

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund zahlreicher erwünschter StoffwechsellLeistungen werden Laktobazillen-Kulturen seit langem als Starterkulturen im Lebensmittelbereich, als Futterzusatzstoffe in der Tierernährung und als Therapeutika in der pharmazeutischen Industrie verwendet. Vertreter der *L. acidophilus*- und der *L. casei*-Gruppe werden in zunehmendem Maße als Probiotika in Lebensmitteln eingesetzt, wodurch sich die Notwendigkeit einer sicheren und möglichst schnell durchführbaren Identifizierung ergibt. Die klassischen mikrobiologischen Methoden der Identifizierung bis zur Spezies-Ebene erfordern meist einen hohen Zeitaufwand und liefern aufgrund unterschiedlicher Stammformen innerhalb einer Spezies nicht immer eindeutige Ergebnisse. Dabei bereitet innerhalb der *L. (= Lactobacillus) acidophilus*-Gruppe insbesondere die Differenzierung zwischen *L. crispatus* und *L. gasseri* bzw. *L. johnsonii* und *L. acidophilus* Schwierigkeiten. In der *L. casei*-Gruppe ist es durch Änderungen der taxonomischen Einstufung von Spezies zu einer beträchtlichen Verwirrung gekommen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, für die Spezies *L. acidophilus*, *L. gasseri* und *L. johnsonii* (*L. acidophilus*-Gruppe) und für *L. zaeae*, *L. paracasei* und *L. rhamnosus* (*L. casei*-Gruppe), gleichzeitig die am häufigsten eingesetzten Spezies in Probiotika, Sonden zu entwickeln und auf ihre Aussagekraft im Vergleich zu anderen molekularbiologischen Methoden zu prüfen.

Hierzu wurden die über das Internet zugänglichen Gendaten und die Computerprogramme des *NCBI/GenBank* (**N**ational **C**enter for **B**io**t**echnology **I**nformation) sowie des *RDP* (**R**ibosomal **D**atabase **P**roject) der Michigan State University, USA, genutzt. Die Synthese der *L. gasseri*-Sonde erfolgte nach partieller Sequenzierung der 16S rRNA eines *L. gasseri*-Referenzstammes (ATCC 19992 / DSM 20077) mit der PCR-Technik. Zur Prüfung der Eignung der Sonden wurden insgesamt 85 Typ- und Sammlungsstämme aus der *L. acidophilus*- und *L. casei*-Gruppe (Typ- / Referenzstämme, Isolate aus Milchprodukten, aus pharmazeutischen Präparaten und aus klinischem Material) sowie vergleichend Vertreter von sieben anderen *Lactobacillus*-Spezies und zwei *Weissella*-Spezies herangezogen. Alle Prüfstämmen waren vorher mit klassischen phänotypischen Methoden auf ihre

Einstufung überprüft worden. Die molekularbiologische Prüfung erfolgte anhand der Dot Blot-Hybridisierungstechnik.

Die Hybridisierungsergebnisse zeigten, daß Gensonden zur Speziesidentifizierung von biotechnologisch genutzten Laktobazillen dieser beiden Gruppen eingesetzt werden können. Alle geprüften Stämme der Spezies *L. acidophilus* sensu stricto wurden nur von der *L. acidophilus*-Sonde erfaßt. Bei den eng verwandten Spezies *L. gasseri* und *L. johnsonii* kam es zu Kreuzreaktionen, d.h. die *L. johnsonii*-Stämme reagierten zusätzlich mit der *L. gasseri*-Sonde. Die Abgrenzung zwischen diesen beiden Spezies gelang durch die *L. johnsonii*-Sonde, da diese lediglich mit den *L. johnsonii*-Stämmen hybridisierte.

Der *L. casei*-Typstamm (ATCC 393<sup>T</sup>) reagierte sowohl mit der *L. paracasei*- als auch mit der *L. zae*-spezifischen Sonde. Drei weitere als *L. casei* deklarierte Stämme hybridisierten lediglich mit der *L. paracasei*-Sonde, wie auch drei *L. paracasei*-Referenzstämme und ein weiterer als *L. paracasei* deklarierter Sammlungsstamm. Das veranlaßte zu einer Unterteilung der *L. casei*-Stämme in zwei Untergruppen (*L. casei* I bzw. II). Dieser Befund unterstützt einen gegenwärtigen taxonomischen Lösungsvorschlag für die *L. casei*-Gruppe, wonach der jetzige Typstamm von *L. casei* der Spezies *L. zae* zugeordnet werden soll, während die anderen *L. casei*-Stämme (inklusive des von mehreren Autoren vorgeschlagenen Neo-Typstammes ATCC 334) mit *L. paracasei* zusammengeführt werden können.

Auch unter den phänotypisch als *L. rhamnosus* identifizierten Stämmen gab es zwei Abstufungen in den Reaktionen. Etwa die Hälfte der Stämme (12) reagierte nur mit der *L. rhamnosus*-Sonde, die andere Hälfte (10) aber gleichzeitig mit der *L. paracasei*-Sonde. Die letzteren waren bis auf eine Ausnahme alle klinischen Ursprunges. Aufgrund dieser Kreuzreaktionen wurde eine Einteilung in die Untergruppen *L. rhamnosus* I bzw. II vorgenommen. Die *L. rhamnosus*-Sonde kann dennoch als Spezies-spezifisch angesehen werden. Einen Sonderfall stellte ein phänotypisch als *L. rhamnosus* identifizierter klinischer Stamm dar, der lediglich mit der *L. paracasei*-Sonde reagierte. Dieser Stamm wurde aber auch in einer anderen mittels RAPD-PCR durchgeführten Untersuchung als *L. casei* / *L. paracasei* identifiziert.

Mitreaktionen von anderen Spezies aus der *L. acidophilus*-Gruppe (*L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*) sowie von einigen anderen Vertretern der Milchsäurebakterien (*Lactobacillus* und *Weissella*) traten nicht auf.

Der Vergleich der Ergebnisse, die mittels Gensondentechnik erzielt werden konnten, mit denen, die zuvor mit anderen molekularbiologischen Methoden mit den gleichen Stämmen gewonnen werden konnten, bestätigte, daß die Gensondentechnik aussagekräftig für die Einstufung von Stämmen ist.

Da die Abgrenzung der bei Mensch und Tier zur autochthonen Mikroflora gehörenden Spezies *L. gasseri* von *L. crispatus* mit phänotypischen Untersuchungsmethoden Schwierigkeiten bereitet, und Vertretern dieser Spezies im Rahmen der Anwendung als Probiotika eine besondere Bedeutung zukommt, ist die Anwendung zusätzlicher Gensonden erforderlich. Die Herstellung und Prüfung einer *L. crispatus*-Sonde war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ein durchgeführter BLAST-Sequenzvergleich (NCBI/GenBank) des *L. gasseri*-Typstammes mit dem *L. crispatus*-Typstamm zeigte aber zwei für eine Sonde in Betracht kommende Basensequenzabschnitte auf, die eine Differenzierung mit der in dieser Arbeit angewandten Methodik ermöglichen könnten.

Hinsichtlich des Arbeitsaufwandes wies die Gensondentechnik Vorteile gegenüber anderen molekularbiologischen Methoden, z.B. der RAPD-PCR-Technik, auf. Nachteilig bei der bisherigen Technik war, daß die Kulturen angezüchtet werden mußten und erst anschließend das Dot Blot-Verfahren eingesetzt werden konnte. Eine Beschleunigung des Nachweises ist von der Reverse Dot Blot-Hybridisierungstechnik zu erwarten, bei der eine Kultivierung der nachzuweisenden Bakterien nicht erforderlich ist und das jeweilige Zielgen durch spezifische Primer vor der Hybridisierung amplifiziert wird und dadurch lediglich kurze Hybridisierungszeiten (2 bis 4 Stunden) erforderlich sind.

Die Hybridisierungstechnik ist also zur sicheren Identifizierung einiger biotechnologisch wichtiger Laktobazillen-Spezies geeignet. Weitere Sonden, insbesondere für die Spezies *L. crispatus* und *L. casei/L. paracasei* müssen geprüft werden. Auch die Eignungsprüfung dieser Methode in der Routine steht noch aus. Auf Grund der Ergebnisse mit Sammlungsstämmen, die aus Handelsprodukten stammten, wird aber von der Einsatzfähigkeit in der Routine ausgegangen.