. M. - GIL, F. - CASTILLO, F. J.: Growth inhibition activity and bacteriophage and bacteriocin-like particles associated with different species of *Clostridium*. Can. J. Microbiol., 27, 1981, s. 216-225.
72. REID, S. J. - ALLOCK, E. R. - JONES, T. D. - WOODS, D.: Transformation of *Clostridium acetobutylicum* protoplasts with bacteriophage DNA. Appl. envir. Microbiol., 45, 1983, s. 305-307.
73. SCHALLEN, G. - EKLUND, M. W.: Conversion of *Clostridium novyi* type D (*Clostridium haemolyticum*) to alpha toxin production by phages of *C. novyi* type A. FEMS Microbiol. Lett., 7, 1980, s. 83-86.
74. SELL, T. L. - SCHABERG, D. R. - FEKETY, D. R.: Bacteriophage and bacteriocin typing scheme for *Clostridium difficile*. J. clin. Microbiol., 54, 1983, s. 69-73.
75. BISHAI, W. R. - MURPHY, J. R.: Bacteriophage gene products that cause human disease. In: The bacteriophages. Vol. 2. Ed. R. Calendar. New York, Plenum Press 1988, s. 683-723.
76. CANARD, B. - COLE, S. T.: Lysogenic phages of *Clostridium perfringens*: mapping of the chromosomal attachment sites. FEMS Microbiol. Lett., 66, 1990, s. 323-326.
77. ROOD, J. I. - COLE, S. T.: Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. Microbiol. Rev., 55, 1991, s. 621-648.
78. ROTHMEL, R. K. - CHAKRABARTY, A. M. - BERRY, A. - DARZINS, A.: Genetic system in *Pseudomonas*. Meth. Enzymol., 204, 1991, s. 485-514.
79. FRANKLIN, R. M.: Structure and synthesis of bacteriophage PM2 with particular emphasis on the viral lipid bilayer. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 68, 1974, s. 107-159.
80. GOTTLIEB, D.: Order *Actinomycetales*. In: Bergey's manual of determinative bacteriology. Ed. R. E. Buchanan - N. E. Gibbons. Baltimore, The Wilkins and Wilkins Company 1975, s. 657-881.
81. LOMONOVSKAYA, N. D. - CHATER, K. F. - MKRTUMIAN, N. M.: Genetics and molecular biology of *Streptomyces bacteriophages*. Microbiol. Rev., 44, 1980, s. 206-229.
82. CHATER, K. F.: *Streptomyces* phages and their application to *Streptomyces* genetics. In: The bacteria. Vol. 9. Antibiotic-producing *Streptomyces*. Ed. J. R. Sokatch et al. Orlando, Academic Press 1986, s. 119-158.
83. VATS, S. - STUTTARD, C. - VINING, L. C.: Transductional analysis of chloramphenicol biosynthesis genes in *Streptomyces venezuelae*. J. Bact., 169, 1987, s. 3809-3813.
84. CHUNG, S. T.: Isolation and characterisation of *Streptomyces fradiae* plasmids which are prophages of the actinophage Φ SF1. Gene, 7, 1982, s. 239-246.
85. KIESER, T. - HOPWOOD, D. A.: Genetic manipulation of *Streptomyces*: integrating vectors and gene replacement. Meth. Enzymol., 204, 1991, s. 430-458.
86. PATEK, M. - LUDVIK, J. - BENADA, O. - HOCHMANNOVÁ, J. - KRUMPHANZL, V. - BUČKO, M.: New bacteriophage-like particles in *Corynebacterium glutamicum*. Virology, 140, 1985, s. 360-363.

87. TRAUTWETTER, A. - BLANCO, C. - SICARD, M.: Structural characteristic of the *Corynebacterium lilium* bacteriophage CL31. J. Virol., 61, 1987, s. 1540-1545.
88. TRAUTWETTER, A. - BLANCO, C. - BONNASSIE, S.: Characterization of the corynebacteriophage CG33. J. gen. Microbiol., 133, 1987, s. 2945-2952.
89. TRAUTWETTER, A. - BLANCO, C.: Isolation and preliminary characterization of twenty bacteriophages infecting either *Brevibacterium* or *Arthrobacter* strains. Appl. envir. Microbiol., 54, 1988, s. 1466-1471.
90. SONNEN, H. - SCHNEIDER, J. - KUTZNER, H. J.: Characterization of Φ GA1, an inducible phage particle from *Brevibacterium flavum*. J. gen. Microbiol., 136, 1990, s. 567-571.
91. SONNEN, H. - SCHNEIDER, J. - KUTZNER, H. J.: Corynephage Cog a virulent bacteriophage of *Corynebacterium glutamicum* and its relations to Φ GA1, an inducible phage particle from *Brevibacterium flavum*. J. gen. Virol., 71, 1990, s. 1629-1633.
92. SONNEN, H.: Molekulargenetische Charakterisierung von Phagen-Wirt-Beziehungen bei coryneformen Aminosäure-Produzenten. In: Biotechnology. Ed. H. J. Rehm et al. Vol. 1. Biological fundamentals. Ed. H. Sahm. 2. vyd. Weinheim, VCH 1993, s. 569.
93. JARVIS, A. W.: Bacteriophages of lactic acid bacteria. J. Dairy Sci., 72, 1989, s. 3406.
94. KLAENHAMMER, T. R.: Interactions of bacteriophages with lactic streptococci. Adv. appl. Microbiol., 30, 1984, s. 1.
95. OGATA, S.: Bacteriophage contamination in industrial processes. Biotechnol. and Bioengng, 22, 1980, s. 177.
96. SANDERS, M. E.: Bacteriophages of industrial importance. In: Phage Ecology. Ed. S. M. Goyal - C. P. Gerba - G. Bitton. New York, John Wiley and son 1987, s. 211.
97. SANDERS, M. E.: Phage resistance in lactic acid bacteria. Biochimie, 70, 1988, s. 411.
98. SANDERS, M. E.: Bacteriophages in industrial fermentations. In: Encyclopedia of virology. Vol. 1. Ed. R. G. Websters - A. Granoff. New York, Academic Press 1994, s. 116-121.
99. MAČOR, M. - VIZVÁRYOVÁ, M. - TURŇA, J.: Využitie bakteriofága P1 pri in vivo klonovaní. Bull. potrav. Výsk., 36, 1997, č. 3, s. 191-200.

Do redakcie došlo 14.5.1997.

Bacteriophages and industrial fermentations

MAČOR, M.: Bull. potrav. Výsk., 36, 1997, p. 171-190

SUMMARY. Basic characteristics of bacteriophages: morphology, structure of nucleic acids, hosts receptors, phage adsorption, injection of nucleic acids, replication of phage genomes and expresion of phade genes are listed. Further, a concise classification of bacteriophages and their role in lytic and lysogenic cycle is given. By the end of the article, the role of bacteriophages in biotechnological process and review of individual groups of the most significant bacteriophages are characterized.