



Doctoral Thesis

Kritische Bewertung und Optimierung der Spot- und Plaque- sowie der MPN-Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Phagen thermophiler Laktobazillen

Author(s):

Schluep, Konrad

Publication Date:

1992

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000692873> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH Nr. 9949

**Kritische Bewertung und Optimierung der
Spot- und Plaque- sowie der MPN-Methode
zum qualitativen und quantitativen
Nachweis von Phagen thermophiler Laktobazillen**

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels
DOKTOR DER TECHNISCHEN WISSENSCHAFTEN
der
EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
Zürich

vorgelegt von
KONRAD SCHLUEP
Dipl. Lm.-Ing. ETH
geboren am 13. Januar 1960
von Nennigkofen / SO

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. Z. Puhan, Referent
Dr. H. Spillmann, Korreferent

Zürich 1992

ZUSAMMENFASSUNG

Eine zuverlässige und praxisnahe Nachweismethode für die ubiquitär vorkommenden Bakteriophagen ist speziell für die Fermentationsindustrie ein vordringliches Anliegen. Mit der vorliegenden Arbeit werden die Phagen-Bakterien-Wechselbeziehungen und ihre Auswirkungen auf die Optimierung der Plaque- bzw. Spot- sowie der MPN-Methode mit Phagen von *Lb. delbrueckii subsp. lactis* (= *Lb. lactis*) und *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* (= *Lb. bulgaricus*) untersucht.

Gemäss der morphologischen Charakterisierung nach Bradley (1967) gehören die in dieser Arbeit verwendeten *Lb.-lactis*- und *Lb.-bulgaricus*-Phagen, mit einer Ausnahme (*P33* = B2), zum Morphologietyp B1. Die weitere Unterteilung in Gruppen gemäss Cogan & Accolas (1990) zeigte, dass die Phagen *P402* bis *P404*, *Plv* und *PLL-H* zu der grössten Gruppe a, die Phagen *P401* bzw. *P33* als einzige zur Gruppe b resp. c und *POb*, *P29*, *P36* und *P37* zur Gruppe d gehören. Als Teststämme dienten 7 Vertreter der Laktobazillenarten *Lb. lactis* und *Lb. bulgaricus*.

Die Bestimmung der Latenzperiode und Wurfgrösse ergab für das Phagen/Wirt-Paar *P402/S402* (*Lb. lactis*) Werte von 45 min und 30 bzw. für *POb/S839* (*Lb. bulgaricus*) von 25 min und 28. Bei den acht geprüften Phagen/Wirt-Kombinationen resultierten Adsorptionsraten von 50 bis 95 %. Die unerwartet hohen Adsorptionsraten bei Paaren mit schlechter Plaquebildung weisen darauf hin, dass nicht die ungenügende Adsorptionsfähigkeit des Phagen für die fehlende oder unbefriedigende Plaquebildung auf der Platte verantwortlich ist.

Die Untersuchung über den Einfluss von diversen Faktoren auf die Phagenvermehrung zeigte auf, dass je nach Phagen/Wirt-Paar unterschiedliche Temperatur- bzw. Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Abhängigkeiten bestehen. Allgemein hat sich jedoch eine Temperatur von 40 °C (mindestens 45 °C bei Stämmen mit Abi^+ -System) und eine Ca^{2+} bzw. Mg^{2+} -Konzentration von 10 mM bewährt. Bei Versuchen zur pH-Empfindlichkeit unterschieden sich die beiden geprüften Phagen/Wirt-Paare nur geringfügig und verloren

unterhalb des kritischen pH-Wertes von 4,5 die Fähigkeit zur Phagenreplikation.

Versuche zur Optimierung des relativ aufwendigen MPN-Testes, der jedoch gegenüber den Platten-Methoden eine bessere Nachweisempfindlichkeit aufweist, haben deutlich gezeigt, dass erst eine mehrstufige Durchführung zu zuverlässigen Resultaten führt. Bei den hier untersuchten Laktobazillen-Stämmen und -Phagen konnte im besten Falle erst nach mindestens 3 Folgeinkubationen (d.h. Ueberimpfen der nicht-lysierten Proben) der richtige Phagentiter (kein Anstieg in der Folgeinkubation) erreicht werden. Als optimal erwies sich im weiteren eine Impfmenge von 0,1 % einer jungen Arbeitskulturer in der 1. Inkubation bzw. von 1 % bei den Folgeinkubationen, eine Temperatur von 40 °C und eine Dauer von 15 h für die 1. Inkubation bzw. von 7 h für die Folgeinkubationen.

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit bestand in der Verbesserung der Agar-Doppelschicht-Methoden (Spot- und Plaque-Test), die bis anhin bei Phagen thermophiler Laktobazillen, im Vergleich zum MPN-Test, wiederholt unbefriedigende Resultate ergaben. Zu diesem Zwecke erfolgten Abklärungen zu verschiedenen Einflussfaktoren, die einerseits während der Adsorptions- und andererseits während der Inkubationsphase wirksam werden. Dabei hat sich die grosse Bedeutung einer optimalen Adsorptionsphase deutlich manifestiert. Im Gegensatz zur Adsorptionsdauer und -temperatur, die im geprüften Bereich von 5 bis 30 min bzw. 4 bis 45 °C zu keinem Unterschied führte, liessen Versuche mit unterschiedlichen Agar- bzw. Gelatinekonzentrationen im Adsorptionsmedium jedoch einen negativen Einfluss der zunehmenden Viskosität erkennen. Aufgrund der verminderten Trefferwahrscheinlichkeit wirkte sich eine Bakterienkonzentration von niedriger als 3×10^7 cfu/ml negativ auf den Adsorptionsvorgang aus. Eine Impfmenge von ca. $1,5 \times 10^6$ cfu/ml Weichagar führte bei anaerober Inkubation zu einem für die Plaquebildung idealen Bakterienrasen. Generell brachte die Reduktion der Glucosemenge im Nährmedium und die aerobe Inkubation, mit Ausnahme bei starken Säurebildnern, keine deutlichen Verbesserungen. Beim direkten Vergleich von drei verschiedenen Plaque-Methoden war die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und als ADS bezeichnete Variante, die sich unter anderem durch den in Bouil-

lon sowie bei einer, im Vergleich zur NORM-Methode (Adsorption direkt im Weichagar mit Bakterienendkonzentration) 10-fach höheren Bakterienkonzentration stattfindenden Adsorptionsvorgang unterscheidet, den beiden andern in qualitativer Hinsicht (grössere und deutlichere Plaques) überlegen.

Interessante Aspekte in Bezug auf die Methodik des Phagennachweises lieferten die Versuche mit Stämmen, die über die Phagenabwehrmechanismen "Restriktion/Modifikation" (R/M) und "abortive Infektion" (Abi⁺) verfügten. Es wurde deutlich, dass die genetischen Besonderheiten der Wirtsstämme vor allem bei den einstufigen Platten-Verfahren, im Gegensatz zum mehrstufig durchführbaren MPN-Test, eruiert und die Methoden entsprechend adaptiert werden müssen. Erst dann können mit den, bezüglich anderer Parameter (z.B. Ca²⁺, Temperatur) bereits optimierten Methoden vollends zuverlässige und interpretierbare Resultate erhalten und falsch negative Ergebnisse ausgeschlossen werden.

Summary

Critical Evaluation and Optimization of the Spot-, Plaque- and MPN-method for the Qualitative and Quantitative Detection of Bacteriophages of Thermophilic Lactobacilli

For the fermentation industry, reliable and practical methods for the detection of bacteriophages are of great importance. The objective of this study was to examine the phage/bacteria interrelationship and its consequences for the optimization of the plaque- resp. spot-method as well as of the MPN-method with phages of the *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* (= *Lb. lactis*) and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (= *Lb. bulgaricus*).

According to the morphological characterisation of Bradley (1967), all of the examined *Lb.-lactis*- and *Lb.-bulgaricus*-phages, with the exception of *P33* (=B2), belonged to morphological type B1. The further subdivision according to Cogan & Accolas (1990) showed that phages *P402* - *P404*, *Plv* and *PLL-H* belonged to the largest group a, the phages *P401* resp. *P33* to group b resp. c, and *POb*, *P29*, *P36* and *P37* to group d. As host 7 representative strains of *Lb. lactis* and *Lb. bulgaricus* were chosen.

The latent period and the burst size were found to be 45 min and 30 for the phage/host-pair *P402/S402* resp. 15 min and 28 for the pair *POb/S839*. The adsorption rates of eight phage/host-combinations reached from 50 % to 95 %. The unexpected high adsorption rates of pairs with no distinct plaquing abilities have shown that the missing or unsatisfactory plaque formation on the agar-plate is not the result of a poor adsorption rate.

Trials investigating the influence of different factors on the replication of phages such as temperature, Ca^{2+} and Mg^{2+} is not the same for the different phage/host-pair. Generally, a temperature of 40 °C and at least 45 °C for strains with an "abortive infection"-system (Abi^+) and Ca^{2+} - resp. Mg^{2+} -concentrations of 10 mM were the most suitable. pH-sensitivity tests with the two phage/host-pairs mentioned above, showed only small

differences. Below the critical pH-value of 4.5, no phage replication was detectable.

Experiments to optimize the rather time- and material-consuming MPN-test revealed that the results are only reliable when they are carried out in multiple stages. The examined lactobacilli-strains and lactobacilli-phages are needed three successive incubations, i.e. prolonged inoculation of the non-lysed samples, in order to obtain reliable results. Ideal conditions were an inoculum of 0.1 % of a young culture (0.1 %, 16 h, 40 °C) for the 1st resp. 1 % for all following incubations. An incubation temperature at 40 °C and a duration of 15 h for the 1st, resp. 7 h for the following incubations.

The primary objective of this work was the improvement of the agar-double-layer-methods (spot-test and plaque-test), which up to now are not satisfactory for the detection of phages of the thermophilic lactobacilli, compared with the MPN-test. Therefore, the influence of various factors, which have an effect in the adsorption- resp. the incubation stage, have been tested. Beyond all doubt, the examinations confirmed the great importance of ideal adsorption conditions. In contrary to the duration and temperature of the adsorption stage, which did not differ in the tested range of 5 min to 30 min resp. 4 °C to 45 °C, a rising agar- and gelatine concentration of the adsorption medium influenced the adsorption step via the higher viscosity adversely. Concentrations of bacteria below 3.0×10^7 cfu/ml had a negative effect on the adsorption process (reduced probability of hitting events between phages and bacterias). The inoculation of approx. 1.5×10^6 cfu/ml soft agar led to an ideal bacterial lawn for the plaque formation under anaerobic conditions. Generally, a reduced glucose concentration in the medium or aerobic incubation conditions resulted in no significant improvement of the plaquing ability, with the exception of some fast acid-producing hosts. The direct comparison of three plaque-methods showed that with the ADS-method (adsorption in broth medium, 10 times higher concentration of bacteria) qualitatively the best results can be.

Experiments with host strains possessing the phage defense system Abi^+ and/or restriction/modification (R/M) revealed that the genetic characteri-

stics of the host strains should be known when adapting the methods for phage determination. This is particularly important for plate methods as single-stage procedures, in contrary to the MPN-test, which can be carried out in multiple stages. Only in such a way it is possible to eliminate false negative results and to detect phages present.