

Applied Genetics and Molecular Identification of Bifidobacteria



A dissertation submitted to the

**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
(ETHZ)**

for the degree of
Doctor of Technical Sciences

presented by

Peter Kaufmann

Dipl. Lm.-Ing. ETH

born April 13, 1967

citizen of Horw (LU)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Michael Teuber, examiner
Dr. Wolfgang Ludwig, co-examiner
Dr. Leo Meile, co-examiner

Zurich, 1998

Summary

Contemporary food microbiology is based on the recent advances of molecular genetics. A prerequisite of food production and food safety is the proper identification of strains in order to provide a practicable monitoring system to distinguish useful from unwanted microorganisms. Furthermore, specially designed strains will become available in the near future, which have specific properties such as causing faster cheese ripening, enzymatic activity or probiotic effects.

A *Bifidobacterium* genus-specific target sequence in the V9 variable region of the 16S rRNA has been elaborated which was used to develop a hybridization probe. The specificity of this probe, named Im3 (5'-CGGGTGCTI*CCCACTTTCATG-3'), was used to identify all known type strains and distinguish them from other bacteria. All the 30 type strains of *Bifidobacterium* which are available at the German culture collection Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, 6 commercially available production strains and 34 closely related relevant strains (as negative controls) were tested. All tested bifidobacteria showed distinct positive signals by colony-hybridization, whereas all negative controls showed no distinct dots except *Gardnerella vaginalis* DSM4944 and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* DSM4902, which gave slight signals. Furthermore, a method for isolation and identification of bifidobacteria from food has been established by using a PCR assay without prior isolation of DNA but breaking the cells with Proteinase K. By this method, all *Bifidobacterium* strains lead to a DNA-product of the expected size. A second PCR approach using a third, universal probe in addition allowed positive controls for all bacteria resulting in two bands, one *Bifidobacterium* specific 1.3-kb and one universal 0.3-kb fragment.

A quick assay was also established to quantitatively measure *Bifidobacterium* counts in food and feces by dilution plating and colony hybridization. We were able to demonstrate that 2.1×10^6 to 2.3×10^7 colonies/g of sourmilk containing bifidobacteria hybridized with the specific nucleotide probe.

Species distinction between *B. lactis*, *B. animalis* and *B. longum* was achieved by using a DNA-DNA hybridization method resulting in 100%, 27% and <10%, respectively, DNA similarity to *B. lactis*, and a restriction fragment length polymorphism (RFLP) study, giving rise to different restriction patterns and thus underlining the separate species status of *B. lactis*.

The presence of plasmids was investigated in a total of 42 *Bifidobacterium* strains resulting in six strains carrying one or several plasmids. The 5-kb plasmid pPK1 from the

fecal isolate WK12 and the 2.1 kb plasmid pAP1 from *B. asteroides* DSM20089 were further analyzed by establishing restriction maps. The complete nucleotide sequence of plasmid pAP1 was determined and two open reading frames identified, one (*orf2*, encoding a 15.4-kDa protein) remained cryptic, while the other (*repA*, encoding a 34.4-kDa protein) showed high similarity to *repA* genes of *Rhodothermus marinus* and *Shigella flexneri*.

A screening assay for inhibitory substances of bifidobacteria was performed by testing the inhibitory action of 38 *Bifidobacterium* strains towards 10 important pathogenic strains or strains which play an important role in the dairy industry, and reciprocal inhibition towards 5 bifidobacterial strains.

The basics for a food grade bifidobacterial transformation system have been laid by testing 32 *Bifidobacterium* type strains and 6 *Bifidobacterium* production strains for their susceptibility to 8 different heavy metals and nisin, which could provide a food grade genetic marker.

Furthermore, an optimized fermenter protocol for *Bifidobacterium lactis* was established resulting in an optical density (600 nm) of 8.8 and a concentration of 8.8×10^{11} cfu/ml.

With the *Bifidobacterium* genus specific colony hybridization and genus specific PCR, it is now possible to readily and accurately detect any bifidobacteria in food and fecal samples and to discriminate them from other genera. Based upon the results obtained in this work, a food grade transformation system will be available for bifidobacteria in the near future, and therefore provide another important tool for the biosafety assessment of these important microorganisms.

Zusammenfassung

Die moderne Lebensmittelmikrobiologie basiert auf den neuen Erkenntnissen der Molekularbiologie. Eine Grundvoraussetzung für die Lebensmittelproduktion und -sicherheit ist die exakte Identifizierung von Stämmen.

Eine *Bifidobacterium* genus-spezifische Ziel-Sequenz in der variablen Region V9 der 16S rRNA wurde erarbeitet, welche zur Entwicklung einer Hybridisierungssonde verwendet wurde. Die Spezifität dieser 13 bp genannten Sonde (5'-CGGGTGCTI*CCCACCTTTCATG-3'), wurde verwendet, um alle bekannten Typ-Stämme zu identifizieren und von anderen Bakterien zu unterscheiden. Alle *Bifidobacterium* Typ-Stämme, welche bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen erhältlich sind, 6 kommerziell erhältliche Produktionsstämme und 34 nah verwandte Stämme (als negative Kontrollen) wurden getestet. Alle getesteten *Bifidobacterium*-Stämme zeigten bei der Koloniehybridisierung ein deutliches positives Signal, während alle negativen Kontrollen kein Signal ergaben, ausser *Gardnerella vaginalis* DSM4944 und *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* DSM4902, welche ein schwaches Signal ergaben. Des weiteren wurde eine Methode zur Isolierung und Identifizierung von *Bifidobacterium* aus Lebensmitteln entwickelt, welche auf einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ohne vorherige DNA Extraktion jedoch durch eine Lyse der Zellen mit Proteinase K, beruht. Diese Methode führte bei allen *Bifidobacterium* Stämmen zu einem DNA-Produkt der erwarteten Grösse. Ein zweiter PCR-Ansatz mit einem zusätzlichen dritten, universalen Primer erlaubte positive Kontrollen für alle Bakterien, indem zusätzlich zum *Bifidobacterium* spezifischen 1.3-kb Fragment ein zweites der Grösse 0.3 kb amplifiziert wurde.

Mit Hilfe von Verdünnungsreihen und Koloniehybridisierung wurde eine schnelle Methode zum quantitativen Nachweis von *Bifidobacterium* aus Lebensmitteln erarbeitet. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass 2.1×10^6 bis 2.3×10^7 Kolonie bildende Einheiten/g Sauer Milch mit *Bifidobacterium* mit der spezifischen Nukleotid Sonde hybridisierten.

Eine Unterscheidung auf Spezies Ebene zwischen *B. lactis*, *B. animalis* und *B. longum* konnte einerseits mittels DNA-DNA Hybridisierung gezeigt werden, die in 100%, 27% und <10% Aehnlichkeit zu DNA von *B. lactis* resultierte, andererseits zeigte eine Analyse des „Restriktions Fragment Längen Polimorphismus“ (RFLP) unterschiedliche Muster, welche den separaten Spezies-Status von *B. lactis* bestätigten.

Die Untersuchung von 42 *Bifidobacterium* Stämmen auf vorhandene Plasmide ergab 6 Stämme mit einem oder mehreren extrachromosomalen Elementen. Das 5-kb Plasmid

pPK1 aus dem Faekalisolat WK12 und das 2.1-kb Plasmid pAP1 aus *B. asteroides* DSM20089 wurden näher untersucht und eine Restriktionskarte hergestellt. Die komplette DNA Sequenz von pAP1 wurde sequenziert und zwei offene Leseraster identifiziert, wobei das eine (*orf2*, kodierend für ein 15.4 kDa Protein) kryptisch blieb, das andere (*repA*, kodierend für ein 34.4 kDa Protein) jedoch mit *repA* Genen von *Rhodothermus marinus* und *Shigella flexneri* eine hohe Aehnlichkeit zeigte.

Des weiteren wurden 38 Bifidobakterien Stämme auf ihre hemmende Wirkung gegenüber 10 wichtigen pathogenen oder industriellen Stämmen sowie reziproke Hemmung von 5 Bifidobakterien getestet. Erste vielversprechende Resultate wurden erreicht, weitergehende Forschungsanstrengungen in diesem wichtigen Feld sind jedoch notwendig.

Die Basis für ein „food grade“ *Bifidobacterium*-Transformationssystem wurde geschaffen, indem 32 *Bifidobacterium* Typ-Stämme und 6 *Bifidobacterium* Produktionsstämme auf die Sensitivität gegenüber 8 verschiedenen Schwermetallen und gegenüber Nisin getestet wurde, welche hervorragende „food grade“ Selektionsmarker ergeben würden.

Des weiteren wurde ein optimiertes Fermentations Protokoll für *Bifidobacterium lactis* erarbeitet, welches ein Wachstum bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 8.8 und einer Zellkonzentration von 8.8×10^{11} KBE/ml erlaubte.

Mit der *Bifidobacterium* Genus-spezifischen Koloniehybridisierung und Genus-spezifischen PCR ist es nun möglich, schnell und sicher Bifidobakterien aus Lebensmitteln und Faeces zu detektieren und von anderen Bakterien zu unterscheiden. Basierend auf den in dieser Studie erarbeiteten Resultaten sollte ein „food grade“ Transformationssystem in Bifidobakterien in nächster Zukunft erhältlich und daher auch ein wichtiges Instrument für die Biosicherheit dieser wichtigen Mikroorganismen verfügbar sein.