

#### 2.2.4.2.1 Probiotika in Lebensmitteln

Probiotika werden in zunehmenden Maße in Lebensmitteln eingesetzt. Während probiotische Kulturen vor einigen Jahren überwiegend in Milcherzeugnissen enthalten waren, findet man sie neuerdings auch in einer Vielzahl anderer Produkte, wie Müsli-Riegel, Schokoladenerzeugnissen, Fruchtsäften und sogar Fleisчерzeugnissen (REUTER et al., 2000a). Probiotika in **Lebensmitteln** sind nach der Definition einer Arbeitsgruppe am BgVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin) „definierte lebende Mikroorganismen, die in ausreichender Menge in aktiver Form in den Darmbereich gelangen und dadurch positive gesundheitliche Wirkungen erzielen“. Diese aus Vertretern verschiedener wissenschaftlicher Disziplinen, Wirtschaft und Verbrauchern zusammengesetzte Expertenkommission hat im Auftrag des Bundesgesundheitsministeriums offene Fragestellungen hinsichtlich des Einsatzes von Probiotika in Lebensmitteln aufgearbeitet, die in Form eines Abschlußberichtes vorliegen (BgVV, 1999).

Nach REUTER (2001a, 2001b) richtet sich der Einsatz probiotischer Kulturen in Lebensmitteln über die Kriterien der Definition hinaus insbesondere auch nach technologischen Gesichtspunkten, die die Herstellung stabiler und schmackhafter Produkte ermöglichen. Aber auch der Einsatz von Stammformen, die Bestandteil der physiologischen Körperflora des Zielorganismus (Wirtsorganismus) sind, wird als bedeutsam angesehen. So „sollten“ als Probiotika in Lebensmitteln designierte Bakterienstämme bevorzugt aus dem Spektrum der Milchsäurebakterien humanen Ursprungs selektiert und im Hinblick auf gesundheitsfördernde Eigenschaften „optimiert“ werden (GROßKLAUS, 1999). Unabdingbar für die Wirksamkeit eines alimentär zugeführten, probiotischen Lebensmittels ist die regelmäßige Aufnahme. Physiologische Leistungen aufgenommener probiotischer Kulturen sind in Größenordnungen von  $10^6$  KbE/g bei täglicher Aufnahme messbar, wobei unter Berücksichtigung der Mindesthaltbarkeitsfrist bei den meisten Produkten eine tägliche Menge von  $10^8$  bis  $10^9$  Bakterien (= ca. 100 - 1000g Produkt) erforderlich ist, um im menschlichen Organismus probiotische Wirkungen entfalten zu können (BgVV, 1999).

In Japan ist vor einiger Zeit der Begriff „**Functional Food**“ geprägt worden. Eine verbindliche Definition dieses Begriffes im europäischen Raum liegt derzeit nicht vor und ist auch in der wissenschaftlichen Literatur nicht eindeutig definiert. Im Allgemeinen zeichnen sich sogenannte funktionelle Lebensmittel durch einen über

den reinen Nährwert des Lebensmittels hinausgehenden zusätzlichen Nutzen für die Gesundheit aus. Aber auch die Geistesverfassung und physische Leistungsfähigkeit soll definitionsgemäß durch derartige Lebensmittel positiv beeinflusst werden (MATTILA-SANDHOLM, 2000). Probiotische Lebensmittel werden zu den Functional Foods gerechnet. Die vielfältigen Wirkungen und Anwendungsgebiete funktioneller Lebensmittel sind in Übersichtsarbeiten dargestellt worden (GROENEVELD, 1998; SALMINEN et al., 1998; SANDERS, 1998; ZIEMER und GIBSON, 1998; SCHREZENMEIR, 1999).

Eine andere wichtige Stoffgruppe im Gesamtkonzept der funktionellen Lebensmittel stellen **Präbiotika** dar. GIBSON und ROBERFROID (1995) definieren Präbiotika sinngemäß als nichtverdauliche Lebensmittelbestandteile, die durch selektive Wachstums- und/oder Aktivitätsbeeinflussung bestimmter Bakterien im Dickdarm beim Wirt einen gesundheitsfördernden Effekt hervorrufen. Die Begriffsbestimmung der Arbeitsgruppe „Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln“ am BgVV lautet ähnlich, jedoch mit der Ergänzung, daß „selektiv Bifidobakterien bzw. möglicherweise auch andere Mikroorganismen in ihrem Wachstum gefördert werden und dadurch positive gesundheitliche Wirkungen erzielen“ (BgVV, 1999). Die wichtigsten präbiotischen Substanzen bestehen aus einer unterschiedlich großen Zahl von Fruktosebausteinen. Insbesondere Oligosaccharide wie Inulin und Oligofruktose (Fruktane) werden als Präbiotika eingesetzt. Im Dickdarm erfolgt sodann die Fermentation dieser Kohlenhydrate bevorzugt durch Vertreter des Genus *Bifidobacterium*. Bifidobakterien besitzen im Gegensatz zu anderen intestinalen Mikroorganismen spezifische Enzyme, die die Verstoffwechslung von Fruktanen ermöglichen und ihnen somit einen Nährstoffvorteil gegenüber anderen Darmbakterien erbringen (WISKER, 2001).

Über die besondere Bedeutung und Zusammensetzung der intestinalen Bifidus-Flora bei Säuglingen und Erwachsenen wurde bereits von REUTER (1963b) berichtet. Der durch Präbiotika zu erzielende Effekt einer selektiven Förderung der Bifidobakterien bei gleichzeitiger Unterdrückung von unerwünschten Keimen ist in zahlreichen Publikationen beschrieben worden (GIBSON und ROBERFROID, 1995; GIBSON, 1999; HOWARD, 1995; ROBERFROID, 1998). Für Kombinationen von probiotischen und präbiotischen Komponenten, deren Vorteile in *einem* Lebensmittel synergistisch vereint werden, ist die Bezeichnung **Synbiotika** geprägt worden. Synbiotika sollen zu

einer erhöhten Überlebensrate während der Magen/Duodenum-Passage und somit zu einer effizienteren Implantation im Colon führen (ROBERFROID, 1998).

Pro- und präbiotische Lebensmittel unterliegen dem allgemeinen deutschen Lebensmittelrecht. Probiotische Kulturen sind Zusatzstoffe (§ 2 LMBG), für deren Verwendung jedoch gemäß § 11 Abs. 3 LMBG keine besondere Zulassung erforderlich ist (BORNEMANN, 1996). Von besonderer Relevanz für die rechtliche Beurteilung von Probiotika sind spezielle Rechtsgrundlagen für die Kennzeichnung von probiotischen Lebensmitteln, die sich auf Verbote zum Schutz vor Täuschung (§ 17 LMBG) und dem Verbot der krankheitsbezogenen Werbung (§ 18 LMBG) beziehen (BgVV, 1999). Die derzeit durchgeführten amtlichen Überprüfungen von probiotischen Lebensmitteln beschränken sich weitgehend auf Kontrollen hinsichtlich der korrekten Deklaration und Zusammensetzung im Sinne des LMBG. Eine amtliche Zulassung von Probiotika für den Einsatz in Lebensmitteln, wie sie für Futtermittelzusatzstoffe erforderlich ist, existiert gegenwärtig noch nicht, obwohl sie hin und wieder gefordert wurde (GROßKLAUS, 1999). REUTER (2001) gibt zu bedenken, daß die aufwendigen und kostenintensiven Prüfungen im Falle einer amtlichen Zulassungspflicht für Probiotika die Flexibilität der Entwicklung und Einführung neuartiger Produkte auf dem Markt erheblich einschränken würden.

Die Herstellung und die Deklaration probiotischer Lebensmittel obliegt allein der Eigenverantwortung der Produzenten. Da bestimmte metabolische Eigenschaften industriell eingesetzter *Lactobacillus*-Stämme ausgelobt werden, ist die Identität der fortlaufend in der Produktion eingesetzten Stämme in Bezug auf Produktqualität und -sicherheit von besonderer Bedeutung. Um eine Überprüfung der verwendeten Bakterienstämme durchführen zu können, sollten daher die Ausgangskulturen von Probiotika in einer anerkannten Kultursammlung hinterlegt werden (BgVV, 1999). Dieser wissenschaftlich begründeten Forderung kommt mittlerweile ein Großteil der Hersteller von probiotischen Lebensmitteln nach (REUTER, 2001).

Die Biotechnologie ist gefordert, die Wirkungsmechanismen der zahlreichen beschriebenen gesundheitsfördernden Effekte sowohl von Prä- als auch von Probiotika aufzuklären sowie Verfahren zur Verbesserung der Wirksamkeit zu entwickeln und zu prüfen. Nach SALMINEN et al. (1998) bedarf es für die Entwicklung speziell auf die Mikroökologie des Darmes zugeschnittener funktioneller Lebensmittel der intensivierten Forschung auf den Gebieten der Verdauungsphysiologie,

Mikroökologie, Immunologie sowie der Funktion intestinaler Schleimhäute. Ferner werden weitere Erkenntnisse über Kolonisierungsfähigkeiten, biochemische Aktivitäten und immunmodulatorische Eigenschaften von Laktobazillen und Bifidobakterien benötigt, um eine rationale Auswahl von Bakterienstämmen für den probiotischen Einsatz zu ermöglichen (TANNOCK, 1998).

#### **2.2.4.2.2 Probiotika in Futtermitteln**

Der Einsatz von Probiotika in der **Tierernährung** basiert auf der Erkenntnis, daß der intestinalen Mikroflora eine besondere Bedeutung hinsichtlich der Widerstandskraft gegen Infektionen sowie einer besseren Futtermittelnutzung zukommt. Bei Jungtieren führen insbesondere Stressbelastungen zu einer veränderten Zusammensetzung und/oder Aktivität der intestinalen Mikroflora, die durch den Einsatz von Probiotika wieder normalisiert werden soll (HENTGES, 1992; FULLER, 1999).

In der Tierernährung werden probiotische Kulturen zur Prophylaxe von Durchfällen eingesetzt (SIMON, 2001). Insbesondere die Aufzucht von Jungtieren, die bei der Umstellung von Milchernährung auf Mastfutter häufig an Verdauungsstörungen und infektiösen Enteritiden erkranken, wird durch den Einsatz von Probiotika günstig beeinflusst. Im Rahmen eines Fütterungsversuches konnten SADIEK und BÖHM (2001) durch die Applikation eines probiotischen Futtermittelzusatzstoffes während einer abrupten Futterumstellung bei einjährigen Schafen einen positiven Einfluß auf Blutparameter und Pansensaft feststellen. Nach Herstellerangabe setzt sich dieses Probiotikum aus Milchsäurebakterien der Genera *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei* und *L. fermentum*) und *Pediococcus* (*P. acidilactici*) in einer Konzentration von  $10^6$  KbE/g Produkt zusammen. Aber auch der therapeutische Einsatz von probiotischen Kulturen bei Durchfällen sowie der Effekt verbesserter zootecnischer Leistungen bei Nutztieren (z.B. erhöhte Milch- oder Mastleistung) sind untersucht und beschrieben worden (GEDEK, 1993; MÄNNER und SPIELER, 1997; SIMON, 2001). Eine Zusammenfassung beschriebener Probiotika-Wirkungen bei einigen Nutztierarten gab FULLER (1999).

Tab. 9: Potentielle gesundheitsfördernde Effekte von Probiotika bei Nutztieren nach FULLER (1999)

- 
- verbesserte Resistenz gegen Infektionskrankheiten
  - beschleunigtes Wachstum
  - verbesserte Futterumsetzung bzw. -verwertung
  - verbesserte Verdauung (Absorption von Nährstoffen)
  - Bereitstellung essentieller Nährstoffe
  - erhöhte Milchleistung
  - verbesserte Milchqualität
  - erhöhte Legeleistung
  - verbesserte Eiqualität
  - verbesserte Qualität des Schlachttierkörpers
- 

Die Anwendung von Probiotika in der Prophylaxe und Therapie soll zu einem verringerten Einsatz oder gar Ersatz von Antibiotika in der Tiermast führen. Im Gegensatz zu Antibiotika bedingen Probiotika keinerlei Rückstände in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, so daß die Beachtung von Wartezeiten entfällt. Ferner wird die potentielle Gefahr der Resistenzausbildung und -übertragung vermindert.

Zahlreiche Spezies aus der Gruppe der Milchsäurebakterien, aber auch von anderen Bakterien sowie Kombinationen dieser Spezies, werden als Futtermittelzusatzstoffe in der Tierernährung eingesetzt. Besondere Beachtung im Hinblick auf die Verwendung als Probiotikum erlangte *Lactobacillus reuteri*. Diese Spezies ist ein physiologischer Bestandteil der intestinalen Mikroflora der meisten Nutztiere und konnte insbesondere bei Schweinen und Geflügel nachgewiesen werden (DOBROGOSZ et al., 1989). In Untersuchungen von CASAS et al. (1994) und CASAS und DOBROGOSZ (1997) konnten für *L. reuteri* probiotische Effekte für verschiedenartige Anwendungen dargestellt werden. Die Stämme wurden jeweils ausschließlich bei derselben Tierart eingesetzt, aus der sie ursprünglich isoliert worden waren und führten zu den erwünschten Wirkungen in Form von Infektionsprophylaxe des Intestinaltraktes sowie einer Erhöhung der täglichen Gewichtszunahme. Als ein weiteres Einsatzgebiet für *L. reuteri* nannten KLEIN et al. (1997) die Prophylaxe der Salmonellose bei Tauben.

Futtermittelzusatzstoffe, als solche werden auch probiotische Kulturen eingestuft, unterliegen einer strengen rechtlichen Reglementierung. Während bis Anfang 1997 bereits vorhandene Präparate eine befristete Zulassung hatten, ist für Zusatzstoffe mittlerweile eine ausgiebige Prüfung zwingend vorgeschrieben. Um eine EU-Zulassung zu erhalten, müssen die Präparate spezielle Anforderungen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit, der Stabilität in der Futtermittelzubereitung, der gesundheitlichen und ökologischen Unbedenklichkeit sowie der genetischen Stabilität erfüllen. Die Richtlinie 94/40/EG stellt besondere Anforderungen an die biologische Sicherheit von Futtermittelzusatzstoffen. Insbesondere müssen Pathogenitätsfaktoren sowie Resistenzen gegen Antibiotika bzw. deren Übertragung ausgeschlossen werden können (s. 2.3.2). Eine ausführlichere Darstellung dieser Thematik gibt REUTER (2001) in einer Übersichtsarbeit.

#### **2.2.4.2.3 Einsatz von Laktobazillenkulturen in der Pharmazie**

Laktobazillenkulturen werden schon seit geraumer Zeit für therapeutische Zwecke eingesetzt. Bereits 1908 stellte der russische Bakteriologe METSCHNIKOW eine These auf, die besagte, daß die im Joghurt enthaltenen Bakterien Fäulnisprozesse der Darmflora unterdrücken, die Entwicklung der Arteriosklerose verhindern sowie das menschliche Leben verlängern sollten. REUTER (1969) teilte die Anwendungsgebiete des therapeutischen Einsatzes von Laktobazillenkulturen auf Grund ausgewerteter Literatur wie folgt ein:

- **Gastroenterologische Erkrankungen** - Beseitigung von Antibiotikafolgeschäden, Behebung von funktionellen Darmstörungen (Obstipationen, Diarrhöen, entzündliche Darmprozesse)
- **Dermatologische Erkrankungen** - Ekzeme, orale Infektionen (Gingivitiden, Stomatitiden)
- **Urologische Erkrankungen** - Nephritiden
- **Gynäkologische Erkrankungen** - Vaginalinfektionen
- **Ernährungsphysiologie** - Verbesserung der Gewichtszunahme
- **Neurologische Erkrankungen** - hepatische Enzephalopathie

Die therapeutische Wirksamkeit von Laktobazillenkulturen ist in zahlreichen wissenschaftlichen Untersuchungen belegt worden. Das Wirkprinzip der

Laktobazillen bei der Behandlung von Infektionen des Urogenitaltraktes sowie des Gastrointestinaltraktes beruht u.a. auf bakterieller Interferenz, d.h. auf Stärkung der körpereigenen Mikroflora durch antagonistische Aktivität substituierter Kulturen.

In einem anderen Ansatz können durch den von NURMI und RANTALA (1973) beschriebenen CE-Effekt („competitive exclusion“) unerwünschte Bakterien (z.B. *Salmonella*- und *Campylobacter* spp.) bei Neugeborenen an der Besiedelung der intestinalen Schleimhäute gehindert werden. Dieser ursprünglich gegen *Salmonella*-Infektionen des Mastgeflügels beschriebene Effekt beruht auf der Applikation einer von gesunden erwachsenen Tieren stammenden komplexen Mikroflora, die aus obligat und fakultativ anaeroben Bakterien zusammengesetzt ist und als typisch für das jeweilige Habitat angesehen werden kann. Diese so gewonnene Mikroflora ist allerdings nicht definiert oder standardisiert. Dieses Wirkprinzip der kompetitiven Verdrängung, d.h. die Verhinderung der Kolonisierung eines bestimmten Habitates durch unerwünschte Keimgruppen, dürfte auch auf die Therapie dysbiotischer Zustände beim Menschen übertragbar sein.

Um einen therapeutischen Effekt zu erzielen, muß ein pharmazeutisches Präparat die entsprechend wirksamen, d.h. lebensfähigen Bakterienkulturen, in ausreichender Menge enthalten. Präparate für den Menschen weisen in etwa eine Konzentration von  $10^8$ - $10^{10}$  KbE/galenische Zubereitungsform (z.B. Tablette, Suppositorium) auf. Bei mikrobiologischen Überprüfungen von pharmazeutischen Zubereitungen hat sich in der Vergangenheit gezeigt, daß pharmazeutische Präparate von ihren Herstellern nicht immer korrekt deklariert worden sind und daß sogar bedenkliche Bakterien (aerobe Sporenbildner, *Enterobacteriaceae*) vorgekommen sind (REUTER, 1969). Die Überprüfung war bisher schwierig, weil zu wenig Referenzlaboratorien zur Verfügung standen (REUTER et al., 2000a).

Eine neue Dimension eines prophylaktischen Einsatzes von Laktobazillen ergibt sich aus ihrer besonderen Eignung, als Vehikel für eine Immunisierung genutzt zu werden. So eignen sich Laktobazillen hervorragend zur oralen Applikation von Antigenen, da sie die Fähigkeit zur Adhäsion an bestimmten Schleimhautoberflächen besitzen und aufgrund genetischer Manipulationen selbst kaum immunogene Wirkungen aufweisen. Neben einer lokalen Immunreaktion mit resultierendem Schutz der Schleimhaut vor Infektionen induziert die orale Applikation von Vakzine nicht selten auch systemische Immunantworten (WELLS et al., 1996; POWELS et al., 1998;

SCHMIDT, 2000). Erst kürzlich gewonnene Forschungserkenntnisse über die sowohl intra- als auch extrazellulär mögliche Exprimierung von Fremdproteinen ebnet den Weg für den prophylaktischen Einsatz von Bakterienkulturen zur Bekämpfung von infektiösen Krankheiten (POUWELS, 2000). Obwohl sich die Arbeiten gegenwärtig noch im Entwicklungsstadium befinden, scheint die Bekämpfung von einigen bakteriellen und viralen Infektionskrankheiten auf diesem Wege möglich. An Modell-Antigenen von *Clostridium tetani*, dem Verursacher des Wundstarrkrampfes, und dem humanen Influenzavirus wird derzeit geforscht, so daß zukünftig wirksame Impfstoffe für die orale Immunisierung zur Verfügung stehen könnten (MERCENIER, 1999; POUWELS, 2000). Da die orale Verabreichung von Antigenen gegenüber der parenteralen Applikation auch finanzielle Vorteile besitzt, dürfte diesem Anwendungsgebiet in Zukunft im Rahmen von Impfprogrammen eine besondere Bedeutung zukommen (DALY et al., 1999).

Für die rechtliche Beurteilung probiotischer Pharmazeutika wird das Arzneimittelrecht herangezogen, das neben Forderungen zur Wirksamkeit auch den Ausschluß gesundheitlich bedenklicher Nebenwirkungen fordert.



## 2.3. Sicherheit beim Einsatz von Laktobazillen in der Biotechnologie

### 2.3.1 Potentielle Pathogenität von Laktobazillen

Obwohl Laktobazillen generell nicht als pathogen anzusehen sind, ist ihr gelegentliches Auftreten bei gewissen Krankheitsbildern bekannt geworden (DICKGIEßER et al., 1984; KLEIN et al., 1992, 1998b; AGUIRRE und COLLINS, 1993; TEUBER, 2000). Es handelt sich in der Regel um Fälle von immunsupprimierten oder länger therapierten Patienten. Als Begleitflora von Endokarditiden wurden die Spezies *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* und *L. salivarius* von HARTY et al. (1994) beschrieben.

Einen Hinweis für eine differenzierte Betrachtung gibt das Merkblatt B 006 (Bakterien) der BERUFSGENOSSENSCHAFT DER CHEMISCHEN INDUSTRIE (1997), in dem alle bekannten Bakterienspezies entsprechend ihres Risikopotentials für Beschäftigte in der Biotechnologie beim Umgang mit Mikroorganismen eingruppiert werden (Tab. 10). Grundlage für die Einstufung sind Berichte in der einschlägigen Literatur.

Tab. 10: Eingruppierung von Mikroorganismen in **Risikogruppen** für Beschäftigte in der chemischen Industrie und der Biotechnologie (BERUFSGENOSSENSCHAFT DER CHEMISCHEN INDUSTRIE, 1997)

Risikogruppe	Kriterien für die Eingruppierung
1	<b>Kein Risiko</b> für Mensch und Tier
1+	In <b>Ausnahmefällen</b> aus klinischem Material isoliert, ein kausaler Zusammenhang ist nicht sicher zu belegen
2	Erkrankung ist möglich, <b>Risiko ist gering</b>
2TA	Arten, von denen Stämme bekannt sind, die <b>langjährig sicher</b> in der <b>technischen Anwendung (TA)</b> gehandhabt wurden. Diese bewährten Stämme können daher nach den Eingruppierungskriterien in Gruppe 1 fallen
3	Erkrankung ist möglich, <b>Risiko ist mäßig</b>
4	Erkrankung ist möglich, <b>Risiko ist hoch</b>

Laktobazillen werden zumeist Risikogruppe 1 bzw. 1+ zugeordnet. Mit Ausnahme der Spezies *L. amylovorus* und *L. gallinarum* sind alle Vertreter der *L. acidophilus*-Gruppe in Risikogruppe 1+ eingestuft. Diese Eingruppierung beruht auf vereinzelt Berichten über die Isolierung von Vertretern aus der *L. acidophilus*-Gruppe, die aus

klinischen Untersuchungsproben beim Menschen isoliert werden konnten. Da es sich bei *L. acidophilus* um eine jahrzehntelange bekannte und gebräuchliche Stammbezeichnung handelt, war es unvermeidbar, daß nicht korrekte Zitierungen auftraten. Allerdings war ein kausaler Zusammenhang zwischen den isolierten Spezies und den Krankheitsprozessen in keinem Fall sicher zu belegen. Dies trifft auch für einen *L. fermentum*-Stamm zu, der als Auslöser bei einer Endokarditis isoliert werden konnte (GASSER, 1994).

Da *L. rhamnosus* auch in zahlreichen anderen Berichten über die Beteiligung an Krankheitsgeschehen genannt wurde, erfolgte die Einstufung dieser Spezies in Risikogruppe 2. Allerdings wird *L. rhamnosus* mit einer zusätzlichen Anmerkung versehen, die auf die langjährige sichere Nutzung von Stämmen dieser Spezies bei der Herstellung fermentierter Milchprodukte hinweist (Tab. 10). Zudem konnten KLEIN et al. (1995b) zeigen, daß klinische *L. rhamnosus*-Isolate ein anderes Zellwand-Proteinmuster als biotechnologisch eingesetzte Stämme aufweisen und somit dieses als ein Differenzierungskriterium herangezogen werden kann. Im Rahmen einer Literaturoswertung der Beteiligung von Laktobazillen bei bestimmten Erkrankungen stellten KLEIN et al. (1992) fest, daß Endokarditiden am häufigsten mit *L. rhamnosus* in Verbindung gebracht wurden, gefolgt von Septikämien und einzelnen Fällen von Meningitiden. Obwohl die Spezies-Identifizierungen der in früheren Untersuchungen beschriebenen *Lactobacillus*-Isolate teilweise nicht mehr eindeutig der heutigen Taxonomie entsprechen, vermuten KLEIN et al. (1992), daß Stämme von *L. rhamnosus* in mindestens 25% der beschriebenen Fälle als Begleiter von Endokarditiden in Frage kommen. Dieser Sachverhalt verdeutlicht, daß die Abgrenzung technologisch eingesetzter Stämme von pathogenen Stämmen derselben Spezies ein wichtiges Kriterium bei der Eingruppierung von Bakterien in Risikogruppen darstellt (KLEIN, 1998).

Während der Begriff Pathogenität nach medizinischer Lehrbuchmeinung meist als speziesspezifische Eigenschaft angesehen wird, definieren Mikrobiologen die Eigenschaft der Pathogenität als stammspezifische Eigenschaft (ADAMS und MARTEAU, 1995; FALKOW, 1997). So werden in probiotischen Produkten eingesetzte Vertreter aus der *L. casei*-Gruppe (*L. casei/paracasei*) in Risikogruppe 1 eingestuft, obgleich der Nachweis anderer Stämme dieser Spezies bei klinischen Infektionen ebenfalls bekannt ist (KLEIN et al., 1992; ADAMS und MARTEAU, 1995). An dieser Stelle soll nicht unerwähnt bleiben, daß der langjährig als Probiotikum in fermentierten

Milchprodukten eingesetzte *Lactobacillus rhamnosus*-Stamm „GG“ erst kürzlich in einem Leberabszess einer 74-jährigen Frau identifiziert wurde (TEUBER, 2000). Allerdings litt diese Patientin seit mehreren Jahren an Bluthochdruck und an insulinunabhängigem Diabetes mellitus, so daß gewissermaßen prädisponierende Faktoren für eine Translokation vom Darmtrakt in die Leber vorlagen. Über einen weiteren klinischen Fall, bei dem es im Rahmen einer Peritoneal-Dialyse ebenfalls zu einer Infektion mit einem opportunistischen *L. rhamnosus*-Stamm gekommen war, berichteten KLEIN et al. (1998b). Auch bei diesem Patienten lag eine Prädisposition in Form einer chronischen Nierenerkrankung sowie ein Diabetes mellitus vor. NAUDÉ et al. (1988) beschrieben einen Fall, bei dem *L. rhamnosus* im Rahmen einer subakuten Endokarditis isoliert wurde. Auch hier bestand eine Prädisposition, da der Patient seit geraumer Zeit an einer schweren Herzinsuffizienz gelitten hatte.

In einem Versuch zur bakteriellen Translokation von drei probiotischen Laktobazillen-Stämmen (*L. acidophilus*, *L. rhamnosus* und *B. lactis*) konnten ZHOU et al. (2000) zeigen, daß die hochdosierte orale Applikation dieser Stämme keine nachteiligen Auswirkungen auf den allgemeinen Gesundheitszustand, Futteraufnahme, Gewichtszunahme sowie der Morphologie intestinaler Schleimhäute von Mäusen hatte. Ferner konnten im Rahmen dieser Untersuchung keine lebenden Bakterien aus dem Blut bzw. aus Gewebeproben (Lymphknoten, Leber, Milz) bzw. behandlungsassoziierte Erkrankungen oder Todesfälle beobachtet werden, so daß diese Stämme hinsichtlich der Anwendung beim Menschen als ungefährlich beurteilt wurden. Auf der Grundlage einer umfangreichen klinischen Studie stellten MACFIE et al. (1999) die Hypothese auf, daß das Phänomen der bakteriellen Translokation bei allen Individuen vorkommt, sich jedoch bei Vorhandensein eines intakten Immunsystems klinisch nicht äußert.

Insgesamt haben durch Laktobazillen begleitete Krankheitsgeschehen, verglichen mit anderen bakteriellen Infektionen, eine ausgesprochen geringe Inzidenz, da die Schleimhäute des Verdauungsapparates beim gesunden Organismus eine schwer zu durchbrechende Schranke darstellen. Eine durch Nahrungsaufnahme verursachte Infektion durch Laktobazillen ist nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung nicht möglich (ADAMS und MARTEAU, 1995), wenn man von den oben zitierten Sonderfällen bei *L. rhamnosus* (TEUBER, 2000) absieht. Auch eine von der LABIP (Lactic Acid Bacteria Industrial Platform) organisierte Arbeitsgruppe schätzt die Gefahr einer

Infektion durch orale Aufnahme von Milchsäurebakterien als äußerst gering ein (ADAMS und MARTEAU, 1995, GUARNER und SCHAAFSMA, 1998).

Ausgenommen sind allerdings Enterokokken, die auch zur physiologischen Darmflora gehören und gelegentlich bei nosokomialen Infektionen nachgewiesen werden. Die zunehmende Resistenz gegen das Glykopeptid-Antibiotikum Vancomycin läßt die Einstufung von *Enterococcus faecalis* in Risikogruppe 2 daher als gerechtfertigt erscheinen (GASSER, 1994; ADAMS und MARTEAU, 1995). *Ec. faecium* wird in Gruppe 2 mit dem Hinweis TA geführt. Hinweise auf eine Gefahr hinsichtlich des probiotischen Einsatzes genau charakterisierter *Ec. faecium*-Stämme, die in der Tierernährung und zu therapeutischen Zwecken beim Menschen genutzt werden, bestehen jedoch laut KLEIN und PACK (1997) z.Zt. nicht, da gezeigt werden konnte, daß in Probiotika eingesetzte Stämme glykopeptidsensibel sind und keine ungewöhnlichen Resistenzen aufweisen. Ferner wurde in den gleichen Untersuchungen für probiotisch genutzte Enterokokkenstämme eine signifikant niedrigere Übertragungsrate von Glykopeptidresistenzen festgestellt. Laktobazillen, wie auch Vertreter der Genera *Leuconostoc* und *Pediococcus*, weisen im Gegensatz zu Enterokokken üblicherweise eine natürliche Resistenz gegen Vancomycin auf. Diese Resistenz kann, anders als bei Enterokokken, auch in Anwesenheit von Glykopeptiden nicht übertragen werden (KLEIN et al., 2000). Aus diesem Grunde haben Laktobazillen allgemein den sogenannten GRAS-Status (generally-recognized-as-safe) (SALMINEN et al., 1998).

### **2.3.2 Ausschluß einer potentiellen Pathogenität und einer mikroökologischen Umweltbelastung**

Der Einsatz von Bakterienkulturen in der Biotechnologie nimmt insbesondere im Bereich der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie stetig zu. Erhebliche Mengen an Mikroorganismen gelangen durch ihre Anwendung nicht nur in menschliche und tierische Populationen, sondern auch in die Umwelt. Im Darmtrakt von Mensch und Tier findet eine Vermehrung der zugeführten Bakterienkulturen statt. Mit den Faeces bzw. mit dem Kot der Nutztiere gelangen diese Mikroorganismen dann über das Abwasser bzw. auf direktem Wege in die Umwelt. Insbesondere in Abwässern, die große Mengen fermentierbarer Substrate enthalten, findet sich eine Vielfalt an heterofermentativen und homofermentativen Laktobazillen (WEISS et al., 1983a). Auch in diesem Habitat findet eine beträchtliche Vermehrung statt, so daß

Laktobazillen in einer Konzentration von bis zu  $10^5$ /ml vorliegen können (HAMMES et al., 1992).

Im Hinblick auf den industriellen Einsatz von Bakterienkulturen als Probiotika erlangen die Fragen der prinzipiellen gesundheitlichen Unbedenklichkeit, der Sicherheit in der Produktion sowie nach ökologischen Konsequenzen für die Umwelt besondere Bedeutung. Die biologische Sicherheit und die genetische Stabilität verwendeter Stämme muß auch vor dem Hintergrund zunehmender Antibiotika-resistenzen gewährleistet sein, denn hohe therapeutische Antibiotika- und Chemotherapeutika-Applikationen können zur Aufnahme von Resistenzen oder Resistenzgenen bei empfänglichen Kulturen, z.B. Enterokokken, führen (REUTER, 2001). Stämme, die übertragbare (Antibiotika-) Resistenzgene besitzen, bzw. Gene, die Antibiotika-inaktivierende Proteine codieren, sollten daher als Probiotika grundsätzlich ausgeschlossen werden. Obwohl Laktobazillen grundsätzlich Plasmid-codierte (Antibiotika-) Resistenzen aufnehmen können, besteht nach MORELLI et al. (1997) kein Grund zu der Annahme, daß ein gut charakterisierter Stamm, bei dem zumindest auf phänotypischer Ebene keine Resistenzen vorhanden sind, durch spontane Mutation seinen „*Generally Recognized As Safe*“ (GRAS)-Status verlieren sollte. Generell scheint die jahrzehntelange sichere Anwendung vieler probiotischer Kulturen ein geeignetes Kriterium für die Unbedenklichkeit eingesetzter Bakterienstämme darzustellen (BgVV, 1999). Durch eine sorgfältige Nutzen-Risiko-Analyse können etwaige unerwünschte Nebenwirkungen, insbesondere bei der Auswahl neuer industriell einzusetzender Kulturen, erfaßt und eine potentielle Gefährdung von Mensch, Tier und Umwelt im Vorfeld verhindert werden (SALMINEN und VON WRIGHT, 1998).

## **2.4 Identifizierung und Stammcharakterisierung von Laktobazillen**

### **2.4.1 Veranlassung zur Identifizierung und Stammcharakterisierung biotechnologisch genutzter Kulturen**

Der biotechnologische Einsatz von Laktobazillen in Lebensmitteln, Futtermitteln und pharmazeutischen Zubereitungen erfordert eine genaue Identifizierung und Deklaration der verwendeten Bakterienkulturen. Da bestimmte Eigenschaften industriell genutzter *Lactobacillus*-Stämme stammspezifisch sind, muß zusätzlich die Identität der eingesetzten Stämme nachvollziehbar sein (REUTER, 1997b; KLEIN et al.,

1998a). Moderne Nachweistechiken wie z.B. SDS-PAGE, RAPD-PCR, REA u.a., ermöglichen den stammspezifischen Nachweis von Bakterienkulturen, dienen aber vornehmlich der Klassifizierung. Auch der Einsatz von Gensonden ermöglicht den Nachweis von Bakterienstämmen, sofern stammspezifische Sequenzbereiche bekannt sind.

#### **2.4.2 Klassische Methoden der Identifizierung von Laktobazillen**

Als unentbehrlicher Bestandteil einer jeden Differenzierung mittels phänotypischer Methoden ist die Mikroskopie anzusehen. Dabei erlauben Gram-Färbeverhalten und Koloniemorphologie eine grundlegende Zuordnung untersuchter Isolate. Die weiterführende Differenzierung von Laktobazillen mittels **physiologischer** und **biochemischer** Tests ermöglicht in vielen Fällen eine Identifizierung bis auf Speziesebene. Charakteristische Fermentationsmuster zahlreicher unterschiedlicher Kohlenhydrate sowie Wachstumsgrenztemperaturen stellen dabei wichtige Identifizierungskriterien dar (LERCHE und REUTER, 1960, 1962; REUTER, 1964). So konnten die unterschiedlichen Stammformen innerhalb der Spezies *L. acidophilus* mit **phänotypischen Methoden** aufgetrennt und in Form von Biotypen charakterisiert werden (REUTER, 1964). Jedoch ließ die Differenzierung unterschiedlicher Biovarietäten mit klassischen Methoden der Bakteriologie eine sichere Identifizierung nicht in allen Fällen zu. Insbesondere erweist sich die Unterscheidung von *L. crispatus* und *L. gasseri* innerhalb der *L. acidophilus*-Gruppe als schwierig. Lediglich die Toleranz gegen NaCl soll als Differenzierungskriterium geeignet sein (MITSUOKA, 1992; HOLZAPFEL et al., 1997; STILES und HOLZAPFEL, 1997). Auch die Differenzierung von *L. acidophilus* sensu stricto und *L. johnsonii*, die in fermentierten Milchprodukten eingesetzt werden, gestaltet sich mit klassischen, phänotypischen Methoden mitunter schwierig (REUTER et al., 2000a). Der Ermittlung phänotypischer Charakteristika zur vorläufigen Identifizierung von Laktobazillen kommt auch im Zeitalter leistungsfähiger molekularbiologischer Untersuchungsmethoden weiterhin eine grundlegende Bedeutung zu. Da jedoch im Rahmen biotechnologischer Fragestellungen die Notwendigkeit einer zusätzlichen stammabgrenzenden Charakterisierung von Bakterienkulturen gegeben sein kann, müssen zusätzlich molekularbiologische Verfahren angewandt werden, auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

#### **2.4.3 Molekularbiologische Methoden zur Identifizierung und Stamm-charakterisierung von Laktobazillen**

Die Anwendung molekularbiologischer Methoden auf dem Gebiet der Mikrobiologie hat zu zahlreichen taxonomischen Erkenntnissen geführt. Insbesondere die Erkenntnis, daß 16S rRNA-Sequenzen als Zeitmesser der Evolution genutzt werden können, ermöglicht die Erfassung wertvoller phylogenetischer Zusammenhänge zwischen Bakterien (WOESE, 1987). Grundsätzlich gilt, daß verschiedene Untersuchungsmethoden zur Identifizierung von Mikroorganismen herangezogen werden sollten, um eine sichere Aussage treffen zu können (VANDAMME et al., 1996). Dabei hat sich für die Identifizierung von probiotischen Laktobazillenkulturen auch die Kombination von phänotypischen mit genotypischen Untersuchungsmethoden bewährt (REUTER et al., 2000a).

#### **2.4.3.1 Molekularbiologisch-phänotypische Methoden**

Eine Methode, die sich für die Identifizierung von Laktobazillen als geeignet erwiesen hat, ist das **Proteinfingerprinting** der löslichen Zellproteine mittels SDS-PAGE. Diese Methode ist in der Vergangenheit häufig im Rahmen taxonomischer Untersuchungen bei Laktobazillen eingesetzt worden (DICKS und VAN VUUREN, 1987; DYKES und VON HOLY, 1994; POT et al., 1993). Vertreter der Spezies *L. casei/paracasei*, *L. zeaе* und *L. rhamnosus* konnten von DELLAGLIO et al. (1991) mittels Proteinfingerprinting identifiziert werden. Intraspezifische Unterschiede bei Laktobazillen-Stämmen aus der *L. acidophilus*- und der *L. casei*-Gruppe wurden auch von KLEIN et al. (1994b, 1995b) dargestellt und ermöglichten eine sichere stammspezifische Abgrenzung technologisch genutzter *Lactobacillus*-Stämme von klinischen Isolaten. PACK et al. (1995) und PACK (1997) konnten in Untersuchungen, die speziell auf die *L. acidophilus*-Gruppe ausgelegt waren, eine sichere Identifizierung aller mitgeführten Stämme auf Spezies-Ebene erreichen und ebenfalls stammspezifische Unterschiede innerhalb einer Spezies aufzeigen. Unter Verwendung einer Silberdiaminfärbung gelang KLEIN et al. (1995b) eine intraspezifische Charakterisierung sowohl von probiotischen als auch von klinischen Stämmen aus der *L. casei*-Gruppe und mit der weniger aufwendigen Colloidal Coomassie Blue-Färbung die Spezies-spezifische Identifizierung von probiotischen Stämmen aus der *L. acidophilus*-Gruppe (KLEIN et al., 1998a). Stämme, die aus klinischem Material isoliert worden waren, konnten auch von FELTEN et al. (1999)

mittels SDS-PAGE verschiedenen Spezies aus der *L. acidophilus*-Gruppe und der *L. casei*-Gruppe zugeordnet werden.

Als weitere phänotypische Methoden zur Spezies-spezifischen Identifizierung von Laktobazillen sind in der Vergangenheit chromatographische **Zellwandanalysen**, **Analysen der Fettsäuren** sowie spezielle enzymatische Verfahren zur Ermittlung **biochemischer Aktivitäten** angewandt worden. Der Stellenwert dieser Untersuchungstechniken für die Identifizierung von Laktobazillen ist von PACK (1997) näher beschrieben worden mit dem Hinweis, daß diese Methoden bei diesem Genus als wenig geeignet erscheinen. Eine Charakterisierung von Laktobazillen entsprechend ihres **Resistenzverhaltens** gegenüber Antibiotika und Chemotherapeutika wurde von KLEIN (1992) durchgeführt und ermöglichte die nähere Beschreibung einzelner Spezies, wobei eine Identifizierung auf Spezies-Ebene nicht vorgenommen werden konnte. Im Rahmen der Untersuchungen von HAMILTON und SHAH (1998) zeigte sich, daß die Abgrenzung von Vertretern der Spezies *L. acidophilus*-Gruppe von Stämmen der *L. casei*-Gruppe aufgrund des unterschiedlichen Resistenzverhaltens gegen das Glykopeptidantibiotikum Vancomycin möglich ist. Sämtliche mitgeführten Stämme aus der *L. acidophilus*-Gruppe waren sensibel gegenüber Vancomycin, während sämtliche Vertreter der *L. casei*-Gruppe Resistenzen aufwiesen. Die vierzig geprüften Stämme waren mit der Ausnahme zweier aus klinischem Material entnommenen Stämme zuvor größtenteils aus probiotischen Produkten isoliert worden. Nach der Auffassung von DYKES und VON HOLY (1994) eignen sich Resistenzprüfungen im Allgemeinen aber nicht zur Charakterisierung von Bakterienstämmen, da stets mit einer gewissen Unbeständigkeit der Untersuchungsergebnisse zu rechnen ist. Besondere Bedeutung erlangt jedoch die Prüfung des Resistenzverhaltens von Stämmen, deren Einsatz als Probiotika erwogen wird (KLEIN, 1998).

#### **2.4.3.2 Molekularbiologisch-genotypische Methoden**

Sämtliche genotypischen Identifizierungsmethoden basieren auf genetisch festgelegten Nukleotidsequenzen bzw. auf der Entstehung von Nukleinsäurehybriden. Sie haben gegenüber phänotypischen Untersuchungstechniken den Vorteil, daß die Exprimierung spezifischer Merkmale beim Zielorganismus nicht notwendig ist. Bei der Erforschung phylogenetischer



Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Bakterien stellt das 16S rRNA-Molekül auch gegenwärtig den „goldenen Standard“ dar (LUDWIG und SCHLEIFER, 1999). Die Beschreibung genetischer Verwandtschaftsgrade zwischen Bakterien auf Grund von DNA-Homologieuntersuchungen hat bereits vor etwa 30 Jahren Einzug in die Bakteriologie gehalten. Auch in dem Forschungsgebiet der Laktobazillenidentifizierung wurde die revolutionäre Technik der **DNA-Sequenzierung** zur phylogenetischen Beschreibung verschiedener *Lactobacillus*-Spezies herangezogen (DELLAGLIO et al., 1973, 1975). Vergleichende Sequenzanalysen stellen aber auch gegenwärtig einen integralen Bestandteil der modernen Molekularbiologie dar und werden zur Aufklärung taxonomischer Probleme angewandt (MORI et al., 1997). Ergebnisse von DNA-Sequenzierungen ermöglichen anschließend die vergleichende Betrachtung von Nukleotidsequenzen, das heißt die Ermittlung der **DNA-Homologie** untersuchter Isolate. Dabei kann der Grad der DNA-DNA-Reassoziationsgrad denaturierter DNA-Einzelstränge prozentual ausgedrückt werden und als Indikator für den Verwandtschaftsgrad zu prüfender Stämme herangezogen werden. Dieser Reassoziationsgrad wird nach STACKEBRANDT und GOEBEL (1994) als Basis für Spezies-Zuordnungen angesehen. Da sämtliche genotypischen Verfahren jedoch nicht universell einsetzbar sind, muß ihre Anwendbarkeit für jede Fragestellung geprüft und gegebenenfalls angepaßt werden.

Ein Verfahren, das mikrobiologische Analysen geradezu revolutioniert hat, stellt die **PCR-Technik** (Polymerase Chain Reaction) dar. Grundsätzlich wird die von MULLIS und FALOONA (1987) beschriebene PCR-Methode zur exponentiellen Vermehrung der DNA eingesetzt. Durch gelelektrophoretische Auftrennung können derart amplifizierte Nukleinsäuren sichtbar gemacht und weiterführenden Untersuchungen zugeführt werden. Zur Identifizierung von *Lactobacillus*-Spezies sowohl aus der *L. acidophilus*- als auch aus der *L. casei*-Gruppe ist die PCR von WARD und TIMMINS (1999) resp. KULLEN et al. (2000) erfolgreich eingesetzt worden. Das Spektrum der Anwendungsmöglichkeiten der Polymerase-Kettenreaktion-Methode ist in den letzten Jahren enorm erweitert worden. MALINEN et al. (2001) konnten zeigen, daß eine Stamm-spezifische Identifizierung industriell genutzter Starterkulturen sowie probiotischer Stämme durch die genetische Markierung, d.h. durch die Insertion eines spezifischen DNA-Abschnittes möglich ist. Derart „mutierte“ Stämme lassen sich anschließend mit spezifischen PCR-Primern in verschiedensten Habitaten, z.B. Stuhl- oder Milchproben, nachweisen. Auch für andere genotypische Identifizierungs-

methoden, die nachfolgend noch besprochen werden, stellt die PCR-Technik einen integralen Bestandteil dar.

Eine Modifikation der PCR-Methode stellt die **RAPD-PCR-Methode** (Randomly Amplified Polymorphic DNA) dar. Diese auf der Verwendung von Zufallsprimern beruhende Abwandlung der PCR hat sich auch zur Identifizierung von Laktobazillen bewährt (TORRIANI et al., 1996). DU PLESSIS und DICKS (1995) haben mit dieser Technik bereits *Lactobacillus acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* und *L. johnsonii* differenziert. PIEHL (1995) konnte mit der RAPD-PCR eine intraspezifische Differenzierung von Stämmen aus der *L. acidophilus*- und der *L. casei*-Gruppe erreichen. Mit gewisser Einschränkung war das RAPD-PCR-Verfahren auch zur Identifizierung von Laktobazillen auf Spezies-Ebene geeignet. TILSALA-TIMISJÄRVI und ALATOSSAVA (1998) setzten durch RAPD-PCR-Technik ermittelte Primer zur Spezies-spezifischen Identifizierung von probiotischen *L. rhamnosus*-Stämmen erfolgreich ein. Nach VAN REENEN und DICKS (1996) können RAPD-PCR-Profile auch zur Differenzierung der nahe verwandten Spezies *L. plantarum* und *L. pentosus* bzw. zur Differenzierung von *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* und *L. delbrueckii* ssp. *lactis* genutzt werden (TORRIANI et al., 1999).

Die sogenannte **Intergenic-Spacer-Region (ISR)-Methode** basiert auf einer Sequenzierung der Desoxyribonukleinsäure. Die ISR stellt einen hochkonservierten Sequenzbereich zwischen den für die 16S- und 23S rRNA- oder 23S- und 5S rRNA codierenden Genen dar und kann mit spezifischen Primern und der PCR-Technik amplifiziert und anschließend sequenziert werden. Diese Interspace-Region zeichnet sich durch eine hohe Variabilität bei unterschiedlichen Bakterienspezies aus und kann aus diesem Grunde zur Spezies- oder gar Stamm-spezifischen Identifizierung herangezogen werden. Diese Technik wurde von TILSALA-TIMISJÄRVI und ALATOSSAVA (1997) zur Identifizierung von probiotischen Laktobazillen erfolgreich eingesetzt. Auch TANNOCK et al. (1999) nutzten die ISR-Methode im Rahmen mikroökologischer Erhebungen zur Identifizierung von *Lactobacillus*-Spezies aus unterschiedlichen Habitaten. Von CHEN et al. (2000) wurde die ISR-Methode auf Stämme aus der *L. casei*-Gruppe angewandt. Dabei gruppierte sich der mitgeführte *L. casei*-Typstamm (ATCC 393<sup>T</sup>) allein in einem Cluster, während der ebenfalls untersuchte *L. casei*-Stamm ATCC 334 sich durch weitgehende Ähnlichkeit zu anderen, gut charakterisierten *L. casei*-Stämmen auszeichnete. Diese Tatsache unterstützt die

Vorschläge von DELLAGLIO et al. (1991), DICKS et al. (1996) sowie MORI et al. (1997), diesen Stamm als Neo-Typstamm von *L. casei* zu designieren (s. auch Kap. 2.1.2).

Eine weitere zur Identifizierung von Bakterien geeignete Methode ist die Restriktionsenzymanalyse (REA). Dieses Verfahren beruht auf der enzymatischen Zerschneidung von DNA durch sogenannte Restriktionsendonukleasen, wobei häufig zunächst die Amplifizierung der zu untersuchenden DNA mit der PCR-Technik durchgeführt wird. Die erhaltenen Restriktionsfragmente werden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Anfärbung in Form charakteristischer Bandenmuster sichtbar. Die Wahl der Restriktionsenzyme ist Genus-abhängig und muß experimentell bestimmt werden (O'SULLIVAN, 1999). Diese relativ schnell und kostengünstig durchführbare Methode wurde bereits vor über 10 Jahren zur Identifizierung der Spezies *L. reuteri* und *L. plantarum* angewandt (STÄHL et al., 1990). Nachfolgend gelang auch die Identifizierung der Spezies *L. fermentum* sowie *L. delbrueckii* mit der REA (STÄHL et al., 1990; GIRAFFA et al., 1998).

Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) stellt im Prinzip eine modifizierte Restriktionsenzymanalyse dar, bei der ein pulsierendes elektrisches Feld dazu dient, DNA-Fragmente im Agarosegel aufzutrennen. Im Gegensatz zur herkömmlichen REA werden selten schneidende Restriktionsenzyme eingesetzt, so daß weniger Restriktionsfragmente entstehen, die jedoch deutlich größer sind als bei der REA und aufgrund ihrer Größe nur im elektrischen Wechselfeld aufgetrennt werden können und nachfolgend stammspezifische Bandenmuster ergeben (ROUSSEL et al., 1993). In Untersuchungen zur Feindifferenzierung von probiotischen *Lactobacillus*- und *Enterococcus*-Stämmen konnten PIEHL et al. (1995) stets reproduzierbare speziestypische PFGE-Bandenmuster darstellen; auch die intraspezifische Unterscheidung mitgeführter Isolate war stets gegeben. In Erhebungen von KLEIN (1998) und TYNKKYNNEN et al. (1999) erwies sich die PFGE zur intraspezifischen Differenzierung von Laktobazillen-Stämmen als die genaueste und zuverlässigste Möglichkeit zur Auffindung von chromosomalen Variationen. Obgleich die PFGE eine in jeglicher Hinsicht aufwendige Methode darstellt, ist sie zur Differenzierung von Laktobazillen auf Genus-, Spezies- und sogar auf Stammebene besonders geeignet (REUTER et al., 2000a).

Als weitere genotypische Methode zur Identifizierung von Laktobazillen wird das **Ribotyping** angewandt. Dieses Verfahren kann ebenfalls als Modifikation einer

Restriktionsenzymanalyse angesehen werden, wobei rRNA Genabschnitte und/oder ihre Spacer Regionen als (markierte) Sonden genutzt werden, die mit genomischen Restriktionsfragmenten hybridisieren. Liegen bei den untersuchten Bakterien genetische Unterschiede vor, resultieren aus einer Ribotyping-Analyse sogenannte Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismen (RFLP's), die eine intraspezifische Feindifferenzierung von *Lactobacillus*-Stämmen ermöglichen (RODTONG und TANNOCK, 1993; SCHLEIFER et al., 1995; ZHONG et al., 1998; TYNKKYNNEN et al., 1999).

Die **Temperatur-Gradient-Gel-Elektrophorese** (TGGE) wird bevorzugt zur Untersuchung komplexer Bakterienpopulationen im Rahmen mikroökologischer Erhebungen eingesetzt (MUYZER et al., 1993). Bei dieser Methode werden amplifizierte Fragmente von Genen, die für die 16S rRNA codieren, in einem Agarosegel aufgetrennt (ROSENBAUM und RIESNER, 1987). Die Differenzierung untersuchter Isolate beruht dabei auf der bei unterschiedlichen Temperaturen veränderten elektrophoretischen Motilität der jeweils zuvor mittels PCR-Technik amplifizierten Genfragmente im Agarosegel. Dabei ist die Motilität eines Genfragmentes abhängig von der Schmelztemperatur, die wiederum durch die Basensequenz festgelegt wird. Die TGGE wurde von COCOLIN et al. (2000) erfolgreich zur Identifizierung der in fermentierter Rohwurst vorkommenden *Lactobacillus*-Spezies eingesetzt.

Eine modifizierte Variante der TGGE stellt die sogenannte **Denaturing-Gradient-Gel-Elektrophorese** (DGGE) dar. Anstelle eines Temperaturgradienten wird bei der DGGE die Elektrophorese durch ein Gel mit stetig zunehmender Konzentration eines denaturierenden Agens, meist Harnstoff oder Formalin, durchgeführt (O'SULLIVAN, 1999). Auch hier ist die Laufstrecke im Gel abhängig vom Schmelzpunkt des jeweiligen Genfragmentes. In Kombination mit Spezies-spezifischen PCR-Primern, setzten WALTER et al. (2000) die DGGE zur Identifizierung gastrointestinaler *Lactobacillus*-Spezies ein. Die gleiche Methodik wandten auch SIMPSON et al. (2000) an, und zwar im Rahmen ihrer Untersuchungen zur Verlaufskontrolle der Entwicklung der Gastrointestinalflora von Absatzferkeln, die mit dem Futter einen probiotischen *L. reuteri*-Stamm erhielten.

Da bestimmte metabolische bzw. physiologische Eigenschaften von Laktobazillen Plasmid-codiert sind, kann die **Plasmidanalyse** als weitere genotypische Methode zur Identifizierung herangezogen werden. Die Plasmidanalyse beruht auf der

Isolierung und Darstellung extrachromosomaler DNA in Agarosegelen. Das Verfahren eignet sich besonders zur Differenzierung von Isolaten aus unterschiedlichen Habitaten, z.B. aus der Vagina, fermentierten Lebensmitteln sowie aus dem Gastrointestinaltrakt (TANNOCK et al., 1990; ROUSSEL et al., 1993; REID et al., 1996). Für Stämme aus der *L. acidophilus*-Gruppe erscheint die Plasmidanalyse jedoch nicht sonderlich geeignet, da häufig keine Plasmide vorhanden sind (KLEIN, 1998). Aber auch bei Vorhandensein von Plasmiden ist grundsätzlich mit einer gewissen Instabilität zu rechnen, so daß die Plasmidanalyse stets in Kombination mit anderen Verfahren eingesetzt werden sollte.

Die in der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung von Laktobazillen-Spezies angewandte **Gensonden-Technik** soll im Folgenden ausführlicher beschrieben werden. Der Einsatz von Gensonden erfolgt bereits seit mehr als 20 Jahren routinemäßig in der mikrobiologischen Diagnostik, v.a. im medizinischen Bereich (TENOVER, 1988). Die Identifizierung von Laktobazillen mittels Gensonden wurde zur gleichen Zeit erstmals beschrieben (PETRICK et al., 1988) und nachfolgend von zahlreichen Arbeitsgruppen hinsichtlich lebensmittelmikrobiologischer Fragestellungen bearbeitet (BETZL et al., 1990; DELLEY et al., 1990; HERTEL et al., 1991; HENSIEK et al., 1992). Die Identifizierung von Vertretern aus der *L. acidophilus*-Gruppe mittels Spezies-spezifischer 23S rRNA-Gensonden wurde kurz darauf von POT et al. (1993) durchgeführt und auch Sonden für Spezies aus der *L. casei*-Gruppe wurden beschrieben (HERTEL et al., 1993). Auf der Analyse hypervariabler Bereiche von Nukleinsäuremolekülen basierende Oligonukleotid-Gensonden sind nachfolgend auch von VOGEL et al. (1994) und SCHLEIFER et al. (1995) abgeleitet und erfolgreich zur Identifizierung von Laktobazillen eingesetzt worden. In neueren Arbeiten konnte die Spezifität der bereits zuvor von POT et al. (1993) und HERTEL et al. (1993) entwickelten Sonden überprüft und bestätigt werden (XANTHOPOULOS et al., 1999; ROY et al., 2000).

Gensonden werden überwiegend von rRNA-Sequenzen abgeleitet, wobei bevorzugt die für die 16S sowie die 23S rRNA codierenden Gene als Sequenzgrundlagen bzw. Zielsequenzen für Gensonden herangezogen werden. Dies liegt in der Tatsache begründet, daß rRNA-Moleküle in zellulären Organismen die Makromoleküle mit der höchsten Abundanz, daß heißt mit dem größten Vorkommen, darstellen (NISSEN und DAINTY, 1995). Besonders geeignet erscheint dabei die Analyse von variablen Regionen der im Laufe der Evolution hochkonservierten 16S rRNA. Die

Primärstruktur (Nukleotidsequenz) der rRNA ist in den meisten Regionen sogar bei sehr entfernt verwandten Mikroorganismen hoch konserviert, insbesondere in den Regionen, die an der Bildung der Sekundärstruktur beteiligt sind. In anderen Regionen des Moleküls variieren die Nukleotidsequenzen hingegen sogar bei sehr eng verwandten Taxa (AMANN et al., 1995). Diese doppelseitige Eigenschaft von Konservierung und Variation in verschiedenen Regionen des Moleküls, in Verbindung mit der universellen und abundanten Natur der rRNA, bietet ein großes Potential für die Entwicklung effektiver Identifizierungsmethoden auf der Basis spezifischer Nukleotidsequenzen.

Voraussetzung für den Einsatz einer Gensonde ist die Kenntnis eines spezifischen bzw. kennzeichnenden Basensequenzabschnittes des zu identifizierenden Mikroorganismus bzw. einer Gruppe von Mikroorganismen (z.B. einer Spezies). Dieser dient als Zielsequenz für ein korrespondierendes, synthetisches Nukleotid (Gensonde), dessen Sequenz eine weitgehend komplementäre Struktur aufweisen muß, um die Basenpaarung (Hybridisierung) zweier Nukleinsäure-Einzelstränge, d.h. die Bildung eines sogenannten Heteroduplexes zu ermöglichen (ANDERSON, 1995). Eine 16S rRNA-zielgerichtete Gensonde ist somit das einem bestimmten Abschnitt des 16S rRNA codierenden Gens komplementäre Nukleotid und wird in 5' → 3' - Richtung angegeben.

Grundsätzlich können Hybridisierungen in Lösungen, auf Nitrozellulose- oder Nylonmembranen (Filtern) oder *in situ* durchgeführt werden, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit von den gewählten Reaktionsbedingungen abhängt. So wird im Rahmen der Hybridisierung die Reassoziationsdauer zweier DNA- oder RNA-Einzelstränge in besonderem Maße von der Hybridisierungsdauer und -temperatur, der Salzkonzentration und Viskosität der Reaktionslösung, dem pH-Wert, dem Vorhandensein von denaturierenden Agenzien (z.B. Formamid) sowie der Anzahl der *mismatches* (nicht-komplementäre Basen) der Sonde und ihrer Zielsequenz beeinflusst (BRITTEN und DAVIDSON, 1991). Wichtig für die Stabilität des durch Wasserstoffbrückenbindungen entstandenen Moleküls sind ferner die im Anschluß an die Hybridisierung durchzuführenden Waschschritte, die der Entfernung nicht gebundener Nukleotide dienen (ANDERSON, 1995). Als weitere Faktoren, die den Ablauf von Hybridisierungen beeinflussen, spielen die (Basen-) Zusammensetzung der Nukleinsäuren und die Länge der Gensonde eine Rolle, da die Schmelztemperatur der DNA bzw. RNA vom Guanin-Cytosin-Gehalt abhängt und die

Hybridisierungsrate mit zunehmendem GC-Gehalt steigt (ANDERSON und YOUNG, 1991). Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ), von Nukleotiden, die durch Zugabe von Formamid verringert werden kann, ist im Hinblick auf die Dissoziation einer Gensonde bedeutsam, denn nur eine als Einzelstrang vorliegende Sonde ist in der Lage, mit einem (möglichst weitgehend) komplementären Nukleinsäurestrang zu hybridisieren. Die höchste Reassoziationsrate bei RNA-DNA-Hybridisierungen liegt laut YOUNG und ANDERSON (1985) bei einer Hybridisierungstemperatur, die sich 10° bis 15° C unter der Schmelztemperatur der Hybride befindet, vor.

Die Spezifität einer Gensonde nimmt mit zunehmender Sondenlänge zu, wobei in der Regel Oligonukleotide mit einer Länge von 19-40 Nukleotiden eine ausreichend spezifische Bindung an ihre Zielsequenzen gewährleisten (CHARTERIS et al., 1997b). Hinsichtlich der Sensitivität geben YOUNG und ANDERSON (1985) an, daß mit der Hybridisierungstechnik bereits 1 Pikogramm einer spezifischen RNA-Sequenz detektiert werden kann. Während die weiter oben erwähnten Reaktionsparameter einen entscheidenden Einfluß auf die Stringenz der Hybridisierungsbedingungen haben, beeinflußt die Konzentration der eingesetzten Sonde lediglich die initiale Hybridisierungsrate und spielt hinsichtlich des Hybridisierungsergebnisses eine zu vernachlässigende Rolle (ANDERSON, 1995). Im Falle von Filter-Hybridisierungen können unter entsprechend stringenten Reaktionsbedingungen daher lediglich Hybride mit (weitgehend) komplementären Basensequenzen auf der Nitrozellulose- bzw. Nylonmembran haften, während ungebundene Nukleotide durch die auf die Hybridisierung folgenden Waschschriffe entfernt werden.

Der *direkte* Nachweis von Laktobazillen-Spezies in fermentierten Lebensmitteln gelang EHRMANN et al. (1994) mit der sogenannten **Reverse Dot Blot-Hybridisierungstechnik**. Hierbei handelt es sich um eine zeitsparende Variante der herkömmlichen Dot Blot-Technik, bei der durch eine *in vitro* Amplifikation von rRNA-Fragmenten (Zielgenen) auf eine Anreicherung bzw. Kultivierung verzichtet werden kann. Anstelle der Nukleinsäure der nachzuweisenden Bakterien werden bei diesem Verfahren die Gensonden auf die Trägermembran (Filter) aufgetragen. Da zahlreiche Sonden mit unterschiedlicher Spezifität auf einen Filter „geblottet“ (= aufgetragen) werden können, eignet sich dieses Verfahren besonders zur Analyse von komplex zusammengesetzten (Lebensmittel-) Proben im Hinblick auf die Produktqualität bzw. zur Erfassung von Kontaminationen, die während des Herstellungsprozesses auftreten können.

Bei der sogenannten **FISH-Technik** (Fluorescence *in-situ* Hybridization) ist das Anzüchten der nachzuweisenden Bakterien ebenfalls nicht erforderlich. Dieses Verfahren basiert auf der Hybridisierung einer einzelsträngigen fluoreszenzmarkierten Gensonde, die gegen einen Abschnitt auf der ribosomalen RNA des nachzuweisenden Organismus gerichtet ist (AMANN et al., 1995). Voraussetzung für die Hybridisierung ist wiederum die Spezifität der eingesetzten Sonde sowie die Zugänglichkeit der intrazellulär lokalisierten Zielsequenz. Letzteres erfordert eine geeignete, in der Regel enzymatische Zell-Lysis. Die FISH-Technik wird insbesondere bei mikroökologischen Fragestellungen, beispielsweise bei der Untersuchung und Quantifizierung einer komplexen Mikroflora, z.B. in Faezes, angewandt (HARMSSEN et al., 1999; AMANN und LUDWIG, 2000; SCHWIERTZ et al., 2000). Das gleiche Verfahren wurde auch von FRANKS et al. (1998) und TANNOCK et al. (2000) im Rahmen von Verlaufsuntersuchungen über die Zusammensetzung und Dynamik der Intestinalflora von Probanden eingesetzt sowie von MATTE-TAILLEZ et al. (2001) zur Identifizierung von Laktobazillen in Milch.

Da der Einsatz von Gensonden und PCR-Primern in vielen Teilbereichen der Mikrobiologie weit verbreitet ist, haben WHEELER ALM et al. (1996) ein System zur **Nomenklatur von Oligonukleotiden** vorgeschlagen. Dabei setzt sich die Bezeichnung einer rRNA-zielgerichteten Gensonde resp. eines PCR-Primers aus sieben unterschiedlichen Komponenten zusammen, die nachfolgend anhand der in dieser Arbeit beschriebenen *L. acidophilus*-Sonde (**S-S-Lacid-2519-a-A-20**) erläutert werden sollen. So beinhaltet der Name der Sonde Angaben bezüglich des Zielgens („**S**“ für small subunit-rRNA = 16S rRNA vs. „**L**“ für large subunit-rRNA = 23S rRNA), der größten zu erfassenden taxonomischen Gruppe („**S**“ für Spezies), eine 3 bis fünf Buchstaben umfassende Bezeichnung der taxonomischen (Unter-) Gruppe (hier *L. acidophilus*) sowie die genomische Lokalisation (5'- Position) in Bezug auf das ribosomale RNA Operon eines *E. coli* Stammes (BROSIUS et al., 1981). Ferner beschreibt ein Buchstabe die entsprechende Version oder Variante einer Sonde (**a** = Erstversion) sowie die Großbuchstaben A bzw. S, ob die Sondensequenz identisch zum codierenden Strang (non-template strand = S) oder zum „template strand“ (**A**) ist. An letzter Stelle wird die Länge des Nukleotids durch eine Zahl wiedergegeben.

Die zur Identifizierung von Mikroorganismen in Lebensmitteln zur Verfügung stehenden Verfahren sind vielfältig. Neben der Zuverlässigkeit einer Methode ist auch der im Rahmen eines routinemäßigen Einsatzes zu betreibende Aufwand von



besonderem Interesse. In einer Übersichtsarbeit vergleichen OLIVE et al. (1999) verschiedene genotypische Untersuchungsmethoden im Hinblick auf die Praktikabilität, Reproduzierbarkeit und Spezifität sowie entstehende Kosten. Einige der oben aufgeführten Untersuchungsmethoden wurden auch von REUTER et al. (2000a) hinsichtlich des Zeit- und Kostenaufwandes resp. der Aussagekraft für probiotische Lebensmittel charakterisiert und können von Laborleitern oder Verantwortlichen der Produktionssicherheit bei der Untersuchung von probiotischen Lebensmitteln als Hinweise für ein sinnvolles Vorgehen dienen.