

Aus dem Institut für Fleischhygiene und -technologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Entwicklung und Einsatz von 16S rRNA Gensonden
zur Identifizierung biotechnologisch genutzter
Laktobazillen-Stämme der
L. acidophilus- und der *L. casei*-Gruppe**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Marc Goldberg
Tierarzt aus Schleswig**

**Berlin 2002
Journal-Nr. 2585**

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. M.F.G. Schmidt
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. G. Reuter
Zweiter Gutachter:	Priv.-Doz. Dr. G. Klein

Tag der Promotion: 01.02.2002

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	Phylogenetische und taxonomische Stellung des Genus <i>Lactobacillus</i>	2
2.1.1	<i>L. acidophilus</i> -Gruppe	4
2.1.2	<i>L. casei</i> -Gruppe	7
2.2	Ökologische Bedeutung von Laktobazillen	11
2.2.1	Natürliches Vorkommen	11
2.2.2	Laktobazillenkulturen in der Lebensmittelproduktion	16
2.2.3	Laktobazillenkulturen als Futtermittelzusatzstoffe	18
2.2.4.1	Starter- und Schutzkulturen	19
2.2.4.1.1	Milchprodukte	20
2.2.4.1.2	Fleischprodukte	21
2.2.4.2	Probiotika	21
2.2.4.2.1	Probiotika in Lebensmitteln	27
2.2.4.2.2	Probiotika in Futtermitteln	30
2.2.4.2.3	Einsatz von Laktobazillenkulturen in der Pharmazie	32
2.3.1	Potentielle Pathogenität von Laktobazillen	35
2.3.2	Ausschluß einer potentiellen Pathogenität und einer mikroökologischen Umweltbelastung	38
2.4	Identifizierung und Stammcharakterisierung von Laktobazillen	39
2.4.1	Veranlassung zur Identifizierung und Stammcharakterisierung biotechnologisch genutzter Kulturen	39
2.4.2	Klassische Methoden der Identifizierung von Laktobazillen	40
2.4.3.1	Molekularbiologisch-phänotypische Methoden	41
2.4.3.2	Molekularbiologisch-genotypische Methoden	42
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	52

3.1	Material	52
3.1.1	Bakterienstämme	52
3.1.2	Nährmedien zur Stammhaltung und Kultivierung	62
3.1.3	Nährmedien und Substrate für die physiologische und biochemische Prüfung der Bakterienstämme	62
3.1.4	Reagenzien und Lösungen	63
3.1.5	Gensonden	67
3.1.6	Technische Geräte und sonstiges Material	69
3.2	Methoden	70
3.2.1	Klassische phänotypische Identifizierung der Laktobazillenstämme	70
3.2.2	Isolierung der bakteriellen DNA	70
3.2.3	Messung der DNA-Konzentration	72
3.2.4	Dot Blot-Hybridisierungstechnik	72
3.2.5	Entwicklung der eingesetzten Gensonden	76
3.2.5.1	Entwicklung der <i>L. gasseri</i> -Sonde	77
4	ERGEBNISSE	80
4.1	Physiologische und biochemische Überprüfung der <i>Lactobacillus</i>-Stämme	80
4.1.1	Stämme der <i>L. acidophilus</i> -Gruppe	80
4.1.2	Stämme der <i>L. casei</i> -Gruppe	82
4.1.3	Andere <i>Lactobacillus</i> - und <i>Weissella</i> -Stämme	82
4.2	Reaktionen der geprüften <i>Lactobacillus</i>-Stämme mit den Gensonden	83
4.2.1	Reaktionen von Typstämmen aus der <i>L. acidophilus</i> -Gruppe	83
4.2.2	Reaktionen der Feld- und Sammlungsstämme aus der <i>L. acidophilus</i> -Gruppe sowie anderer Kontrollstämmen mit der <i>L. acidophilus</i> -, <i>L. gasseri</i> - und <i>L. johnsonii</i> -Sonde	84
4.2.3	Reaktionen von Typstämmen aus der <i>L. casei</i> -Gruppe	89
4.2.4	Reaktionen der Feld- und Sammlungsstämme aus der <i>L. casei</i> -Gruppe sowie anderer Kontrollstämmen mit der <i>L. zaeae</i> -, <i>L. paracasei</i> - und <i>L. rhamnosus</i> -Sonde	90

4.2.5	Verhalten anderer Laktobazillen sowie Stämmen des Genus <i>Weissella</i> gegenüber den eingesetzten Gensonden	94
4.3	Versuch der Ermittlung einer Gensonde zur Differenzierung von <i>L. crispatus</i> und <i>L. gasseri</i> unter Verwendung des BLAST-Programmes	104
5	DISKUSSION	105
5.1	Methodische Erkenntnisse zur Speziesidentifizierung mit Gensonden	105
5.2	Identifizierung von Laktobazillen mit Gensonden	109
5.2.1	Referenz- und Sammlungsstämmen aus der <i>L. acidophilus</i> -Gruppe	109
5.2.2	Vergleich der Speziesidentifizierung von Feldstämmen aus der <i>L. acidophilus</i> -Gruppe mit den Ergebnissen anderer Autoren	112
5.2.3	Referenz- und Sammlungsstämmen aus der <i>L. casei</i> -Gruppe	116
5.2.4	Vergleich der Speziesidentifizierung von Feldstämmen aus der <i>L. casei</i> -Gruppe mit den Ergebnissen anderer Autoren	119
5.2.5	Reaktionen mitgeführter Kontrollstämmen	121
5.2.6	Taxonomische Erkenntnisse	122
5.2.6.1	<i>L. acidophilus</i> -Gruppe	122
5.2.6.2	<i>L. casei</i> -Gruppe	122
5.3	Einsatz von Gensonden zur Identifizierung probiotischer Stämme	124
6	SCHLUSSFOLGERUNGEN	125
7	ZUSAMMENFASSUNG	127
9	ANHANG	133
10	LITERATURVERZEICHNIS	145

VERZEICHNIS HÄUFIG VERWENDETER ABKÜRZUNGEN

ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
Aqua bidest.	<u>A</u> qua <u>b</u> idest <u>i</u> llata
Aqua demin.	<u>A</u> qua <u>d</u> emineralisata
bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aare
CCUG	<u>C</u> ulture <u>C</u> ollection <u>U</u> niversity of <u>G</u> öteborg
DIG	<u>D</u> igoxigenin
cDNA	<u>c</u> omplementary <u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
DNA	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
dNTP	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleosid- <u>T</u> riphosphat
DSMZ	<u>D</u> eutsche <u>S</u> ammlung von <u>M</u> ikroorganismen und <u>Z</u> ellkulturen
EDTA	<u>E</u> thylen- <u>d</u> iamine- <u>t</u> etraacetic- <u>a</u> cid (= Ethylendiamintetraessigsäure)
<i>Ec.</i>	<i><u>E</u>nterococcus</i>
h	<u>h</u> our
KbE	<u>K</u> olonie <u>b</u> ildende <u>E</u> inheiten
<i>L.</i>	<i><u>L</u>actobacillus</i>
LMBG	<u>L</u> ebens <u>m</u> ittel- und <u>B</u> edarfsgegenstände <u>g</u> esetz
LMG	<u>L</u> aboratorium voor <u>M</u> icrobiologie, <u>G</u> ent, Belgien
M	<u>M</u> olar
mM	<u>m</u> illimolar
MRS	de <u>M</u> an- <u>R</u> ogosa- <u>S</u> harpe-Nährmedium
NCBI	<u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> iotechnology <u>I</u> nformation
PAGE	<u>P</u> olyacrylamid <u>g</u> ele <u>e</u> ktrophorese
PCR	<u>P</u> olymerase- <u>C</u> hain- <u>R</u> eaction
PFGE	<u>P</u> ulsed <u>F</u> ield <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis
rpm	<u>r</u> otations <u>p</u> er <u>m</u> inute (= Umdrehungen pro Minute)
RAPD	<u>R</u> andomly <u>A</u> mplified <u>P</u> olymorphic <u>D</u> N
REA	<u>R</u> estriktionsenzym <u>a</u> nalyse
RDP	<u>R</u> ibosomal <u>D</u> atabase <u>P</u> roject
RNA	<u>r</u> ibosomal <u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
SDS	<u>S</u> odium- <u>D</u> odecyl- <u>S</u> ulfate (= Natriumdodecylsulfat)
SSC	<u>S</u> tandard <u>S</u> aline <u>C</u> itrate
ss-rRNA	<u>s</u> mall- <u>s</u> ubunit <u>r</u> ibosomal <u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
T (hochgestellt)	Typstamm
T _m	<u>T</u> emperature of <u>m</u> elting (= Schmelztemperatur)
UV	<u>u</u> ltraviolette <u>s</u> Licht
<i>W.</i>	<i><u>W</u>eissella</i>

Das Thema der vorliegenden Dissertation geht auf einen Vorschlag von Herrn Priv.-Doz. Dr. Günter Klein zurück, der auch die molekularbiologischen Ansätze der Untersuchungen konzipierte und betreute. Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Gerhard Reuter übernahm die weitere wissenschaftliche Betreuung bei der Auswertung und Fertigstellung der Arbeit im Institut für Fleischhygiene und -technologie der Freien Universität Berlin. Ihnen beiden sei für die jederzeit gewährte Unterstützung und fachliche Beratung bei der Anfertigung meiner Dissertation herzlich gedankt.

Besonderer Dank gebührt Frau Lilo Bräutigam für die wertvolle Einarbeitung und die technische Unterstützung im Labor sowie für die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung dieser Arbeit. Frau Dorothea Jaeger danke ich insbesondere für die Unterstützung bei der phänotypischen Charakterisierung der untersuchten Laktobazillen-Stämme. Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Fleischhygiene und -technologie sowie meinen MitdoktorandInnen Urte Köpke und Jacobus Louwers, auf deren Hilfe ich in jeglichen Fragestellungen stets zurückgreifen konnte. Danken möchte ich auch Frau Dr. C. Hallmann für die zahlreichen Ratschläge und die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens.

In gleicher Weise gilt mein Dank Herrn Dr. W. Vahjen aus dem Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin für die hilfreichen Hinweise zur Nutzung der Internet-Datenbanken im Rahmen der Entwicklung von Gensonden sowie für die freundliche Diskussionsbereitschaft.

Meinen „Pflegeeltern“ Evi und Immo danke ich für die gewährte Unterkunft inkl. Frühstück im schönen Lichterfelde-West während der Endphase der Anfertigung meiner Dissertation.

Abschließend gilt mein Dank ganz besonders meiner Familie, die stets einen großen Rückhalt für mich bildet und mir die nötige Ruhe und Kraft gegeben hat, die angestrebten Ziele zu erreichen.

Lebenslauf

Name Marc Goldberg

Geburtsdatum 30.10.1967

Geburtsort Schleswig

Familienstand verheiratet

Kinder Greta, geb. 26.04.1994; Antonia Talea, geb. 15.12.1999

Schulbildung 1974-1978 Grundschule in Schleswig
1978-1981 Gymnasium Domschule in Schleswig
1981-1982 Arden Junior High School in Sacramento, Kalifornien, USA
1982-1986 Jesuit High School in Sacramento, Kalifornien, USA
1986-1988 Gymnasium Laurentianum in Warendorf, Abitur im Mai 1988

Berufsausbildung 1991-1992 Berufsausbildung zum Tierärzthelfer in der Tierärztlichen Klinik für Pferde Dr. Boening / Dr. v. Saldern in Telgte (Westf.)

Studium WS 1988/89 - WS 1990/91 Betriebswirtschaftslehre an der Westf. Wilhelms-Universität Münster
WS 1992/93 - SS 1998 Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
10/1995 - 09/1998 studentische Hilfskraft im Institut für Fleischhygiene und -technologie, FU Berlin

Berufstätigkeit seit 04/01 Mitarbeiter in der Tierärztlichen Klinik für Kleintiere Dr. Fehler / Dr. Bittner in Cottbus

Approbation als Tierarzt 05/1998

Wissenschaftliche Tätigkeit seit 07/1998 Doktorand
von 07/1998 bis 12/2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen von Drittmittelprojekten am Institut für Fleischhygiene und -technologie der Freien Universität Berlin

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Marc Goldberg, die vorliegende Arbeit selbständig und nur auf Grundlage der angegebenen Hilfsmittel und Literaturstellen verfaßt zu haben.

Berlin, 15.12.2001