

Afslutningsrapport

Diagnosticering af bakteriofaginificerede celler i syrningsprocesser

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2007-85

Februar 2007



mejeriforeningen

danish dairy board

Diagnosticering af bakteriofaginificerede celler i syrningsprocesser

Projektleder:

Professor Peter Ruhdal Jensen
Center for Mikrobiel Bioteknologi
BioCentrum-DTU
Bygning 301
2800 Kgs. Lyngby
Tlf.: +45 4525 2510
Fax: +45 4593 2809
E-mail: prj@biocentrum.dtu.dk

Øvrige projektmedarbejdere:

Lektor Ole Michelsen
Laborant Bjarne Albrechtsen

Projektperiode:

1. august 2003 – 31. december 2006.

Finansieringskilder:

Mejeribrugets ForskningsFond
DFFE, innovationsloven

Sammendrag af projektets formål:

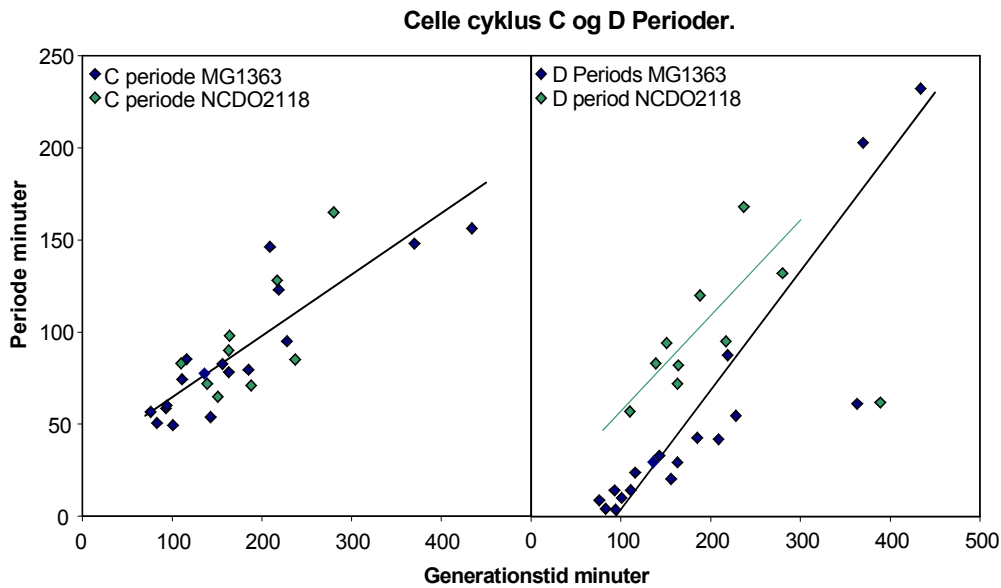
Formålet med projektet er at følge udviklingen af bakteriofager i syrningsprocesser med henblik på online-detektion af fager på et så tidligt tidspunkt, at det vil være muligt at gribe ind og redde syrningsprocessen. I nærværende projekt er der blevet fokuseret på de ændringer, der sker i de angrebne mælkesyrebakterieceller.

Projektet skal kortlægge, hvordan mælkesyrebakteriers størrelse, vækst, DNA-indhold og energitilstand ændres gennem syrningsforløb, og hvilke ændringer der optræder i forbindelse med bakteriofagangreb. Til dette formål anvendes flowcytometer til monitoring af størrelse, DNA-indhold og ændringer i membranpotentialet, hvorved der opnås sammenhørende værdier for hver enkelt celle.

Projektets resultater og konklusion:

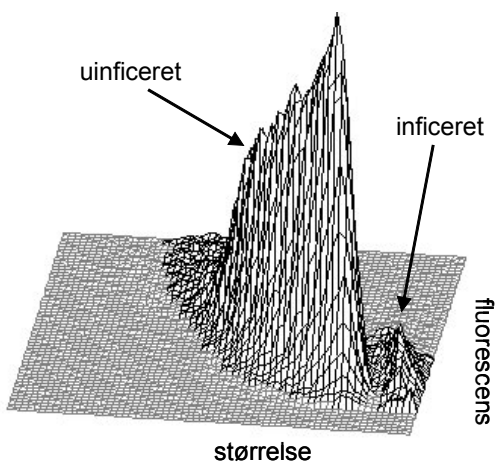
Det er blevet vist, at *Lactococcus lactis* kan undersøges flowcytometrisk, da bakterierne kæder lader sig bryde ved kraftig rystning. Traditionelt undersøges cellecyklus ved hjælp af hæmning af initieringen af DNA-replikationen med rifampicin. Men dette trick, som virker for andre bakterier, lod sig ikke foretage for *Lactococcus*. Der blev derfor skiftet til langsomt voksende kulturer, hvorved cellecyklus kan undersøges direkte på eksponentielt voksende bakterier. Det blev her fundet, at *Lactococcus lactis*' cellecyklus umiddelbart minder om, hvad der er kendt fra andre bakterier. Ved undersøgelse af cellecyklus, er nogle af de parametre, der er af interesse mht. længden af cellecyklusperioderne B, C og D. B-perioden er den periode, hvor cellen efter delingen forbereder initieringen af DNA-syntesen. C-perioden er den periode, hvor DNA-syntesen finder sted. D-perioden er den periode, hvor cellen forbereder den efterfølgende celledeling.

Disse perioders længde er undersøgt for laboratoriestammen MG1363 og NCDO2118, der er isoleret fra frosne ærter. I begge stammer havde perioderne diskrete værdier med en i forhold til generationstiden, ringe spredning, hvilket viser, at DNA-syntesen foregår på et fast tidspunkt i cellecyklus i forhold til delingen. Dette antyder, at DNA-syntesen i lighed med, hvad der er fundet hos andre bakterier, initieres ved en fast cellemasse (initieringsmassen). Dette har betydning ved hurtigere væksthastigheder, hvor bakterierne har overlappende cellecykli. Figur 1 viser sammenhængen mellem generationstid og C- og D-periodernes længde for de to *Lactococcus lactis* stammer, MG1363 og NCDO2118.

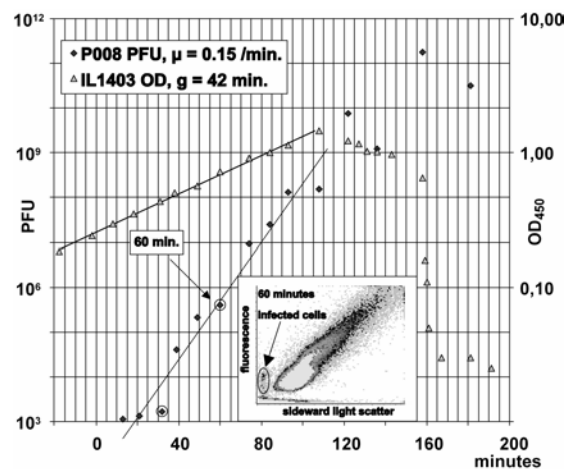


Figur 1. Sammenhængen mellem generationstid og C- og D-periodernes længde for de to *Lactococcus lactis* stammer, MG1363 og NCDO2118. På trods af en del spredning ses for begge stammer en tendens til at både C- og D-perioderne øges med stigende generationstid.

Undersøgelse af langsomt voksende kulturer viste, at de to laboriestedammer MG1363 og IL1403 samt nogle mejeristammer var diploide, hvorimod NCDO2118 og flere mejeristammer var haploide. Det er ukendt, hvad der har bevirket selektion af diploide stammer under domesticeringen af lakto-kokker. Vi har vist, at de diploide er dobbelt så store som de haploide. Dette må forventes at øge deres chance for at blive tilbageholdt i ostemassen under filtreringen efter syrningen, og en sådan opkoncentrering i ostemassen kan derfor forstærke effekten af en god egenskab, som for eksempel god aromadannelse. Ændring fra haploid til diploid af en bakterie, der allerede har en ønsket egenskab, kan således forstærke denne egenskab.



Figur 2. Figuren viser en blanding af 95% uinficerede og 5% fagininficerede bakterier.



Figur 3. Figuren viser forsøg med infektion af IL1403 med fagen P008. Detektionen af 0,2% inficerede celler ses 60 minutter efter, at kulturen blev inficeret

Diagnosticering af faginfektion i starterkulturer blev undersøgt med de to laboratoriestammer, MG1363 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* og IL1403 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, som modelstammer. Med MG1363 blev fagen c2 type c2 anvendt og med IL1403 blev fagen P008 type 936 anvendt. Yderligere blev der undersøgt 6 type 936 fager og 1 type P335 fag på mejeristammen W34. Disse sidste fager var fra Jytte Josephsens samling.

Diagnosticeringen bygger på en primær observation gjort på MG1363 inficeret med c2 fagen. Det blev fundet, at bakterier fra den fase i infektionen, hvor vækstkurven er påvirket, i flowcytometret blev set som enkeltceller med en lav, ca. 30% af normal, lysspredning (Figur 2+3). Fluorescensen, der også blev målt, var fra en fluorescerende DNA-farvning, der her bruges for at bringe cellerne fri af baggrunden.

Derefter blev udført forsøg med MG1363, hvor detektion af faginficerede bakterier blev forsøgt, før vækstkurven var påvirket. Det blev fundet, at de inficerede celler kunne ses 80 minutter før, vækstkurven knækkede. Bakterierne i området med inficerede celler udgjorde 2% af alle talte celler i cytogrammet. Ud fra bestemmelse af antallet af fager på dette tidspunkt kunne det beregnes, at mellem 40 og 80% af alle inficerede celler blev spottet.

Ved efterfølgende forsøg med infektion med fagen, P008, i IL1403 blev detektionsgrænsen yderligere undersøgt ved hyppigere prøvetagning. Her fandtes, at det var muligt at se de inficerede bakterier, da de udgjorde ned til 0,2% af de optalte bakterier. Denne detektion skete i slutningen af anden faggeneration i kulturen, på et tidspunkt, hvor alle inficerede bakterier var umiddelbart foran lysis. Derfor blev stort set alle (mere end 90%) inficerede bakterier detekteret.

Derefter blev detektion af en række 936 fager fra Jytte Josephsens samling undersøgt. Disse fager inficerer mejeristammen W34. Forsøgene viste, at det også her var muligt at opnå tidlig detektion af de inficerede bakterier. Der blev gjort en yderligere observation. På grund af, at W34 vokser i lidt længere kæder end MG1363, blev det set, at den første effekt af en faginfektion var, at bakterierne ændredes fra celler i kæde til enkeltceller. Denne effekt blev først noteret efter, at de første inficerede celler blev observeret, idet inficerede enkeltceller med normal lysbrydning ikke kan skelnes fra normale uinficerede celler. Antallet af celler, der optrådte i området med inficerede celler i cytogrammet, steg i begyndelsen af infektionen til ca. 4% af totalt talte celler; men holdt sig derefter næsten konstant indtil den fase, hvor vækstkurven blev afficeret. Dette indikerer, at perioden med lav lysspredning er en forholdsvis kort periode, før den inficerede celle lyses.

Det er således klart, at det er muligt at detektere faginfektion i en starterkultur på et tidligt tidspunkt før andre parametre indikerer dette. Detektionen vil kunne ske så tidligt som når 0,2% af bakterierne er i den faser af infektionen umiddelbart før lysis, skønsmæssigt ca. 20% af infektioncyklus. Det betyder, at når ca. 1% af bakterierne er inficeret, kan detektion af infektionen finde sted.

Under projektet blev det desuden undersøgt, om andre parametre kunne bruges til detektion af faginfektion.

1. Undersøgelse af internt pH. Der blev ikke fundet ændringer af internt pH under infektionen.
2. Undersøgelse af membranpotentiale. Det blev konstateret, at det var muligt at få et potentialeafhængigt signal, men at signalet ikke var tilstrækkeligt stabilt og heller ikke tilstrækkeligt stort til, at det kunne bruges til detektion af faginfektion.
3. Undersøgelse af bakteriernes proteom under faginfektion. Der blev ikke fundet noget enkelt bakterieprotein, der ændredes tilstrækkeligt til, at det kunne bruges som indikator på infektion.
4. Undersøgelse af bakteriens transkriptom under faginfektion. Resultatet er ikke kommet tilbage fra det firma, der skulle lave selve analysen.

Engelsk sammendrag:

The purpose of the project has been to find new methods for detecting bacteriophage attacks in dairy fermentation processes. The project has approached this from an entirely new angle: Instead of looking directly for the bacteriophages, which requires knowledge of which phage will attack, we have looked for changes in the bacterial cells. The advantage is that such a method, based on changes in the cell morphology, is more likely to be of a more general nature and thus be independent of the phages attacking. Using flowcytometry, we have been able to show that cells, which are attacked by phages, strongly change their light scattering properties. These findings can then be used to identify small subpopulations of infected cells in the magnitude of 1%. The method has been shown to work for a large number of different phages and, by using a milk-clearing reagent, to be applicable also directly to milk samples.

Investigations on the DNA replication of *Lactococcus* revealed that some *Lactococcus* strains, including dairy starter cultures, are diploid, others are haploid like other bacterial species. This is probably a result of the domestication since the natural isolate of *Lactococcus*, NCDO2118, was found to be haploid, but is unclear why such a selection might have been advantageous. However, we discovered that the diploid cells are twice as big as the haploid cells and it can be speculated that the diploid cells to a greater extent will be retained in the cheese matrix during filtration. Since this may in turn affect the ripening properties, screening starter cultures for ploidity may then provide a tool for affecting cheese ripening.

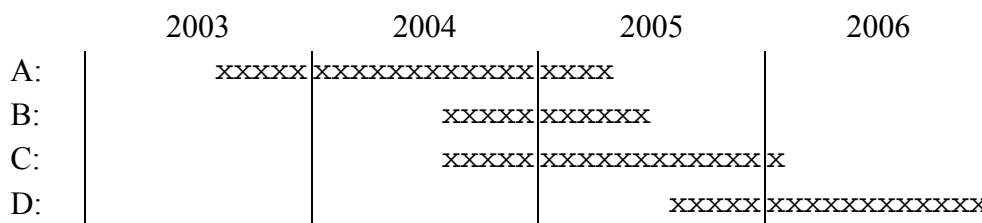
Uddybende beskrivelse af projektets faglige forløb:

Projektperiode: 1. august 2003 – 31. december 2006

Projektet var inddelt i 4 faser:

- A. Undersøgelse af cellefysiologiske og -morfologiske ændringer gennem syrningsforløb og under faginfektion.
- B. Undersøgelse af faginfektionens indflydelse på værtsbakteriens transkriptom og proteom
- C. Alternative detektionsmetoder for faginficerede celler
- D. Online overvågning af bakteriofager i syrningsprocesser

Faserne fordelte sig som følger:



Overordnet formål:

Formålet med projektet er at følge udviklingen af bakteriofager i syrningsprocesser med henblik på online-detektion af fager på et så tidligt tidspunkt, at det vil være muligt at gribe ind og redde syrningsprocessen. I nærværende projekt vil der blive fokuseret på de ændringer, der sker i de angrebne mælkesyrebakterieceller.

Projektet vil kortlægge, hvordan mælkesyrebakteriers størrelse, vækst, DNA-indhold og energitilstand ændres gennem syrningsforløb og hvilke ændringer der optræder i forbindelse med bakteriofag angreb. Til dette formål vil blive anvendt flowcytometer til monitorering af størrelse DNA-indhold og ændringer i membranpotentialet, hvorved der opnås sammenhørende værdier for hver enkelt celle.

Faser/aktiviteter:

A. Undersøgelse af cellefysiologiske og -morfologiske ændringer gennem syrningsforløb og under faginfektion

Formål:

Projektet bygger på den observation at faginficerede celler giver anledning til mindre lysspredning samtidig med en relativt høj fluorescens og dermed en unik placering i flowcytogrammet.

I denne fase undersøges hvad der er årsagen til dette fænomen, i form af hvilke makromolekylære komponenter der evt. er ændret i disse celler: er der mere eller mindre protein, RNA, osv.

Gennemførelse:

Gennemførelsen har været tilfredsstillende.

Fasens tidsforløb blev ændret i forhold til det planlagte på grund af den ret opsigtvækkende opdagelse, at den anvendte stamme MG1363 er diploid. Dette har ført til en fokusering på dette aspekt – med undersøgelse af en række forskellige stammer for deres ploiditet.

Overordnet har det vist sig, at *Lactococcus lactis* har et initieringsorigin per kromosom, og at initieringstidspunktet for deres DNA-syntese i cellecyklus afhænger af væksthastigheden. Inden for projektets rammer er der foretaget en tilfredsstillende undersøgelse af DNA-replikationen i *Lactococcus lactis*. Med hensyn til ændringen i lysspredning under fagininfektion er det sandsynliggjort, at den skyldes nedbrydning af cellevæggen umiddelbart før lysis.

Resultater:

For at undersøge, hvordan spredningen i cellernes DNA indhold påvirkes af væksthastigheden, blev det undersøgt, hvor mange kromosomækvivalenter, mælkesyrebakterierne indeholder ved forskellige væksthastigheder, om mælkesyrebakterierne initierer DNA-syntese synkront, om cellerne indeholder flere replikationsstartpunkter, mv. Ved hjælp af en CellFacts II hos producenten blev det vist, at bakteriofaginificerede bakterier ikke havde ændret cellevolumen. Det er fundet, at det er muligt at bryde de kæder, bakterierne danner ved hjælp af kraftig rystning. Der blev fundet en forøgelse af kolonitallene på op til 50% afhængig af vækstbetingelserne.

Undersøgelse af DNA-replikation under rifampicin-hæmning viste, at *Lactococcus lactis* ikke færdiggør sin DNA-replikation under tilstedeværelse af rifampicin. Det blev undersøgt, om dette skyldtes mangel på deoxyribonucleosider. Selv efter tilsætning af ekstra deoxynucleosider blev DNA-replikationen ikke færdiggjort.

Ved et kinetikforsøg blev det vist, at *Lactococcus lactis* ikke, som forventet i lighed med andre bakterier, er hæmmet i initieringen af DNA-replikationen under rifampicin-hæmning; men derimod gennemførte en fordobling af DNA-mængden i de enkelte celler. Den resulterende fordeling var identisk med den oprindelige kun med den forskel, at cellerne indeholdt dobbelt så meget DNA, som cellerne før tilsætning af rifampicin. Dette resultat viser, at *Lactococcus lactis*' DNA-replikation er kontrolleret på en måde, der er forskellig fra, hvad der er kendt fra andre bakterier.

Ved at undersøge langsomt voksende kulturer af *Lactococcus lactis* opnåedes den forventede flowcytometriske fordeling af nydannede celler med ikke replikerende kromosomer, celler med replikerende kromosomer og celler med færdigt replikerende kromosomer. Denne fordeling blev

reproduceret i fluorescensmikroskopet, og det er vist, at fordelingen stammer fra enkeltceller og ikke fra kæder.

Radioaktiv bestemmelse af DNA-indhold viste, at de nyfødte celler indeholdt DNA svarende til 2,0 af *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*-genomer. Det kan derfor konkluderes, at den anvendte stamme MG1363 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* er diploid ved langsom vækst (generationstider > 2 timer ved 30° C), dvs. at den indeholder to ikke-replikerende kromosomer lige efter celledelingen. Dette resultat er blevet yderligere undersøgt, og resultatet er blevet bekræftet ved analyse af de flowcytometriske DNA-histogrammer, idet det ved resolvering af histogrammerne i de tre celle-cykliske perioder, B, C og D, altid blev fundet, at der var afvigelse fra det forventede i midten af histogrammerne. Disse uoverensstemmelser er vist at kunne forklares ved, at der i en diploid stamme bør opstå celler med tre kromosomer, idet en mindre del af en population vil undlade at initiere på begge replikationsorigin. Tilstedeværelsen af bakterier med tre kromosomer underbygger således antagelsen af, at *L. lactis* MG1363 er diploid. Ligeledes vil celler med tre kromosomer ved delingen give anledning til en celle med to kromosomer og en celle med kun et kromosom. Omhyggelig analyse af histogrammerne viser, at disse celler med et kromosom også er til stede, og da der samtidig registreres både masse (lysspredning) af cellerne og DNA i cellerne, kan det ses, at disse celler med et kromosom umiddelbart efter delingen starter en omgang DNA-replikation, således at der opnår to kromosomer, som de andre celler i kulturen derfor er i stand til at initiere DNA-replikation yderligere en gang i samme cellecyklus.

Det er vist, at *Lactococcus lactis*' hæmning med rifampicin er forskellig fra den tidligere studerede bakterie, *Escherichia coli*. Det er derfor ikke muligt at undersøge DNA-indhold og syntese-regulering ved den metode, der blev forsøgt i starten af projektet. Dette resultat førte til undersøgelse af den "vilde" laktokok, NCDO2118, der er isoleret fra frosne ærter. Denne undersøgelse viste, at NCDO2118 er haploid under de samme betingelser.

Derefter blev en række forskellige *Lactococcus lactis*-stammer undersøgt for diploiditet. I første omgang mejeristammerne fra "NCDO712 familien", hvor MG1363 er isoleret fra mejeristammen NCDO712. Derudover blev undersøgt den sekventerede IL1403 samt dennes ophav IL594 og mejeristammen FHYC-1. Tilsammen er følgende stammer fundet at være diploide under langsom vækst: MG1363, IL1403, NCIMB700712, NCIMB700763 og IL594; mens følgende blev fundet at være haploide: NCDO2118, NCIMB702031, NCIMB702032, NCIMB700505 og FHYC-1. Ved sammenligning af NCIMB-numrene forekommer det rimeligt, at NCIMB700712 må være identisk med NCDO712. Det betyder, at MG1363 i lighed med IL1403 ikke er blevet diploid ved kuren for plasmider og profager. Der er fundet både haploide og diploide mejeristammer.

Bestemmelsen af cellecyklusperiodernes længde ved forskellige væksthastigheder viste, at *L. lactis*' cellecyklusperioder i lighed med de tilsvarende hos *E. coli* varierer lineært med generations-

tiden. Specielt for MG1363 fandtes, at D-tiden, perioden fra terminering af DNA-syntesen til celledeling, faldt til værdier tæt på nul, når generationstiden faldt til lidt under 100 minutter.

Ekstrapolation til lavere generationstider (hurtigere vækst) antyder negative D-tider. D-tiden er en nødvendig fase i bakteriers cellecyklus, idet det blandt andet er her decatenering (udredning af sammenhægtede cirkulære kromosomer) finder sted, samt den periode hvor dannelse af delingsfure finder sted. D-tiden er således en nødvendig periode, der skal gennemløbes. D-tider tæt på nul er således ikke sandsynlige. Den enkleste forklaring er, at D-tiden er længere end generationstiden – det tager længere end én generationstid at forberede celledelingen efter terminering af DNA-syntesen. Dette giver også en forklaring på den diploiditet, der er fundet hos MG1363 og andre laktokokstammer, idet der så vil være en hel fuldendt DNA-replikation imellem termineringen af DNA-syntesen og den celledeling, som denne terminering styrer. Eksamination af de flowcytometriske data viser, at replikationen (C-tiden) i de haploide stammer ligger på et andet tidspunkt i cellecyklus end i de diploide stammer. De haploide stammer har meget lange D-tider og ingen eller meget kort B-tid ved disse lange generationstider i modsætning til de diploide stammer. En yderligere forlængelse af de haploide stammers D-tid ville således føre til at de blev diploide.

Dette resultat er forsøgt publiceret i Nature Cell Biology. I første omgang blev det foreslået, at det blev undersøgt, om der var forskel mellem haploide og diploide med hensyn til UV-resistens og med hensyn til specifik aktivitet af forskellige enzymer. Det viste sig, at UV-resistensen af bakterier fra hurtigt voksende kulturer af de forskellige stammer varierede fra stamme til stamme uden nogen klar sammenhæng med de enkelte stammers ploiditet. UV resistensen af bakterier fra langsomt voksende stammer af MG1363 og NCDO2118. Den diploide MG1363 var klart mere resistent over for UV-stråling end den haploide NCDO2118, idet den tålte ca. 70% mere stråling, førend drabsfasen indtrådte. Derudover var der forskel i drabskinetikken, idet NCDO2118 blev dræbt efter en nulte-orden kinetik, mens MG1363 udviste en kinetik med øget drabsfrekvens i løbet af drabsperioden som tegn på tilstedeværelsen af flere kromosomer i cellerne.

Enzymerne aldolase, phosphofruktokinase og trioseisomerase blev målt i de samme to stammer i langsomt voksende kulturer med sammenlignelige generationstider. De specifikke aktiviteter viste sig at være identiske; mens enzymmængden per celle var tæt på det halve i den haploide stamme, hvilket er i overensstemmelse med, at det tidligere er vist, at NCDO2118 er klart mindre end MG1363.

B. Undersøgelse af faginfektionens indflydelse på værtsbakteriens transkriptom og proteom

Formål:

I denne fase undersøges, hvilke *specifikke makromolekyler* der måtte være ændret i disse celler for derigennem at få oplysning om, hvad der sker, når bakteriofager overtager cellernes apparatur.

Gennemførelse:

Fra en inficeret kultur af IL1403 blev taget prøver til proteom- og transskriptomanalyse. Proteom-analysen viste, at der ikke var noget bakterieprotein, der umiddelbart kunne anvendes som indikator for faginfektion. Transskriptomanalysen er ikke færdiggjort, fordi resultatet ikke er kommet tilbage fra det firma, der skulle udføre det rent praktiske.

Resultater:

Detektionsgrænsen blev formentlig nået i et forsøg med infektion af fagen P008 i IL1403. Her blev de første tegn på infektion set da 0,2% af de registrerede partikler (enkeltceller og celler i kæde) blev fundet i det område af cytogrammet, hvor de inficerede bakterier ses. Tællinger af infektiøse enheder (total antal fager) og af kolonidannere gav et forhold på 0,0013 mellem infektiøse enheder og bakterier. Dette svarer til 0,13% som detektionsgrænse. Kolonitallene var bestemt efter, at kulturen var blevet rystet kraftigt for at bryde eventuelle kæder. De to bestemmelser stemmer godt overens og angiver, at detektionsgrænsen ligger på ca. 0,2% af total antal bakterier i et laboratorievækstmedium. Dette betyder, at det også er muligt at detektere fagangreb selv i blandede starterkulturer, da teknikken er uafhængig af den specifikke fag og bakteriestamme.

Det er vist, at bakteriofaginficerede bakterier kan detekteres i et medium af M17 beriget med skummetmælk, hvis ”mælken” blev klaret med 1M polyphosphat. Ved infektion med en samling mejerifager isoleret af Jytte Josephsen er det fundet, at for 6 af de 7 undersøgte fager var detektionsgrænsen for inficerede bakterier lavere end 0,5%. Her er detektionsgrænsen dog bestemt af hyppigheden af prøvetagningen. For den sidste viste det sig, at fagen nedbrød bakteriens DNA. Dette giver et andet billede i flowcytometret, inficerede bakterier kan dog stadigvæk detekteres, idet der nu optræder partikler med et lavere indhold af DNA. Ved undersøgelse af mejeristammen W34 (der optræder i længere kæder end MG1363) blev det observeret, at den første begivenhed efter infektionen er, at kæderne nedbrydes og cellerne optræder som enkeltceller. Først senere blev det desuden klart, at selvom der i en kultur af inficerede bakterier er bakterier i alle stadier af infektionen, var der ingen eller meget få bakterier i et mellemstadium mellem celler med normal lysspredning og celler med lav lysspredning. Dette viser, at overgangen mellem de to stadier er meget hurtig. Andelen af celler med lav lysspredning steg under infektionen op til ca. 4% af total registrerede bakterier. Derefter var den relativt konstant, indtil alle tilbageværende bakterier var inficeret, hvorefter disse bakterier blev de dominerende. Dette viser, at bakterierne med lav lysspredning dannes hurtigt sidst i infektionscyklus, hvorefter de lyserer. Det kan derfor fastslås, at det første, der sker efter, at en celle er inficeret, er, at den kæde, celler er en del af, nedbrydes, og

cellen optræder som enkeltcelle. Dette sker formentlig som en konsekvens af, at cellen stopper massetilvæksten, mens den vedbliver at separere sig fra de andre celler i kæden. Sidst i infektionscyklussen frigiver fagen lysin, der nedbryder cellevæggen, og cellen omdannes til en celle med lav lysspredning. Ved en detektion af faginfektion vil det være naturligt også at tage dannelse af enkeltceller med, hvilket kan gøres med et program, der monitorer totalbilledet i et cytogram, og som reagerer på ændring af normalbilledet.

Ved et forsøg med infektion af IL1403 med fagen P008 blev der taget prøver til transskriptom- og proteomanalyse. Proteomanalysen viste, at der ikke var noget bakterieprotein, der kunne bruges som markør på faginfektion. Resultaterne fra transskriptomanalysen er ikke på nuværende tidspunkt kommet tilbage fra det firma, der har påtaget sig at udføre dem (Nimblegen).

C. Alternative detektionsmetoder for faginficerede celler

Formål:

Af hensyn til en senere implementering af den udviklede teknologi i mejeriindustrien er det vigtigt, at metoden bliver så følsom som mulig, således at selv små subpopulationer af inficerede celler kan detekteres. I projektet vil vi derfor eksperimentere med alternative metoder til at probe faginficerede celler, som måske kan forbedre signal/støj-forholdet i metoden.

Gennemførelse:

Gennemførelsen har været tilfredsstillende. Resultaterne har været negative, idet det har vist sig, at det ikke er muligt at måle membranpotentialet på en tilfredsstillende måde i det flowcytometer, der er anvendt. Det er lykkedes at få et signal, der er afhængigt af membranpotentialet, men signalet var ikke stabilt over tid – i modsætning til, hvad det viste sig at være i et fluometer. Fluometret kan derimod ikke anvendes til detektion af faginfektion, da det måler et gennemsnit af kulturen og derfor ikke har flowcytometrets opløsning på enkeltceller. Der blev målt internt pH i inficerede celler over infektionscyklus. Resultatet var, at der ikke skete nogen ændring i det interne pH som følge af infektionen.

Resultater:

Under projektet er der blevet forsøgt at måle membranpotentialet ved hjælp af flowcytometri. Forsøget viste, at flowcytometri med det anvendte flowcytometer ikke var optimalt til måling af membranpotentialet. Målingen beror på et skift fra grøn fluorescens til rød fluorescens. Den røde fluorescens er kraftigst ved 600 nm. Det anvendte filter 600-720 nm var så bredt, at signalet for det meste blev for svagt. Med et smalt 600 nm filter opnåedes et følsomt signal for membranpotentialet, men af ukendte årsager var signaler ikke stabilt over tid, hvilket viste sig at være tilfældet i et fluometer. Den anvendte forskrift angav, at måling af membranpotentialet skulle være muligt; men det var ikke muligt inden for dette projekts rammer at opnå dette. Forskriften angav f.eks. en farve-

koncentration på 30 µg/ml, en koncentration der er letal for laktokokker og 5 gange den koncentration, hvor væksthæmning ses.

Forsøg med måling af internt pH viste, at der ikke var ændringer af internt pH som følge af infektionen.

Det er blevet klart, at lysspredning giver en god adskillelse af celler med lav spredning og normale celler. De to former for lysspredning, der måles i flowcytometri giver forskelligt billede, i nogle tilfælde er den ene bedst, i andre den anden. Den optimale detektion må derfor tage begge former for lysspredning i betragtning. På nuværende tidspunkt må det konkluderes, at detektionen må anvende et fire-dimensionalt cytogram med 1) fremadrettet lysspredning, 2) sidevætsrettet lysspredning, 3) fluorescensfarvning af DNA til adskillelse af DNA-indeholdende celler fra DNA-fri baggrundspartikler og antallet af talte partikler.

D. Online overvågning af bakteriofager i syrningsprocesser

Formål:

Projektet har som forudsætning, at flowcytometret er i stand til at detektere en bakteriofaginfektion. Men hvis projektet har succes i denne sammenhæng vil det være naturligt i sidste fase af projektet at undersøge mulighederne for at etablere et online målesystem, der muliggør real-time registrering af udviklingen af bakteriofager i mejerisyrningsprocesser.

Gennemførelse:

Gennemførelsen har med hensyn til forberedelse til on-line måling været tilfredsstillende; mens der har været problemer med tilvejebringelse af det fornødne program til en on-line detektion. Fra Institut for Matematisk Modulering blev allokert en person, der skulle modificere et tidligere udviklet program til overvågning af et normalbillede (cytogram). Desværre har denne person ikke afleveret det aftalte. Der er dog ingen tvivl om, at et sådan program vil gøre detektionen mere effektiv, da det vil kunne inddrage de enkeltceller, der blev fundet som forløbere til de celler med lav lysspredning, som projektet oprindeligt hvilede på.

Resultater:

Det er vist, at det er muligt at bruge *in vivo* farvning af laktokokker i flowcytometret. En aftale med statistikprofessor H. Spliid, Informatik og Matematisk Modellering, DTU om et program, der sammenligner med en normal tilstand i et multidimensionalt rum af målelige flowcytometerparametre, har desværre ikke ført til et tilfredsstillende resultat, idet den fra Institut for Matematisk Modellering allokerede ikke har præsteret det forventede.

Vurdering af projektets erhvervs- og samfundsmæssige betydning:

Projektet har både en rent faglig betydning og også en mulig erhvervmæssig betydning. Fagligt videnskabeligt er vha. flowcytometri foretaget en morfologisk beskrivelse af de ændringer, der ses i en *Lactococcus lactis* som følge af infektion med en bakteriofag. Her er erkendt to faser:

- 1) Umiddelbart efter infektionen stopper massetilvæksten, mens celleseparationen fortsætter med det resultat, at cellerne ender som enkeltceller.
- 2) Sent, ca. 2/3 del inde i infektionscyklus, danner fagerne lysin, der hurtigt nedbryder cellevæggen med det resultat, at cellerne optræder som celler med lav lysspredning. Cellerne forbliver i dette stadie, indtil de lyserer.

Desuden er det blevet påvist, at nogle laktokokker optræder som diploide, i modsætning til andre bakterier, som normalt er haploide. Disse observationer er pt. under publicering i internationale tidsskrifter.

Erhvervmæssigt er der mulighed for, at metoden kan anvendes til overvågning af syrningsprocesser hos mejerierne. Ved infektion af starterkulturer med flere stammer, kan infektion i en af stammerne medføre ændring i den resulterende aromadannelse. Her vil metoden på grund af den store følsomhed kunne bruges til at detektere faginfektion i starterkulturer med flere forskellige stammer, hvor de normale indikatorer som f. eks. ændring i syrningshastigheden vil være mindre anvendelige på grund af maskering fra de andre stammer.

Desuden kan vores observation af, at de diploide laktokokceller er meget større end de haploide stammer muligvis anvendes til at differentiere tilbageholdelsen i ostematricen af forskellige stammer i starterkulturen.

Samarbejdsrelationer – nationalt og internationalt:

Under projektet har vi samarbejdet med Henrik Siegumfeldt, KVL vedrørende internt pH i faginficerede celler.

Samarbejde med Henrik Splied, Informatik og Matematisk Modellering, DTU vedrørende software til analyse af flowcytometri-data.

Publikationer:

Videnskabelige artikler i peer review tidsskrifter:

Ole Michelsen, Álvaro Cuesta-Dominguez, Bjarne Albrechtsen & Peter Ruhdal Jensen: Detection of bacteriophage-infected cells of *Lactococcus lactis* using flow cytometry. *Under revision til Applied and Environmental Microbiology.*

Ole Michelsen, Flemming G. Hansen & Peter Ruhdal Jensen: *Lactococcus lactis* - a diploid bacterium. *Under revision til Nature Cell Biology.*

Dina Petranovic, Ole Michelsen, Ksenija Zahradka, Catarina Silva, Mirjana Petranovic, Peter Ruhdal Jensen & Ivan Mijakovic: *Bacillus subtilis* strain deficient for the protein-tyrosine kinase PtkA exhibits impaired DNA replication. *Molecular Microbiology, in press.*

Konferencebidrag:

Ole Michelsen, Flemming G. Hansen and Peter Ruhdal Jensen.

Lactococcus lactis – a diploid bacterium. Abstract til poster, 8th Lactic acid bacteria conference, 2005, Noordwijkerhout, Holland

Patentansøgning:

Ole Michelsen & Peter Ruhdal Jensen 2006. Method for the detection of stressed cells. Ansøgt januar 2006. PCT-ansøgning indsendt januar 2007.

Populærvidenskabelige artikler:

Den artikel til mælkeritidende som normalt skrives i begyndelsen af disse projekter blev efter rådslagning med MFFs forskningskoordinator (Søren Riber) droppet for ikke at nyhedsskade ovennævnte patentansøgning. En afsluttende artikel om projektet er pt. under udarbejdelse og forventes færdig i 2. kvartal af 2007.

Studerende:

Projektet har haft en specialestuderende, Álvaro Cuesta, der var ERASMUS-studerende.

