

I.C.W.B.

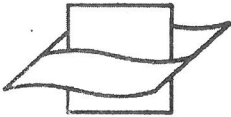
Mathematisch Model van
de Pollutie van de
Noordzee

Technical Report

1975/BIOL/ 05

222813

This paper is not to be cited without prior reference to the author



Vlaams Instituut voor de Zee
Flanders Marine Institute

Taxonomie van Bacillus sp. : serologische proeven

M. Aerts en A. Boeyé, Lab. van Microbiologie en Hygiëne,
Vrije Universiteit Brussel.

Taxonomie van Bacillus sp. : serologische proeven

1. Inleiding

Hoewel serologische reacties in de taxonomie van sommige groepen bacteriën sedert lang een belangrijke plaats innemen, zijn de mogelijkheden voor het genus *Bacillus* nog relatief weinig onderzocht. De belangrijkste studie tot op heden (Norris en Wolf, 1961. J. appl. Bact. 24, 42-56) bewijst nochtans de specificiteit van de sporenantigenen. In het bijzonder toonden deze auteurs aan dat de reacties van de thermoresistente sporenantigenen het onderscheid kunnen maken tussen stammen behorend tot 12 verschillende nomen-species. Er waren geen interspecifieke kruisreacties in de agglutinatie-test met uitzondering voor de kruisreacties tussen *B. subtilis* en *B. pumilus*. De toestand was totaal verschillend wanneer de vegetatieve antigenen volgens dezelfde methode getest werden : in dat geval waren er talrijke interspecifieke kruisreacties. Het blijkt dus dat een serologische classificatie van *Bacillus* sp. mogelijk is op grond van de specificiteit van de sporenantigenen.

Wij hebben gedacht dat het interessant zou zijn om onze numerieke taxonomie van *Bacillus* isolaten van mariene oorsprong aan te vullen met een serologische studie. In het bijzonder werd gedacht aan de subtilisgroep, die de 3 conventionele species *B. subtilis*, *B. pumilus* en *B. licheniformis* omvat en die sterk vertegenwoordigd is bij onze mariene isolaten. Twee fenons werden gevormd, waarvan één duidelijk overeenkwam met de conventionele species *B. licheniformis*.

Met dit doel werden vooreerst antisera bereid die gericht waren tegen 2 reeksen van elk 3 stammen. De eerste reeks bestond uit type-stammen van de species *B. subtilis*, *B. pumilus* en *B. licheniformis* uit de verzameling van het Institut Pasteur (Parijs) en de tweede reeks bestond uit de stammen van diezelfde soorten die door Norris en Wolf in hun eigen studie als immunogeen waren aangewend.

De gebruikte serologische reacties waren de door voornoemde auteurs beschreven agglutinatie- en precipitatie-testen, plus de Ouchterlony dubbele-diffusietest. Met deze laatste test werd vooral de kwalitatieve analyse van de inter- en intraspecifieke kruisreacties beoogd.

2. Methoden

a) bereiding sporenantigenen

De kiemen werden gekweekt op Nutrient of Marine Agar in Rouxflessen. Wanneer de maximum sporulatie bekomen werd (d.i. na 6 à 10 dagen bij 37°C), werden de kiemen afgehaald en 3x gewassen met fysiologisch water. Het nog aanwezige vegetatief materiaal werd verder afgebroken door incubatie met lysozyme (0.2 mg/ml) gedurende 5u bij 37°C. Om het vegetatieve celdebris te verwijderen werd het materiaal, na centrifugatie en resuspendieren in minimum hoeveelheid fysiologisch water, op een CsCl gradiënt (d 1.35 tot 1.55) gebracht. Na centrifugatie in een uitzwaairotor (1 uur, 20.000 tpm., 4°C) bevond het zuivere sporen materiaal zich in een band met dichtheid 1.40 tot 1.45. Deze band werd geïsoleerd en gedialyseerd tegenover fysiologisch water (2 x 30 min. bij 4°C) ter verwijdering van het CsCl. Het volume van de sporensuspensie werd aangepast tot een concentratie van 10^9 sporen/ml. De sporensuspensie bestemd voor inspuiting, werden verdeeld over ampullen en geautoclaveerd (20 min., 120°C).

De sporensuspensies bestemd als antigeen voor de agglutinatie testen en voor de bereiding van het sporenextract, werden niet geautoclaveerd. Alles werd bewaard bij 4°C.

b) bereiding H en O antigenen

Hiervoor werden de kiemen gekweekt in Nutrient Broth gedurende 24 u bij 37°C. Na centrifugatie en 3x wassen met fysiologisch water werd het volume aangepast tot $2 \cdot 10^9$ cellen/ml.

H antigenen werden bekomen door 1 volume van deze suspensie te incuberen bij 37°C gedurende 2 u met een volume fysiologisch water + 0.2 % formaldehyde.

Het materiaal werd gecontroleerd op motiliteit door fasecontrast microscopie.

O antigenen werden bekomen door een suspensie 1 u te incuberen bij 100°C.

Ook deze antigenen werden bewaard bij 4°C.

c) bereiding sporenextract

Het sporenextract werd gemaakt onmiddellijk voor gebruik volgens de Lancefield methode. 10^9 sporen werden gesuspendeerd in 2 ml fysiologisch water + 1/20 NHCl en 10 min bij 100°C gebracht; na afkoelen en neutralisatie met NaOH werd de suspensie gecentrifugeerd en een helder supernatant werd bekomen.

d) schema's voor de immunisatie van konijnen

In een eerste reeks, waarvoor de stam *B. subtilis* CIP 5265 werd gebruikt, werden twee proefdieren vanaf het begin intraveneus ingespoten met half-wekelijkse tussenpozen. Het schema omvatte 10 inspuitingen, waarvan de eerste vijf met stijgende hoeveelheden. Er was een verschil in de bereidingswijze van de sporen. In het ene geval werd een lysozymebehandeling toegepast teneinde een volledige verwijdering van het vegetatief materiaal te bekomen (schema 1) en in het andere geval werd dit niet gedaan (schema 2). Het proefdier dat met lysozyme-onbehandeld materiaal werd ingespoten, stierf na de vijfde inspuiting. Het tweede proefdier werd 14 dagen na de laatste inspuiting geslacht. De titer der agglutininen met sporen van *B. subtilis* CIP 5265 als antigeen bleef constant vanaf de 9de inspuiting op 1:64.

Daar deze titer in vergelijking met de literatuurdata eerder laag was, werden voor de volgende reeksen proefdieren andere immunisatieschema's uitgetest.

De resultaten kunnen best onder tabelvorm weergegeven worden. Het immunogeen bestond in alle gevallen uit lysozyme-behandelde, geautoclaveerde sporen.

Immunisatieschema 3. Duur : 5 weken met half-wekelijkse tussenpozen en wekelijkse titerbepaling der agglutininen. Vijf intramusculaire inspuitingen met stijgende doses, gevolgd door 3 intraveneuze inspuitingen met maximum dosis. Geen adjuvans. Schema 4. Twee halfwekelijkse intraperitoneale inspuitingen (met compleet Freund's adjuvans), 1 week rust, 2 intramusculaire inspuitingen, 1 week rust, 4 intraveneuze inspuitingen.

Tabel 1.

Serum Nr.	Schema	Stam	Bereikte titer (agglutinatietest met homologe sporen)
1	1	<i>B. subtilis</i> CIP 5265	1/64
2	2	<i>B. subtilis</i> CIP 5265	
3	3	<i>B. subtilis</i> CIP 5265	1/128
4	3	<i>B. licheniformis</i> CIP 5271	1/500
5	3	<i>B. pumilus</i> CIP 5267	1/128 _(a,b)
6	3	<i>B. subtilis</i> 3610 (Wolf)	1/32 _(a,b)
7	3	<i>B. licheniformis</i> 2843 (Wolf)	1/400 _(a,b)
8	3	<i>B. pumilus</i> 2746 (Wolf)	1/125 _(a)
9	4	<i>B. subtilis</i> CIP 5265	1/16 _(a)
10	4	<i>B. licheniformis</i> CIP 5271	1/512

(a) proefdieren na 2e of 3e intraveneuze inspuiting gestorven

(b) post mortum genomen sera, onbruikbaar voor precipitatietesten.

Het voornaamste besluit is dat de immunisatie met geautoclaveerde sporen in een te groot aantal gevallen pathologische reacties meebrengt bij het proefdier. Alles wijst erop dat de doodsoorzaak bij de gestorven dieren een anafylactische reactie was. De overleden proefdieren stierven steeds na de aanvang van de intraveneuze inspuitingen. Deze reacties worden in de literatuur niet vermeld en het immunisatieschema van Norris en Wolf omvatte zelfs uitsluitend i.v. inspuitingen.

e) agglutinatie testen

Alle verdunningen van antigeen en serum werden gemaakt in fysiologisch water. 0.2 ml van de serumverdunningen werd gemengd met 0.2 ml antigeen. De incubatie gebeurde in een schudwaterbad bij 37°C gedurende 2 u. Na overnacht incubatie bij 4°C werden de resultaten nogmaals afgelezen.

f) adsorptie van de sera

0,4 ml van het antiserum werd gemengd met 0,1 ml H + 0,1 ml O antigenen suspensie en werd geschud bij 30°C gedurende 30 min. Dan werd er nogmaals 0,1 ml H + 0,1 ml O antigenensuspensie toegevoegd en 30 min. geschud. Na centrifugatie van de suspensie werd een helder geadsorbeerd serum bekomen.

Agglutinatie testen met H en O antigenen werden uitgevoerd als controle op de adsorptie.

g) precipitatie testen

1) in capillaire buisjes : boven 0,05 ml van elke serumverdunning werd 0,05 ml van het sporenextract gebracht. Als positief resultaat werd een precipitatie ring bekomen nabij de antigen-antiserum interfase.

2) dubbele diffusie in agar :

1^e methode (Le Bouvier) : 4 mm dikke lagen 0,7 % agar, opgelost in 0,01 M fosfaatbuffer pH 7.2, 0,14 M NaCl en 0,1 % EDTA werden in petriplaten gebracht. Ook alle verdunningen werden in deze buffer uitgevoerd. Hierin werden gaten geponst met een diameter van 5,5 mm en 4 mm van elkaar verwijderd. Op de bodem van elk gat werd nog enkele µl agar gebracht om wegvloeien van materiaal tussen plastic en gel te verhinderen. De diffusie greep plaats bij 37°C in een vochtige exsiccator. Na 2 à 4 dagen waren de precipitatielijnen goed zichtbaar. Om meer contrast te bekomen werden ze gekleurd met 0,5 % amidoschwartz in methanol / azijnzuur (9/1) na langdurig spoelen van de plaatjes in fosfaatbuffer. De overtollige kleurstof werd verwijderd door spoelen in methanol / azijnzuur (9/1).

2e methode : 1 mm dikke agarlaagjes werden op microscoopglasjes gebracht. Een eerste laagje, bestaande uit 0,1 % (G/V) agar + 0,05 % (G/G) glycerine in aq. dest., diende als vasthechtingsmiddel van de gel aan het glas. Hierop werd een tweede laagje aangebracht, dat als volgt is samengesteld :

- 34 ml Veronal buffer pH 8.6
- 1,3 g Agar Noble
- 0,5 g NaN_3 (om infecties tegen te gaan)
- 96 ml gedistilleerd water.

Bovendien werd 3 % polyethyleenglycol aan de agargels toegevoegd om de precipitatie van heel kleine hoeveelheden te bevorderen.

De verdere bewerking was zoals in vorige methode. Het spoelen gebeurde met fysiologisch water, nadien met gedistilleerd water. Vervolgens werden de gels gedroogd bij 37°C. De kleuring gebeurde met 0,9 % amidoschwartz in methanol/azijnzuur/water (9/2/9). Methanol/azijnzuur/water (9/2/9) werd gebruikt voor de ontkleuring van de gels.

3. Resultaten

Agglutinatietesten.

Er werd uitsluitend voort gewerkt met de sera van de 4 dieren waarvan de immunisatie kon vervolledigd worden.

Resultaten met onze geadsorbeerde sera (zie tabel) :

De 2 anti-subtilis-sera reageerden met

- homologe sporen
- sporen van de andere subtilis-stam
- sporen van beide pumilus-stammen.

Het anti-pumilus-serum reageerde met

- homologe sporen
- sporen van de andere pumilus
- sporen van beide subtilis-stammen.

Er was dus een volledige symmetrie in de kruisreacties tussen subtilis en pumilus.

Geen van de antipumilus en anti-subtilissera reageerde met sporen van de licheniformis stammen. Het anti-licheniformis-serum daarentegen reageerde enkel met de homologe sporen en die van de andere licheniformis stam.

Drie van de sera werden getest op hun reacties met de homologe H en O antigenen. Slechts één serum (nr 3) gaf positief resultaat en dan nog alleen voor O

(titer 1 : 32). Na adsorptie was deze titer teruggebracht op 1 : 4.
De reacties van de geadsorbeerde sera met sporen werden opnieuw nagegaan met 2 sera en waren onveranderd gebleven (zie tabel).

Precipitatietesten in capillaire buisjes.

Alleen de homologe reacties werden onderzocht (zie tabel). De bekomen titers waren laag en de reacties diffuus. Deze methode werd daarom verlaten.

Dubbele-diffusietesten, methode nr. 1

Algemene schikking : serum centraal, 6 antigenen rondom.

1^e reeks. Serum nr. 3 (anti-subtilis), ongeadsorbeerd, 1/2.

Antigenen onverdunde sporenextracten van kiemen CIP 5265, CIP 5267, W 2746, CIP 5271 en W 3610.

Resultaat: precipitatiebogen aanwezig met CIP 5265 en W 3610.

Besluit : kruisreactie alleen met sporenextracten van kiem van zelfde species.

2^e reeks. Serum zoals 1 maar geadsorbeerd.

Antigen als vorig.

Resultaat onveranderd

3^e reeks. Serum zoals 1, maar sporenextracten meer geconcentreerd.

Resultaat : precipitatiebogen met beide pumilus- en beide subtilis-extracten en identiteitsreactie tussen

- de bogen bekomen met de 2 subtilis extracten
- de bogen bekomen met elk van de pumilus-extracten en het homologe subtilis-extract.

Geen reactie met het licheniformis-extract.

4^e reeks. Serum nr 3, maar geadsorbeerd.

Resultaten : onveranderd.

5^e reeks. Serum nr.3, ongeadsorbeerd (1/2)

Antigenen : elk van de 2 pumilus-extracten afzonderlijk, elk van de 2 subtilis-extracten afzonderlijk, mengsel van CIP 5265 + CIP 5267, mengsel van W 3610 + W 2746.

Resultaat : overal 1 precipitatieboog en identiteitsreactie tussen alle bogen.

6^e reeks. Anti-subtilisserum nr 1 ongeadsorbeerd (1/2).

Antigenen : zoals reeks 3.

Resultaat : identiek met reeks 3.

7^e reeks. Serum nr. 5 (anti-pumilus) ongeadsorbeerd (1/2).

Antigenen : zoals reeks 1.

Resultaat : enkel reactie met de 2 subtilis-extracten.

8e reeks. Serum als vorig.

Antigen : zoals reeks 3.

Resultaat : als reeks 3.

9e reeks. Serum nr. 5 ongeadsorbeerd (1/1).

Antigenen zoals reeks 5.

10e reeks. Serum nr 4 (anti-licheniformis) ongeadsorbeerd (1/2).

Antigenen : sporenextracten van beide licheniformis, beide subtilis, pumilus CIP 5267.

Resultaat : alleen reactie met licheniformis en identiteit tussen de 2 extracten.

11e reeks. Serum nr. 4 (1/2) geadsorbeerd.

Antigenen als vorig.

Resultaat als vorig.

12e en 13e reeks. Herhaling van 10 en 11 met meer geconcentreerde sporenextracten voor de pumilusstammen.

Resultaat : onveranderd.

Besluit : symmetrische kruisreacties tussen subtilis-sera en pumilus-antigen, en omgekeerd. Geen kruisreacties tussen licheniformis-antiserum enerzijds en subtilis of pumilus-antigen, anderzijds, en omgekeerd.

De resultaten zijn dus volledig parallel met deze van de agglutinatie testen.

Dubbele-diffusie, methode nr. 2.

1e reeks. Serum nr. 3 (anti-subtilis), ongeadsorbeerd, 1/1.

Antigenen : sporenextracten 2 subtilis, 2 pumilus, 1 licheniformis (CIP 5271).

Resultaat : voor alle subtilis en pumilus telkens 2 precipitaatbogen. Identiteit tussen alle buitenste bogen en alle binnenste. Geen reactie met licheniformis. De binnenste bogen waren veel zwakker dan de buitenste, en beide waren zeer scherp.

2e reeks. Serum nr 5 (anti-pumilus), ongeadsorbeerd, 1/1.

Antigenen : zoals reeks 1.

Resultaat : pumilus-extracten gaven diffuse bogen met identiteit met daarin een smalle, intensere band. De subtilis-extracten gaven alleen een smalle band (identiteit tussen de 2 stammen). Deze smalle band was identiek met die van de pumilus-extracten. Geen reactie met licheniformis.

Besluit : Mits gebruik van deze methode kan de aanwezigheid van tenminste 2 sporen antigenen bij pumilus worden aangetoond, waarvan er een identiek was met het subtilis-sporenantigeen.

4. Besluit:

De hier beschreven proeven bevestigen de specificiteit van de thermostabiele sporenantigenen van Bacillus sp. De aan- of afwezigheid van kruisreacties was geheel in overeenstemming met de vroegere bevindingen van Norris en Wolf. In de huidige studie werd echter voor het eerst de Ouchterlony dubbele-diffusie methode op dit probleem toegepast. Deze methode gaf praktisch dezelfde resultaten als de klassieke agglutinatie test. Ze heeft over alle andere methodes het voordeel, dat ze toelaat, de aard van eventuele kruisreacties na te gaan. Een eerste resultaat was het identiteitskarakter van alle intraspecifieke kruisreacties en de gedeeltelijke identiteit in de kruisreactie tussen anti-pumilus serum en subtilis antigeen.

Wij besluiten dan ook dat het onderzoek van de sporenantigenen belangrijk kan bijdragen tot een betere kennis van de taxonomie van het genus Bacillus.

Tabel 2. Agglutinatietesten met niet geadsorbeerde sera

	Antiserum van			
	5265 (nr1)	5265 (nr3)	5271 (nr4)	5267 (nr5)
Sporen 5265	1/256	1/64	-	1/64
Sporen 5271	-	-	1/512	-
Sporen 5267	1/512	1/256	-	1/256
Sporen 3610	1/128	1/64	-	1/64
Sporen 2843	-	-	1/512	-
Sporen 2746	1/512	1/256	-	1/256

Tabel 3. Agglutinatietesten met geadsorbeerde sera

	Antiserum van	
	5265 (nr3)	5271 (nr4)
Sporen 5265	1/64	-
Sporen 5271	-	1/512
Sporen 5267	1/256	-
Sporen 3610	1/64	-
Sporen 2843	-	1/512
Sporen 2746	1/256	-

Tabel 4. Agglutinatie testen met homologe H en O antigenen.

Antiserum van		H	O
5265 (nr 1)	Voor adsorptie	-	-
	Na adsorptie	-	-
5265 (nr 3)	Voor adsorptie	-	1/32
	Na adsorptie	-	1/4
5271 (nr 4)	Voor adsorptie	-	-
	Na adsorptie	-	-

Tabel 5. Precipitatietesten in buisjes met niet geadsorbeerde sera

Antiserum van	5265	5267	2843
Sporenextract van	(nr 1)	(nr 5)	(nr 7)
5265	1/32	X	X
5267	X	1/4	X
2843	X	X	1/8

(X = niet getest)