universität wien

DIPLOMARBEIT

Molekularbiologische Differenzierung und Identifizierung

von *Lactobacillus*-Isolaten mit

RAPD-PCR und PFGE

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasser:	Cornelius Marcel Dürrer
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	A 474 Diplomstudium Ernährungswissenschaften
Betreuer:	Ao. Univ. Prof. DI Dr. Helmut Mayer
	Universität für Bodenkultur Department für Lebensmittelwissenschaften und –technologie Abteilung Lebensmittelchemie

Wien, im Juli 2010

Nee, ich sag' schon! von Bakterien
Hat man früher nischt jewußt.
Da war's Essen noch 'ne Freude
Und det Trinken war 'ne Lust.
Aber seit man die Bazillen
Und dergleichen Zeugs erfund,
Is der Mensch total geliefert,
Alles is jetzt unjesund.

aus: „Überall Bakterien!"
Alexander Moszkowski, Berlin 1887

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich entscheidend beim Zustandekommen dieser Arbeit unterstützt haben.

Meinem Betreuer, Herrn Ao. Univ. Prof. DI Dr. Helmut Mayer, danke ich dafür, dass er mir die Durchführung dieser Diplomarbeit ermöglicht hat und für sein offenes Ohr bei allen Fragen und Problemen, sowie auch für seine ausgezeichnete Betreuung vom Arbeitsanfang bis zum Ende, da er mir immer mit fachkundigen Ratschlägen und Anregungen zur Seite stand.

Weiters möchte ich mich auch bei allen MitarbeiterInnen der Abteilung Lebensmittelchemie am DLWT der Universität für Bodenkultur für die gute Zusammenarbeit und das angenehme, freundschaftliche Arbeitsklima bedanken – insbesondere bei Frau Iris Biedermann für ihre ausgesprochene Hilfsbereitschaft und die unentwegte Unterstützung im Laboralltag.

Auch meinen StudienkollegInnen und FreundInnen sei an dieser Stelle mein Dank für die gute Zusammenarbeit und Motivation während des Studiums kundgetan.

Besonderen Dank möchte ich meiner Familie aussprechen, meiner Schwester Barbara und besonders meiner Mutter Oda-Antoinette, die mir während des ganzen Studiums mit Geduld, Liebe und Motivation zur Seite stand.

In Erinnerung an meinen Vater, Ing. Friedrich Dürrer

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Fragestellung……1

2 Literaturüberblick……3

2.1 Milchsäurebakterien…… 3

2.1.1 Allgemeines…… 3
2.1.2 Systematik der Milchsäurebakterien…… 5
2.1.2.1 Die Gattung *Lactobacillus*…… 8
2.1.3 Vorkommen und Relevanz der Milchsäurebakterien…… 9
2.1.3.1 Besiedelung des Menschen…… 9
2.1.3.2 Milchprodukte…… 10
2.1.3.3 Fermentierte Gemüse…… 11
2.1.3.4 Fleisch und Fleischprodukte…… 12
2.1.3.5 Sauerteig…… 13
2.1.3.6 Genussmittel…… 16
2.1.3.7 Silage…… 17
2.1.3.8 Milchsäurebakterien als Getränkeschädlinge…… 17
2.1.4 Probiotika…… 18
2.1.4.1 Auswahlkriterien für den Einsatz probiotischer Kulturen…… 21
2.1.4.2 Gesetzliche Regelungen…… 23
2.1.4.3 Gesundheitliche Relevanz von Probiotika…… 25
2.1.5 Präbiotika…… 31
2.1.6 Synbiotika…… 35
2.1.7 Beurteilung der Sicherheit von Milchsäurebakterien…… 37

2.2 Methoden zur Charakterisierung, Identifizierung und Differenzierung von Milchsäurebakterien…… 40

2.2.1 Phänotypische Methoden…… 41
2.2.2 Genotypische Methoden…… 43
2.2.2.1 Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR…… 47
2.2.2.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)…… 48

3 Material und Methoden…… 57

3.1 Verwendete Bakterienstämme…… 57

3.1.1 Typstämme…… 57
3.1.2 *Lactobacillus*-Isolate…… 57

3.2 Zellmassenanzucht und –ernte …… 59

3.2.1 Geräte und Hilfsmittel…… 60
3.2.2 Reagenzien und Lösungen…… 60
3.2.3 Waschen der Zellen…… 61
3.2.4 Portionierung der Zellmasse…… 61

3.3 DNA-Isolierung…… 62

3.3.1 Allgemeines…… 62
3.3.2 Geräte und Hilfsmittel…… 65
3.3.3 Reagenzien und Lösungen…… 65
3.3.4 Durchführung…… 66

3.4 Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR…… 68

3.4.1 Allgemeines…… 68
3.4.2 Geräte und Hilfsmittel…… 69
3.4.3 Reagenzien und Lösungen…… 69
3.4.4 Durchführung…… 73

3.5 Agarosegel-Elektrophorese…… 74

3.5.1 Allgemeines…… 74
3.5.2 Geräte und Hilfsmittel…… 76
3.5.3 Reagenzien und Lösungen…… 77
3.5.4 Durchführung…… 80

3.6 Färben, Entfärben und Fotografieren der Agarosegele…… 82

3.6.1 Allgemeines…… 82
3.6.2 Geräte und Hilfsmittel…… 83
3.6.3 Reagenzien und Lösungen…… 84
3.6.4 Durchführung…… 84

3.7 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)…… 85

3.7.1 Allgemeines…… 85
3.7.2 Probenvorbereitung…… 86
3.7.2.1 Geräte und Hilfsmittel…… 86
3.7.2.2 Reagenzien und Lösungen…… 87
3.7.2.3 Durchführung…… 91
3.7.3 Gelvorbereitung…… 94
3.7.3.1 Geräte und Hilfsmittel…… 94
3.7.3.2 Reagenzien und Lösungen…… 95
3.7.3.3 Durchführung…… 96
3.7.4 Elektrophorese…… 98
3.7.4.1 Geräte und Hilfsmittel…… 98
3.7.4.2 Lösungen…… 98
3.7.4.3 Durchführung…… 99
3.7.5 Färben, Entfärben und Fotografieren…… 100

4 Ergebnisse und Diskussion…… 101

4.1 RAPD-PCR…… 101

4.1.1 *Lactobacillus buchneri* – Versuchsreihe $1^{(N)}$…… 101
4.1.2 *Lactobacillus buchneri* – Vergleich der Versuchsreihe $1^{(N)}$ mit Versuchsreihe $1^{(A)}$… 109
4.1.3 *Lactobacillus sakei* – Versuchsreihe 2…… 114
4.1.4 *Lactobacillus buchneri* – Versuchsreihe 3…… 117

4.2 PFGE..... .125

4.2.1 Vorversuch..... 126
4.2.2 *Lactobacillus buchneri* – Vergleich der Versuchsreihe $1^{(N)}$ mit Versuchsreihe $1^{(A)}$... 127
4.2.3 *Lactobacillus buchneri* – Versuchsreihe 3..... 130

5 Schlussbetrachtung..... 139

5.1 RAPD-PCR..... 139

5.2 PFGE..... 142

6 Zusammenfassung..... 145

7 Abstract..... 147

8 Literaturverzeichnis..... 149

8.1 Normen, Rechtsvorschriften, Standards..... 166

9 Anhang..... 169

9.1 RAPD-PCR..... 169

9.1.1 *Lactobacillus buchneri* – Versuchsreihe $1^{(N)}$..... 169
9.1.2 *Lactobacillus buchneri* – Vergleich der Versuchsreihe $1^{(N)}$ mit Versuchsreihe $1^{(A)}$... 177
9.1.3 *Lactobacillus sakei* – Versuchsreihe 2..... 182
9.1.4 *Lactobacillus buchneri* – Versuchsreihe 3..... 182

9.2 PFGE..... 186

9.2.1 *Lactobacillus buchneri* – Vergleich der Versuchsreihe $1^{(N)}$ mit Versuchsreihe $1^{(A)}$... 186
9.2.2 *Lactobacillus buchneri* – Versuchsreihe 3..... 187

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1.1-1 Homofermentative Milchsäuregärung……..4
Abb. 2.1.1-2 Heterofermentative Milchsäuregärung…….. 4
Abb. 2.1.2-1 Phylogenetische Verwandschaftsbeziehungen von Milchsäurebakterien……5
Abb. 2.1.3.5-1 Phylogenetische Verwandschaftsbeziehungen der Lactobazillen aus Sauerteigen……15
Abb. 2.1.3.5-2 Argininmetabolismus von *Lactobacillus pontis* und *Lb. reuteri*……..16
Abb. 2.1.4-1 Vorherrschende Bakterien des Darmes……21
Abb. 2.2.2-1 Der erste Zyklus einer PCR……..45
Abb. 2.2.2-2 Temperatur/Zeit-Profil der zwei- bzw. dreistufigen PCR…….. 46
Abb. 2.2.2.2-1 Schemadiagramm der PFGE……49
Abb. 2.2.2.2-2 Schemadiagramm der OFAGE……..50
Abb. 2.2.2.2-3 Prinzip der Feldinversionsgelelektrophorese (FIGE)…… 50
Abb. 2.2.2.2-4 Schemadiagramm der Transverse Alternating Field Electrophoresis (TAFE)…….. 51
Abb. 2.2.2.2-5 Schemadiagramm der ST/RIDE……..52
Abb. 2.2.2.2-6 Schemadiagramm der Rotating Gel Electrophoresis (RGE)…….. 52
Abb. 2.2.2.2-7 Schaltungsanordnung eines CHEF Spannungsteilers…….. 53
Abb. 2.2.2.2-8 Zweifach inhomogene Felder bei rechtwinklig angeordneten Punkt-Elektroden…….. 53
Abb. 2.2.2.2-9 Homogene Feldlinien bei zwei unterschiedlich angelegten Feldern unter Verwendung hexagonal angeordneter Punkt-Elektroden…….. 54
Abb. 2.2.2.2-10 Prinzip der CHEF-Elektrophorese…….. 54
Abb. 3.6.1-1 Ethidiumbromid (EtBr)……82
Abb. 3.6.1-2 DNA-Doppelhelix vor und nach der Interkalation von EtBr-Molekülen……..82
Abb. 3.7.3.3-1 Gelgießvorgang……97
Abb. 3.7.3.3-2 Polymerisationsanordnung des Gels……97
Abb. 3.7.4.3-1 Elektrophorese-Einheit mit eingesetzter Gelträgerplatte und aufgesetzter, hexagonaler Elektrode…….. 99
Abb. 4.1.1-1 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 33 und 53……102
Abb. 4.1.1-2 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 7 und 9……102
Abb. 4.1.1-3 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 39 und 40……103
Abb. 4.1.1-4 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 50 und 26……103
Abb. 4.1.1-5 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 57 und 13……104
Abb. 4.1.1-6 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 28 und 42……104
Abb. 4.1.1-7 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 25 und 37……106
Abb. 4.1.1-8 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 15 und 24……106
Abb. 4.1.1-9 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 47 und 49……107
Abb. 4.1.1-10 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 8 und 23……107
Abb. 4.1.1-11 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 29 und 30……..108
Abb. 4.1.1-12 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 44 und 45……..108
Abb. 4.1.2-1 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 3……..110
Abb. 4.1.2-2 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 28……110
Abb. 4.1.2-3 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 55……111
Abb. 4.1.2-4 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 34……111
Abb. 4.1.2-5 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 57……112
Abb. 4.1.2-6 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 31……112
Abb. 4.1.3-1 RAPD-PCR von *Lb. sakei*-Isolaten und Typstamm mit den Primern 1, 6 und 8……114
Abb. 4.1.3-2 RAPD-PCR von *Lb. sakei*-Isolaten und Typstamm mit den Primern 7, 23 und 42……115
Abb. 4.1.3-3 RAPD-PCR von *Lb. sakei*-Isolaten und Typstamm mit den Primern 12, 24 und 17……..116
Abb. 4.1.3-4 RAPD-PCR von *Lb. sakei*-Isolaten und Typstamm mit den Primern 13, 4 und 10……117
Abb. 4.1.4-1 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 33……118
Abb. 4.1.4-2 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 50……118
Abb. 4.1.4-3 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 26……118
Abb. 4.1.4-4 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 28……119
Abb. 4.1.4-5 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 42……119
Abb. 4.1.4-6 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 1……..120
Abb. 4.1.4-7 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 2……..121
Abb. 4.1.4-8 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 3……..121
Abb. 4.1.4-9 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 4……..121

Abb. 4.1.4-10 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 5……122
Abb. 4.1.4-11 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 6……122
Abb. 4.1.4-12 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 10……122
Abb. 4.1.4-13 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 11……123
Abb. 4.1.4-14 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 13……123
Abb. 4.1.4-15 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 15……123
Abb. 4.1.4-16 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 16……124
Abb. 4.1.4-17 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 36……124
Abb. 4.2.1-1 PFGE von *Lb. buchneri*-Stämmen nach Restriktion mit *Sfi* I……126
Abb. 4.2.2-1 PFGE von *Lb. buchneri*-Stämmen nach Restriktion mit *Sfi* I……128
Abb. 4.2.2-2 PFGE von *Lb. buchneri*-Stämmen nach Restriktion mit *Sal* I……129
Abb. 4.2.2-3 PFGE von *Lb. buchneri*-Stämmen nach Restriktion mit *Sac* II……129
Abb. 4.2.3-1a PFGE von *Lb. buchneri* LAC 905-Isolaten nach Restriktion mit *Sfi* I……131
Abb. 4.2.3-1b PFGE von *Lb. buchneri* LAC 905-Isolaten nach Restriktion mit *Sfi* I……131
Abb. 4.2.3-2a PFGE von *Lb. buchneri* LAC 905-Isolaten nach Restriktion mit *Not* I……132
Abb. 4.2.3-2b PFGE von *Lb. buchneri* LAC 905-Isolaten nach Restriktion mit *Not* I……133
Abb. 4.2.3-3 PFGE von *Lb. buchneri* LAC 905-Isolaten nach Restriktion mit *Sac* II……133
Abb. 4.2.3-4 PFGE von *Lb. buchneri* LAC 905-Isolaten nach Restriktion mit *Sac* II……134
Abb. 4.2.3-5 PFGE von *Lb. buchneri* LAC 905-Isolaten nach Restriktion mit *Sal* I……135
Abb. 4.2.3-6 PFGE von *Lb. buchneri* LAC 905-Isolaten nach Restriktion mit *Sal* I……136
Abb. 4.2.3-7 PFGE von *Lb. buchneri* LAC 905-Isolaten nach Restriktion mit *Apa* I……137
Abb. 4.2.3-8 PFGE von *Lb. buchneri* LAC 905-Isolaten nach Restriktion mit *Apa* I…… 138
Abb. 9.1.1-1 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 1 und 2……169
Abb. 9.1.1-2 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 3 und 4……170
Abb. 9.1.1-3 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 5 und 6……170
Abb. 9.1.1-4 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 11 und 10……171
Abb. 9.1.1-5 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 14 und 12…… 171
Abb. 9.1.1-6 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 16 und 17……172
Abb. 9.1.1-7 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 18 und 19……172
Abb. 9.1.1-8 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 20 und 21……173
Abb. 9.1.1-9 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 27 und 22……173
Abb. 9.1.1-10 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 32 und 31……174
Abb. 9.1.1-11 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 35 und 36……174
Abb. 9.1.1-12 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 34 und 38……175
Abb. 9.1.1-13 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 41 und 46……175
Abb. 9.1.1-14 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 48 und 51……176
Abb. 9.1.1-15 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 56 und 54……176
Abb. 9.1.1-16 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 55……177
Abb. 9.1.2-1 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 16……178
Abb. 9.1.2-2 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 17……178
Abb. 9.1.2-3 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 21……179
Abb. 9.1.2-4 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 22……179
Abb. 9.1.2-5 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 29……180
Abb. 9.1.2-6 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 56……180
Abb. 9.1.2-7 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 37……181
Abb. 9.1.2-8 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 31
nach erneuter DNA-Isolierung……181
Abb. 9.1.3-1 Wiederholung der RAPD-PCR von *Lb. sakei*-Isolaten und Typstamm mit den Primern 13, 4, 1……182
Abb. 9.1.4-1 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 7……182
Abb. 9.1.4-2 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 9……183
Abb. 9.1.4-3 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 14……183
Abb. 9.1.4-4 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 24……183
Abb. 9.1.4-5 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 37……184
Abb. 9.1.4-6 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 39……184
Abb. 9.1.4-7 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 40……184
Abb. 9.1.4-8 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 47……185
Abb. 9.1.4-9 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 49……185
Abb. 9.1.4-10 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 53……185
Abb. 9.1.4-11 RAPD-PCR von *Lb. buchneri*-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 57……186
Abb. 9.2.1-1 PFGE von *Lb. buchneri*-Stämmen nach Restriktion mit *Xba* I……186
Abb. 9.2.2-1a PFGE von *Lb. buchneri* LAC 905-Isolaten nach Restriktion mit *Sfi* I……187
Abb. 9.2.2-1b PFGE von *Lb. buchneri* LAC 905-Isolaten nach Restriktion mit *Sfi* I……187
Abb. 9.2.2-2 PFGE von *Lb. buchneri* LAC 905-Isolaten nach Restriktion mit *Sac* II……188
Abb. 9.2.2-3 PFGE von *Lb. buchneri* LAC 905-Isolaten nach Restriktion mit *Apa* I……188
Abb. 9.2.2-4 PFGE von *Lb. buchneri* LAC 905-Isolaten nach Restriktion mit *Apa* I……189

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1 Die wichtigsten Gattungen der Milchsäurebakterien und ihre Unterscheidungsmerkmale.....6
Tab. 2-2 Systematik technologisch relevanter Milchsäurebakterien (Auswahl).....7
Tab. 2-3 Von Natur aus auf Pflanzenmaterial vorkommende Milchsäurebakterien.....12
Tab. 2-4 Mikrobielle Rohwurstfehler.....13
Tab. 2-5 Mikroorganismen, die in probiotischen Produkten Verwendung finden..... 20
Tab. 2-6 Erwünschte Kriterien bei der Auswahl probiotischer Stämme.....23
Tab. 2-7 Zusammenfassung positiver Effekte von Milchsäurebakterien in Verbindung mit den vermutlich zugrundeliegenden Wirkungsmechanismen.....30
Tab. 2-8 Präbiotische Verbindungen, welche die intestinale Darmmikrobiota beeinflussen..... 33
Tab. 2-9 Allgemein übliche Laufparameter (PFGE) 56
Tab. 3-1 Zusammenstellung der verwendeten Typstämme 57
Tab. 3-2 Zusammenstellung der zu prüfenden *Lactobacillus*-Isolate.....58
Tab. 3-3 Geräte und Hilfsmittel zum Waschen und Portionieren der Zellmasse.....60
Tab. 3-4 Reagenzien zum Waschen und Portionieren der Zellmasse.....60
Tab. 3-5 Geräte und Hilfsmittel zur DNA-Isolierung.....65
Tab. 3-6 Reagenzien und Lösungen zur DNA-Isolierung..... 65
Tab. 3-7 Geräte und Hilfsmittel für die RAPD-PCR..... 69
Tab. 3-8 Reagenzien für die RAPD-PCR..... 70
Tab. 3-9 Auflistung der verwendeten RAPD-Primer.....71
Tab. 3-10 Pipettierschema des Amplifikationsansatzes für die RAPD-PCR.....73
Tab. 3-11 Temperaturprogramm der RAPD-PCR.....74
Tab. 3-12 Größentrennung von DNA-Fragmenten bei verschiedenen Agarosekonzentrationen..... 75
Tab. 3-13 Geräte und Hilfsmittel für die Agarosegel-Elektrophorese 76
Tab. 3-14 Reagenzien für die Agarosegel-Elektrophorese 77
Tab. 3-15 Daten zur Anfertigung der Agarosegel-Lösung für die Elektrophoreseapparatur HE 100.....80
Tab. 3-16 Auftragevolumina von Probe bzw. Marker in Abhängigkeit der Kammdimension.....81
Tab. 3-17 Geräte und Hilfsmittel zum Färben, Entfärben und Fotografieren der Agarosegele.....83
Tab. 3-18 Reagenzien zum Färben der Agarosegele.....84
Tab. 3-19 Geräte und Hilfsmittel zur Probenvorbereitung der PFGE..... 86
Tab. 3-20 Reagenzien zur Probenvorbereitung der PFGE..... 87
Tab. 3-21 Spezifikationen der verwendeten Restriktionsenzyme der PFGE..... 91
Tab. 3-22 Geräte und Hilfsmittel zur Gelvorbereitung der PFGE.....94
Tab. 3-23 Reagenzien zur Gelvorbereitung der PFGE..... 95
Tab. 3-24 Geräte und Hilfsmittel für die PFGE.....98

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Md, USA
biovar.	Biovarietät
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CHEF	Contour-Clamped Homogeneous Electric Field
cm	Zentimeter
dest.	Destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FAO	Food and Agriculture Organization
FIGE	Field Inversion Gel Electrophoresis
FQ	Fermentationsquotient
G	Guanin
g	Gramm
GRAS	Generally Recognized as Safe
h	Stunden
HDL	High Density Lipoprotein
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
kb	Kilobasen
KbE	Koloniebildende Einheit
konz.	konzentriert
l	Liter
Lb.	*Lactobacillus*
LDL	Low Density Lipoprotein
$\log_{10}$	dekadischer Logarithmus
Lsg.	Lösung
mA	Milliampere
max.	maximal
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRS-Bouillon	von deMan, Rogosa und Sharpe entwickeltes Kulturmedium (Bouillon) für das Wachstum von Lactobacillen
MSB	Milchsäurebakterien
NaCl	Natriumchlorid

nm	Nanometer
OFAGE	Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis
ONC	One Night Culture
p.a.	“pro analysi” (lat. „für die Analyse“, Chemikalie mit hoher Reinheitsstufe)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
pg	Pikogramm
physiol.	physiologische (NaCl-Lösung; 0,9%)
probiot.	Probiotisch
Pro	Prolin
Ps	*Pseudomonas*
RAPD-PCR	Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR
rd.	rund, ungefähr
RGE	Rotating Gel Electrophoresis
rpm	revolutions per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S.	*Saccharomyces*
SDS	Sodium Dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
sec.	Sekunde(n)
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
sog.	sogenannt
spp.	species pluralis; Mehrere, nicht im Einzelnen zu nennende Spezies einer Gattung
ST/RIDE	Simultaneous Tangential/Rectangular Inversion Decussate Electrophoresis
STIFF	Safe Tradition in Food Fermentations
subsp.	Subspezies
^{T}	Typstamm einer Spezies
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAFE	Transverse Alternating Field Electrophoresis
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Th	T-Helfer-Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	elektrophoretische Mobilität
UHQ-Wasser	“Ultra High Quality”-Wasser, Reinstwasser
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Val	Valin
var.	lat. varietas, Varietät
W	Watt
w/v	Masse/Volumen
WHO	World Health Organization
ZM	Zellmasse

1. Einleitung und Fragestellung

Die Gattung *Lactobacillus* repräsentiert innerhalb der Milchsäurebakterien den größten Anteil. Laktobazillen sind in der Umwelt ubiquitär verbreitet; so sind sie etwa als meist harmlose Kommensalen der physiologischen Flora von Darm, Haut und Schleimhäuten bei Mensch und Tier anzutreffen, aber auch mazeriertes pflanzliches Material zählt zu dem natürlichen Habitat dieser überaus heterogenen Mikroorganismengruppe [KNEIFEL und DOMIG, 2009; HEIDER, 2007]. Das Anwendungsspektrum des Genus *Lactobacillus* widerspiegelt die Artenvielfalt, und gestaltet sich ebenso facettenreich wie diese. Laktobazillen werden beispielsweise verwendet

- für die Konservierung einer Vielzahl verderblicher Lebensmittel, wobei gleichzeitig auch wichtige Säure- und Geschmacksstoffe gebildet werden,
- zur Konservierung von Viehfutter (Silage) mittels Milchsäuregärung,
- als Probiotika in Lebens- und Futtermitteln zur Förderung der Gesundheit,
- in der Pharmazie als probiotische Medikation (siehe *Kapitel 2.1.3* und *2.1.4*).

Da sowohl die gesundheitsrelevanten/probiotischen Wirkungen der unterschiedlichen Milchsäurebakterien stammspezifisch stark variieren, und auch, um eine Qualitätskontrolle zugelassener Stämme und die Vermeidung gesundheitlicher Risiken zu gewährleisten, sowie zur Ermöglichung einer präzisen Beschreibung neuer Stämme, ist die zuverlässige, exakte Identifizierung dieser Mikroorganismen auf Stammebene von erheblicher Bedeutung.

Während die Klassifizierung der Milchsäurebakterien ursprünglich vorwiegend anhand ihrer phänotypischen Eigenschaften erfolgte, stellen genotypische Methoden in der modernen Taxonomie einen integralen Bestandteil dar, wobei im Sinne des sogenannten Mehrphasenansatzes die Resultate mehrerer Methoden mit unterschiedlicher Aussagekraft und Differenzierungsvermögen kombiniert werden [KNEIFEL und DOMIG, 2009; MOHANIA et al., 2008; PRAKASH et al., 2007].

Bei der vorliegenden Diplomarbeit sollen Stämme der Spezies *Lactobacillus buchneri* und *Lactobacillus sakei* auf Stammebene differenziert und identifiziert werden. Als molekularbiologische Untersuchungsmethoden zur Identifizierung und Differenzierung der *Lactobacillus*-Isolate mittels charakteristischem DNA-Fingerprintmuster finden die

- Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR, sowie die
- Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) Anwendung.

Im Zuge dieser Diplomarbeit sollen folgende Aufgaben abgearbeitet werden:

- Differenzierung und Identifizierung von sechs *Lb. buchneri*-Stämmen unter Zuhilfenahme von zwei Typstämmen mittels RAPD-PCR

- Nachweis eventuell vorhandener Differenzen der jeweils gleich benannten Isolate zweier Versuchsreihen mit insgesamt elf *Lb. buchneri*-Stämmen unter Anwendung der RAPD-PCR und PFGE

- Unterscheidung von fünf *Lb. sakei*-Stämmen unter Verwendung eines Typstammes mittels RAPD-PCR

- Differenzierung und Identifizierung von 21 *Lb. buchneri*-Isolaten mit Hilfe eines Typstammes und zwei Referenzstämmen mittels RAPD-PCR und PFGE

2. Literaturüberblick

2.1 Milchsäurebakterien

2.1.1 Allgemeines

Zur Ordnung der *Lactobacillales* (Milchsäurebakterien, MSB) zählen Gram-positive Stäbchen und Kokken, die sich somit in ihrer Morphologie unterscheiden, gemeinsam jedoch die physiologische Eigenschaft der chemo-organotrophen Stoffumsetzung fermentierbarer Kohlenhydrate zu Milchsäure aufweisen. Diese aerotoleranten Anaerobier sind Katalase-negativ, nicht sporenbildend und zumeist unbeweglich. Da sich die Mikroorganismen speziell an ein Wachstum in Milch und ähnlich nährstoffreiche Medien adaptiert haben, verfügen sie über keine – für Atmungsprozesse notwendige – Fähigkeit zur Porphyrin- und Cytochrom-Synthese, und besitzen komplexe Nährstoffanforderungen an ihre Habitate (die Vitamine, Aminosäuren, Purine und Pyrimidine einschließen); die hohen Ansprüche an Vitamine sind sogar noch ausgeprägter, als die von Menschen. Aufgrund der eingeschränkten Befähigung zur Biosynthese müssen die Vertreter dieser Bakteriengruppe ihren kompletten Energiebedarf durch Substratkettenphosphorylierung decken.
Die Einteilung der strikt fermentativen Milchsäurebakterien erfolgt in zwei Untergruppen:

- **Homofermentative Bakterien**, welche Zucker über den Fructose-bisphosphat-Weg der Glykolyse zu mehr als 85% zum Gärungsendprodukt Milchsäure abbauen (*Abbildung 2.1.1-1*), und
- **Heterofermentative Bakterien**, denen das Schlüsselenzym der Glykolyse – die Aldolase – fehlt. Als Endprodukte des Glucoseabbaus über den Pentosephosphat-Weg entstehen bei dieser Bakteriengruppe daher neben etwa 50% Milchsäure auch Ethanol und CO_2. Beim Abbau von Pentosen (Phosphoketolaseweg) produzieren die Bakterien neben Milchsäure Essigsäure (siehe *Abbildung 2.1.1-2*).

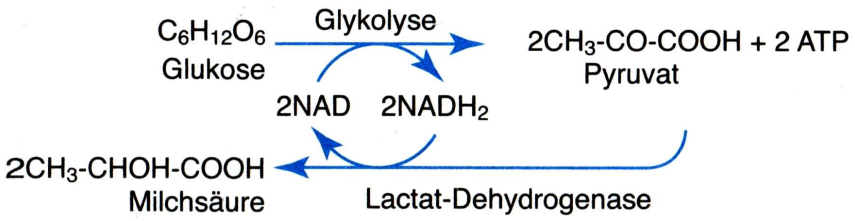


Abb. 2.1.1-1 Homofermentative Milchsäuregärung.
[QUELLE: KRÄMER, 2007]

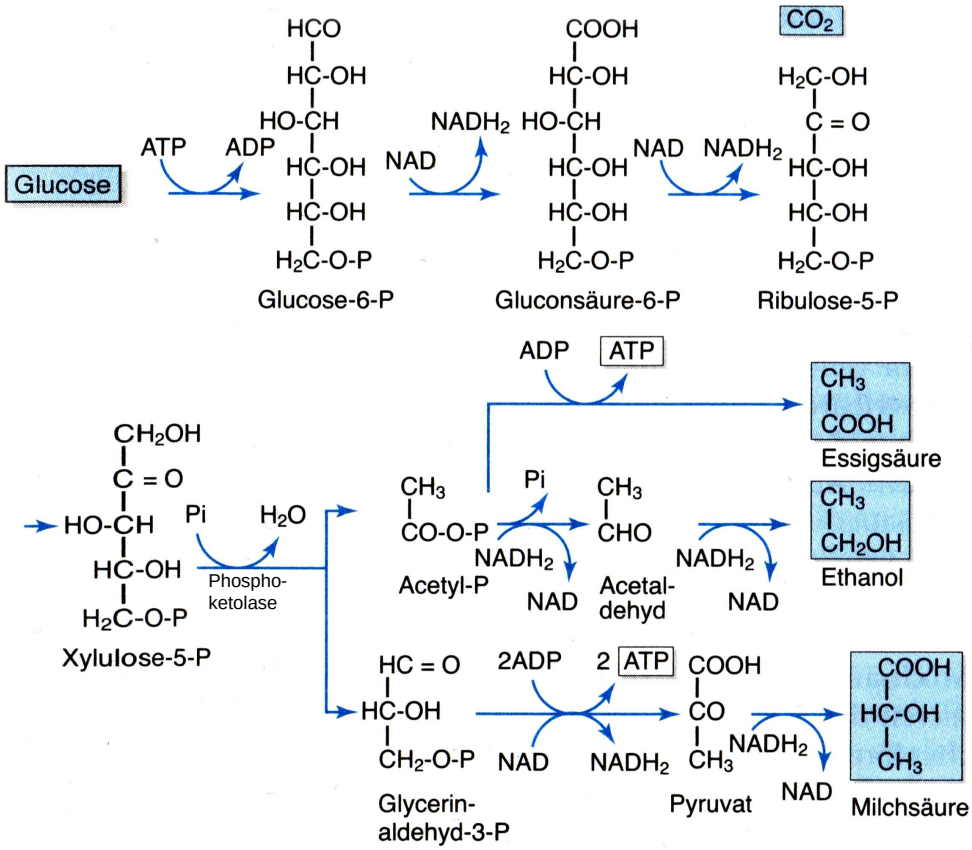


Abb. 2.1.1-2 Heterofermentative Milchsäuregärung.
[QUELLE: KRÄMER, 2007]

Die Bakterien-Art *Bifidobacterium bifidum* besitzt ebenfalls, wie schon die heterofermentativen Bakterien, keine Aldolase, und erzeugt aus 2 Mol Glucose über den (spezifischen) Abbauweg der *Bifidobacterium*-Gärung 2 Mol Milchsäure und 3 Mol Essigsäure [KNEIFEL und DOMIG, 2009; KRÄMER, 2007; MADIGAN et al., 2003; HAMMES und VOGEL, 2007].

2.1.2 Systematik der Milchsäurebakterien

Durch Klassifizierung, Identifizierung und eine entsprechende Nomenklatur dient die Taxonomie bzw. Systematik der wissenschaftlichen Kategorisierung der Biodiversität von Individuen. Wurde die Klassifizierung der Milchsäurebakterien ursprünglich auf phänotypischen Merkmalen aufgebaut, so bedingt die analytische Weiterentwicklung eine ständige Adaption und Verbesserung der Bakterientaxonomie.

Gegenwärtig werden die Prokaryonten in zwei Domänen (*Archae* und *Bacteria*) eingeteilt, welche wiederum in Abteilungen, und diese jeweils absteigend hierarchisch in Klasse, (eventuell Unterklasse), Ordnung, (Unterordnung), Familie, Gattung, Art und eventuell Unterart gegliedert sind. Mit dem phylophänetischen Konzept liegt die zur Zeit nützlichste und am meisten anerkannte Definition vor, in welcher die Art als Basiseinheit der Klassifizierung *„einen monophyletisch und genomisch zusammenhängenden Cluster von individuellen Organismen darstellt, die einen hohen Grad an Ähnlichkeit aufweisen, wobei unabhängige Eigenschaften berücksichtigt werden“* [KNEIFEL und DOMIG, 2009].

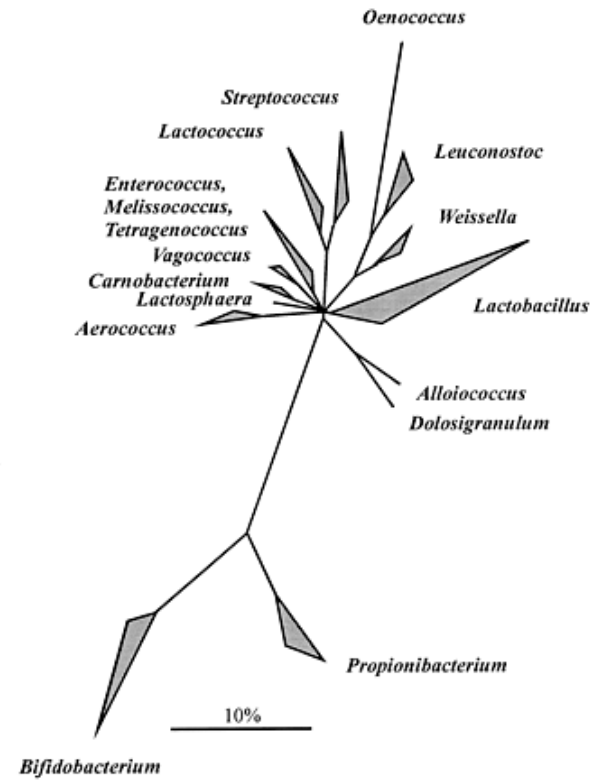


Abb. 2.1.2-1 Phylogenetische Verwandschaftsbeziehungen basierend auf der vergleichenden Sequenzanalyse der 16S rRNA von Milchsäurebakterien. Es sind die wesentlichsten Genera der Milchsäurebakterien, sowie die Gattungen *Bifidobacterium* und *Propioni-bacterium* angeführt [QUELLE: HOLZAPFEL et al., 2001].

Abbildung 2.1.2-1 zeigt den phylogenetischen Stammbaum, der – basierend auf der vergleichenden Sequenzanalyse der 16S ribosomal RNA von MSB – die wichtigsten phylogenetischen Gruppen der Milchsäurebakterien mit niedrigem mol % G+C-Gehalt der DNA, und die nicht verwandten grampositiven Genera *Bifido-bacterium* und *Propionibacterium*, darstellt [HOLZAPFEL et al., 2001].

Tab. 2-1 stellt verschiedene Genera der Milchsäurebakterien, die auf Basis ihrer DNA-Zusammensetzung, der Zellmorphologie und der Art ihrer Fermentation definiert wurden, dar. Während Vertreter der Gattungen *Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Enterococcus* und *Lactococcus* ziemlich ähnliche DNA-Basenzusammenstellungen aufweisen, bilden die Vertreter der Gattung *Lactobacillus* aufgrund ihrer überaus unterschiedlichen DNA-Basenzusammenstellung eine heterogene Gruppe [MADIGAN et al., 2003].

Tab. 2-1 Die wichtigsten Gattungen der Milchsäurebakterien[1)] und ihre Unterscheidungsmerkmale.
1) Phylogenetisch sind alle Mikroorganismen Mitglieder der grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt

Gattung	Zellform und -anordnung	Gärungstyp	DNA [mol % GC]
Streptococcus	Kokken in Ketten	homofermentativ	34 – 46
Leuconostoc	Kokken in Ketten	heterofermentativ	38 – 41
Pediococcus	Kokken in Tetraeden	homofermentativ	34 – 42
Lactobacillus	1) Stäbchen, meistens in Ketten	homofermentativ	32 – 53
	2) Stäbchen, meistens in Ketten	heterofermentativ	34 – 53
Enterococcus	Kokken in Ketten	homofermentativ	38 – 40
Lactococcus	Kokken in Ketten	homofermentativ	38 – 41

[QUELLE: MADIGAN et al., 2003]

Die Gattung *Bifidobakterium* teilt zwar mit den typischen Milchsäurebakterien einige phänotypische Charakterzüge, ist aber phylogenetisch nicht mit ihnen verwandt, und weist einen eigenen Modus der Zuckerfermentation auf (siehe dazu auch *Kapitel 2.1.1*) [HOLZAPFEL et al., 2001; SALMINEN et al. 2004; FELIS und DELLAGLIO, 2007].

Die phylogenetisch eigenständige Gattung *Bifidobakterium* weist zudem einen relativ hohen (55 – 67 mol %) G+C-Gehalt der DNA auf, und bildet einen Teil des sogenannten ***Actinobacteria***-Zweigs (früher auch als *Actinomycetes* bezeichnet, da vor allem junge Kulturen zur Ausbildung einer myzelialen Morpho-

logie neigen), zu dem auch die Genera *Arthrobacter, Micrococcus, Propionibacterium, Microbacterium, Corynebacterium, Actinomyces* und *Streptomyces* zählen. Die „eigentlichen" Milchsäurebakterien gehören dem sogenannten ***Clostridium***- Zweig, bzw. der Abteilung der ***Firmicutes*** an, welche durch einen DNA-G+C-Gehalt von unter 55 mol % gekennzeichnet ist (siehe *Tabelle 2-1*) [HOLZAPFEL et al., 2001; SALMINEN et al. 2004, KNEIFEL und DOMIG, 2009].

Tab. 2-2 Systematik technologisch relevanter Milchsäurebakterien (Auswahl)

Klasse	Ordnung	Familie	Genus
Bacilli	*Lactobacillales*	*Carnobacteriaceae*	*Carnobacterium*
		Enterococcaceae	*Enterococcus*
			Tetragenococcus
			Vagococcus
		Lactobacteriaceae	*Lactobacillus*
			Paralactobacillus
			Pediococcus
		Leuconostocaceae	*Leuconostoc*
			Oenococcus
			Weissella
		Streptococcaceae	*Lactococcus*
			Streptococcus
	Bacillales	*Sporolactobacteriaceae*	*Sporolactobacillus*
Actinobacteria	*Bifidobacteriales*	*Bifidobacteriaceae*	*Bifidobacterium*

[QUELLE: KRÄMER, 2007]

Tab. 2-2 zeigt eine Zusammenstellung technologisch essentieller Milchsäurebakterien. Während die umfangreiche Ordnung der aerotoleranten *Lactobacillales* zur Klasse der Bacilli gerechnet werden, zählt die streng anaerobe Gattung *Bifidobacterium* zur Klasse der *Actinobacteria* [KRÄMER, 2007].

Da im Rahmen dieser Diplomarbeit verschiedene Stämme des Genus *Lactobacillus* differenziert und identifiziert wurden, soll im Folgenden genauer auf diese Gattung eingegangen werden.

2.1.2.1 Die Gattung Lactobacillus

Lactobazillen sind grampositive, nicht sporulierende, unbewegliche aerotolerante Anaerobier, die meist stäbchenförmig sind, und eine Tendenz zur Kettenbildung besitzen. Sie sind Katalase- und Oxidase-negativ, und ihre Säureresistenz ermöglicht ihnen ein Wachstum bei pH-Werten (pH 4), bei denen andere Milchsäurebakterien bereits nicht mehr zu wachsen imstande sind, weshalb sie auch für das Endstadium der Milchsäuregärung eingesetzt werden [MADIGAN et al., 2003]. Neben der Fähigkeit zur Produktion von Milchsäure, Aromakomponenten, Bacteriocinen, Exopolysacchariden und verschiedenen Enzymen, können heterofermentative Lactobazillen außerdem Produkte wie Ethanol und Essigsäure erzeugen. Auf diese Weise erhöhen sie die Haltbarkeit und mikrobielle Sicherheit der Lebensmittel, verbessern deren Textur, und leisten damit einen Beitrag zum angenehmen sensorischen Profil des Endprodukts [FOROUHANDEH, 2010; KORAKLI et al., 2005].

Nach Felis und Dellaglio (2007) repräsentiert die Gattung *Lactobacillus* mit über 100 Arten den größten Teil der Milchsäurebakterien. Typische Lebensräume der Laktobazillen verfügen über niedrigen Sauerstoffpartialdruck, lösliche Kohlenhydrate, Proteinabbauprodukte und Vitamine. Pflanzen, Abwasser, bestimmte Lebensmittel (siehe *Kapitel 2.1.3*) – und Darm, Haut und Schleimhäute bei Mensch und Tier – stellen daher ihre bevorzugten Habitate dar [KNEIFEL und DOMIG, 2009].

Die Gattung der Laktobazillen wurde erstmals im Jahr 1901 von Beijerinck beschrieben und zuerst anhand phenotypischer Eigenschaften in Gruppen eingeteilt: Die Einordnung von Orla-Jensen (1909) erfolgte nach Kriterien wie optimaler Wachstumstemperatur und Fermentation von Hexosen; KANDLER und WEISS trafen 1986 eine Gruppierung nach der Art der Fermentation (obligativ/fakultativ, homo-/heterofermentativ). Mit Entwicklung molekularer Techniken und der damit verbundenen genetischen Charakterisierung erfolgte eine erneute Ordnung, und – basierend auf Daten der 16S rRNA – Identifizierung neuer Gruppen [COLLINS et al., 1991]. Zunehmender Einsatz der „Polyphasic Taxonomy“ führte zur Verschiebung innerhalb des Genus

Lactobacillus und/oder zwischen Genera, zur Reklassifizierung von Stämmen, sowie vielen neueingeführten Arten. Die kontinuierliche Umstrukturierung des Genus wird von der immer länger werdenden, sich ständig verändernden Liste, veranschaulicht: Während im Jahr 1984 noch 44 *Lactobacillus*-Arten und 11 Unterarten beschrieben wurden [KANDLER und WEISS, 1986] sind es heute schon 145 Arten und 27 Unterarten [KNEIFEL und DOMIG, 2009]. Die Gattung *Lactobacillus* ist – wie anhand des von 33 bis 55 mol% stark variierenden G+C-Gehaltes der unterschiedlichen Arten ersichtlich – eine sehr heterogene Gruppe. Mit der modernen Technik der Genomsequenzierung wird man das System der Klassifizierung, sowie taxonomische Beziehungen problematischer Bakteriengruppen, wie den Laktobazillen, voraussichtlich aufklären [BERNARDEAU et al., 2008; HAMMES und HERTEL, 2006].

2.1.3 Vorkommen und Relevanz der Milchsäurebakterien

Habitate der Milchsäurebakterien sind durch ein reichliches Substratangebot bei gleichzeitigem Sauerstoffmangel gekennzeichnet, was sich infolge ihrer hohen Nährstoffanforderungen und der Energiegewinnung mittels Gärung erklären lässt. MSB säuern das Medium, in dem sie den Zucker vergären, rasch an (pK_a der Milchsäure = 3,7), und setzen sich aufgrund ihrer Säuretoleranz binnen kurzer Zeit gegenüber anderen schädlichen, um Zucker konkurrierenden Bakterien durch, und verhindern damit deren Wachstum.
Diesen Effekt macht sich die Konservierung verderblicher Lebensmittel zunutze, um das Wachstum vieler anaerober Bakterien zu hemmen; gleichzeitig bilden MSB die für eine große Menge an Lebensmitteln wichtigen Säure- und Geschmacksstoffe [HEIDER, 2007].

2.1.3.1 Besiedelung des Menschen

Milchsäurebakterien gelten bei Mensch und Tier als natürliches, bakterielles „Schutzschild“ – sie (*Lactobacillus acidophilum*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *S. bovis*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*) sind Kommensalen der physiologischen Flora von Darm, Haut und Schleimhäuten, und verhindern so eine Besiedlung bzw. abnorme Zunahme anderer, möglicher-

weise pathogener Mikroorganismen durch eine Ansäuerung aufgrund ihrer Milchsäurebildung.
Allerdings gibt es unter den MSB auch einige Pathogene, wie z.B. *Streptococcus pyogenes*, der ein Auslöser von Scharlach und Rachenentzündungen ist. Weitere Beispiele sind *Streptococcus mutans* und *Streptococcus salivarius,* die – als Bestandteile des komplexen Biofilms der Zähne – bei hohem Verzehr von Saccharose Karies hervorrufen, da hier ebenfalls aus Zucker Milchsäure gebildet wird. Der Abfall des pH-Wertes im Mund führt in weiterer Folge zu einer Demineralisation der Zähne [HEIDER, 2007; KRÄMER, 2007; HAMMES und HERTEL, 2006].

2.1.3.2 Milchprodukte

Typische Starterkulturen, welche die Säuerung und Bildung des Butteraromas (Diacetyl) in Dickmilch und Sauerrahmbutter ermöglichen, sind z.B. *Lactococcus lactis* und *Leuconostoc cremoris.* Beim „klassischen" Joghurt kommen die Arten *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* und *Streptococcus thermophilus* zum Einsatz. Die typischen Kulturen der Sauermilchspezialität Kefir bestehen aus verschiedenen Spezies der Genera *Lactobacillus*, *Streptococcus* und *Leuconostoc*, welche mit Hefen kombiniert werden.
Darüber hinaus gibt es heute noch eine breite Palette anderer Sauermilcherzeugnisse, die ihren säuerlichen Charakter größtenteils Kulturen von *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* oder Bifidobakterien verdanken [HEIDER, 2007; KRÄMER 2007; HAMMES und HERTEL, 2006].

Bei der Topfen- bzw. Sauermilchkäseherstellung koaguliert das Milcheiweiß Casein infolge der Ansäuerung, die bei der Milchsäuregärung entsteht, zum festen Käsebruch, wobei die Zugabe von Labferment bei Hart- und Schnittkäsearten eine bessere Proteinfällung durch proteolytische Abspaltung eines hydrophilen Caseinfragments mit sich bringt.
Von der Käsesorte abhängig werden mesophile (20-30℃: *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc cremoris*) oder thermophile (32-45℃: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* oder *Lactobacillus helveticus*) MSB-Kulturen verwen-

det. Bei der weiteren Käsereifung kommen zusätzliche Mikroorganismen, wie beispielsweise Propionsäurebakterien (Schweizer Käse) oder Schimmelpilze (Camembert oder Roquefort) zum Einsatz, und verleihen der jeweiligen Käsesorte ihre ganz charakteristische Note [HEIDER, 2007].

Auch beim Verderb verschiedener (fermentierter) Milchprodukte sind die unterschiedlichsten Genera der MSB verantwortlich: So werden eine Reihe sogenannter „Off-Flavours“ (z.B. Malzgeschmack durch den Stamm *Lactococcus lactis biovar. maltigenes*, der 3-methylbutanal produziert, aber auch Sauer- und Fruchtgeschmack sind als Fehlgeschmack bekannt), Texturfehler (z.B. klebrige Struktur) oder Farbfehler (z.B. rosafarbene Punkte im Schweizer Käse durch Wachstum eines pigmentierten Stammes der Propionsäurebakterien) durch sie verursacht [BARTEL und MALCZAN, 2003; FRANK, 2007].

2.1.3.3 Fermentierte Gemüse

Durch die bereits anwesende Bakterienflora des geernteten Pflanzenmaterials (*Tab. 2-3*) werden Sauerkraut, Oliven und Salzgurken mittels Milchsäuregärung haltbar gemacht, wobei ein Zusatz von 2-3% NaCl die Entwicklung von Fäulnisbakterien hemmt, und die von MSB fördert. Relevant sind in der Anfangsphase vor allem Arten der Gattung *Leuconostoc*, anschließend nehmen säureresistentere *Lactobacillus*-Arten die Gärung auf [HEIDER, 2007].
Bei der Fermentation von grünen Oliven in Lake nach spanischer Art werden – wie beim Sauerkraut – vier Phasen unterschieden: In Phase 1, die zwei bis drei Tage dauert, kommt es zuerst zur Vermehrung der MSB bis der pH-Wert langsam 6 unterschreitet; Phase 2 wird von der Vermehrung der Genera *Pediococcus* und *Leuconostoc* dominiert, und dauert etwa zwei Wochen. Der für Oliven-nach-spanischer-Art typische Fermentationsvorgang beginnt allerdings erst in Phase 3, und wird von *Lactobacillen* bis zu einem pH-Wert ≤ 4 bewerkstelligt. In der vierten und letzten Phase nimmt die Milchsäurekonzentration ab, und flüchtige Säuren, sowie *Propionibacterium*, zu. Um eine übermäßige Entwicklung letztgenannter Mikroorganismen zu unterbinden, muss der Salzgehalt in den Gärbehältern auf ≥ 8 % angehoben werden [BUCKENHÜSKES, 2007].

Tab. 2-3 Von Natur aus auf Pflanzenmaterial vorkommende Milchsäurebakterien

Gattung	Spezies	Subspezies
Lactobacillus	*brevis*	
	buchneri	
	casei	
	fermentum	
	plantarum	
	curvatuis	
	sakei	
Leuconostoc	*mesenteroides*	*mesenteroides*
Pediococcus	*acidilactici*	
	pentosaceus	
Enterococcus	*faecalis*	
	faecalis var. liquefaciens	
	faecium	
Lactococcus	*lactis*	

[QUELLE: DAESCHEL et al., 1987]

2.1.3.4 Fleisch und Fleischprodukte

Sämtliche Rohwurstarten (z.B. Salami und Cervelat) erlangen ihre Haltbarkeit durch die Ansäuerung mit Milchsäure, welche durch das vergorene Glykogen im Fleisch entsteht. Außer MSB der Gattung *Lactobacillus* sind noch *Micrococcus*- und *Staphylococcus*-Arten in diesen Prozess involviert [HEIDER, 2007]. Die von Laktobazillen ausgehende Hemmwirkung auf Lebensmittelvergifter und Lebensmittelverderber ist schon seit langer Zeit bekannt: Speziell die homofermentiven Arten können, falls sie sich auf Werte $>10^8$/g Lebensmittel vermehrt haben, die unerwünschte Begleitflora von Rohwurst hemmen. Aus diesem Grund, und infolge ihrer gesundheitlichen Unbedenklichkeit, scheinen sich MSB durch die Bildung von Milchsäure und dem damit einhergehenden ph-Wert-Abfall besonders als Schutzkulturen zu eignen. Der Nachteil ist allerdings, dass die hemmende Wirkung der Schutzkulturen nur eng verwandte Bakterien betrifft [WEBER, 2008].

MSB sind allerdings auch für eine Reihe unterschiedlicher, mikrobiell verursachter Rohwurstfehler verantwortlich (siehe *Tabelle 2-4*).

Tab. 2-4 Mikrobielle Rohwurstfehler

Milchsäurebakterien	Sensorische Veränderungen
homofermentative Arten	Übersäuerung
heterofermentative Arten	Gasbildung, Geruchs- und Geschmacksabweichung
Peroxid bildende Arten	Zerstörung der Pökelfarbe, Farbfehler
Leuconostoc spp.	Fadenziehen

[QUELLE: KRÄMER, 2007]

Durch die Sequenzanalyse der 16S rRNA von MSB konnte gezeigt werden, dass Milchsäurebakterien (und im Speziellen die Gattungen *Carnobacterium*, *Lactobacillus* und *Weissella*) zu den Hauptverursachern des Verderbs von Muskelfleisch zählen.

Bei Fleischprodukten wie z.B. Frankfurter ist der Verderb vor allem mit einer schleimig-säurlichen, grünlichen Oberfläche assoziiert: *Laktobacillen* sind mit der Entwicklung von Schleim (aus Polyglucose (Dextran) oder Polyfructose (Lävan) bestehend) in Anwesenheit von Feuchtigkeit verbunden, die Säuerung tritt durch eine Metabolisierung von Zuckern zu Milchsäure auf, und die grünliche Verfärbung bei Pökelwaren entsteht durch H_2O_2, wenn die Produktoberfläche mit der Umgebungsluft in Berührung kommt, und durch die beim Kochprozess inaktivierte Muskel-Katalase, sowie die katalase-negativen Bakterien akkumuliert. H_2O_2 reagiert anschließend mit dem Nitrosomyochromogen zum grünen Choleglobin [NYCHAS et al., 2007; WEBER, 2008; KRÄMER, 2007; HAMMES und HERTEL, 2006].

2.1.3.5 Sauerteig

Säuretolerante Hefen bilden gemeinsam mit den homofermentativen Milchsäurebakterien *Lactobacillus plantarum*, *Lb. casei* und *Lb. delbrueckii*, sowie den heterofermentativen Arten *Lb. fermentum* und *Lb. brevis* die Flora des Sauerteigs, wobei die Sauerteig-Gärung des Roggenmehlteiges vielfältige positive Eigenschaften aufweist:

- Der pH-Wert-Abfall, ausgelöst durch die Milchsäurebildung der *Lactobacillus*-Arten, bewirkt:
  - Backfähigkeit des Mehles durch eine verstärkte Quellfähigkeit,
  - Wachstumsförderung säuretoleranter Hefen,
  - Schutz vor Fremdgärung (z.B. Enterobacteriaceae),
  - Unterdrückung der Entwicklung von Verderbniserregern (beispielsweise schleimbildende *Bacillus*-Arten)
- Bildung von Aromastoffen durch MSB und Hefen
- Teiglockerung (CO_2-Produktion der Hefen) [HEIDER, 2007; KRÄMER, 2007].

Zu diesem Zweck wird ein Teil eines reifen Sauerteigs als Anstellsauer, oder ein Reinzuchtsauer, dem Roggenmehl zur Einleitung der Sauerteig-Gärung hinzugefügt. Die Starterkulturen der Reinzuchtsauer bestehen aus einer nicht näher definierten Mischung von Hefen und *Lactobacillus*-Arten, und sind kommerziell erhältlich [KRÄMER, 2007].

In traditionell geführten Teigen (Typ-I-Teigen) sind MSB-Arten zu finden, die sich besonders gut an das Substrat (Teig) angepasst haben. Besonders erwähnenswert sind hier der Leitkeim *Lactobacillus sanfranciscensis*, und weiters *Lb. pontis*, da diese Organismen neben anderen Stämmen nicht nur vorherrschend vorhanden sind, sondern ihre Wirkung in langgeführten Sauerteigen auch in optimaler Art und Weise entfalten. Die Spezies *Lb. sanfranciscensis* konnte überdies bisher in keinem anderen Habitat als dem Sauerteig nachgewiesen werden. Die heterofermentative Spezies *Lb. pontis* ist zudem säuretoleranter als *Lb. sanfranciscensis*, was Stämme dieser Art somit auch für einen Einsatz der länger gelagerten (und mit einer längern Einwirkung niedriger pH-Werte verbundenen) Typ-II-Teige prädestiniert [HAMMES und VOGEL, 2007; KORAKLI et al., 2005].

Abbildung 2.1.3.5-1 stellt die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen auf Basis der 16S rRNA Daten der Laktobazillen in Sauerteigen dar.

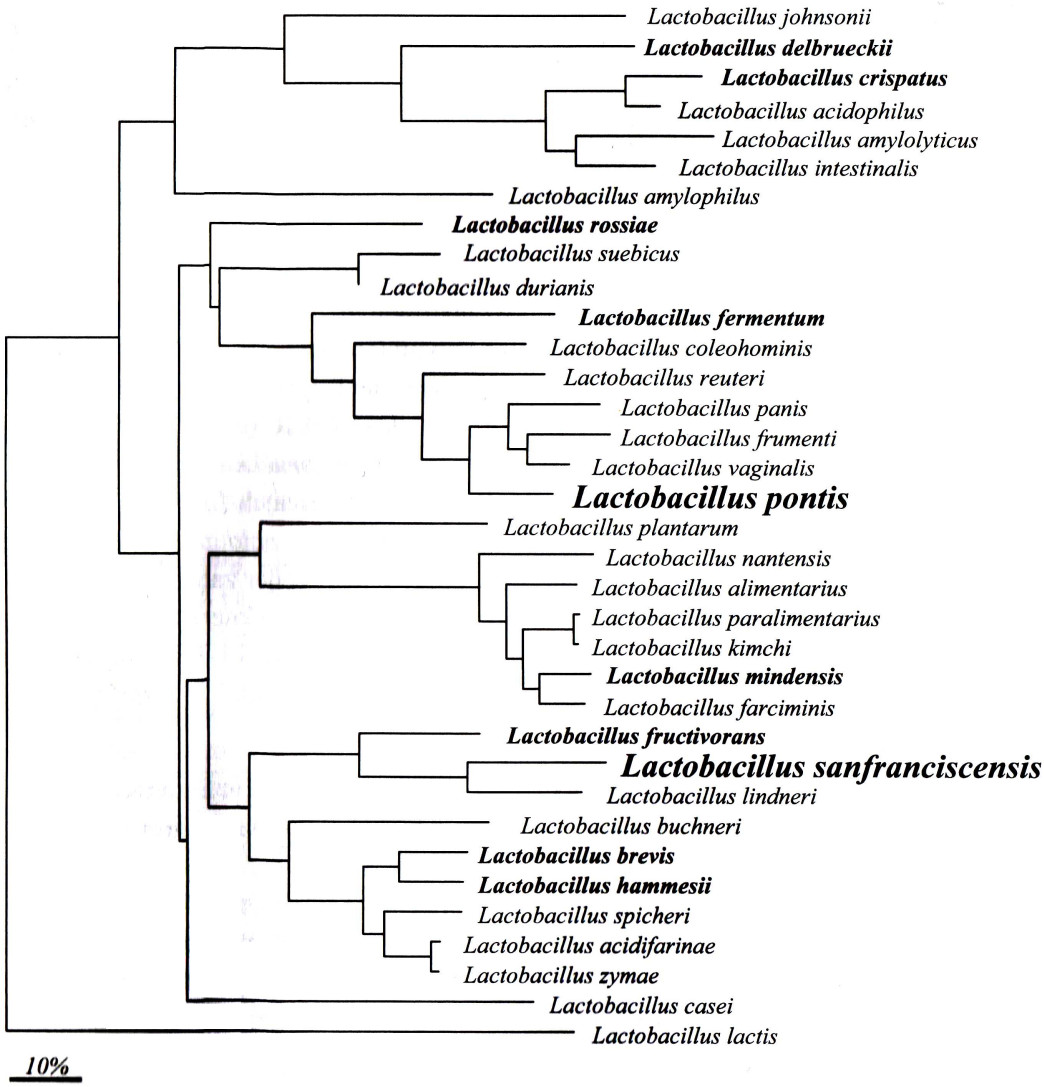


Abb. 2.1.3.5-1 Phylogenetische Verwandschaftsbeziehungen basierend auf dem Vergleich der 16S rRNA Sequenzen der Lactobazillen aus Sauerteigen. Die Konstruktion des Baumes erfolgte nach der „neighbour-joining method“ nach Saitou und Nei, 1987; fett gedruckte Spezies konnten in technisch relevanten Keimzahlen nachgewiesen werden, *Lb. sanfrancicensis* und *Lb. pontis* dienen als Leitkeime für Typ-I- bzw. Typ-II-Sauerteige [QUELLE: HAMMES und VOGEL, 2007].

Milch- und Essigsäure sind als Gärungsendprodukte für Geschmack und Aroma von besonderer Relevanz; ihr Verhältnis (auch Fermentationsquotient (FQ) genannt) sollte etwa 2 – 2,7 betragen.

Spicher und Stephan (1987) beschrieben, dass sogar die Verwendung unterschiedlicher Stämme eine unterschiedliche Sensorik des Sauerteigbrotes zur Folge hat. Neben Produkten des Kohlenhydratstoffwechsels spielen auch getreideeigene Proteasen, die durch einen Abfall des pH-Wertes aktiviert werden, und damit Mehlproteine zu Peptiden abbauen, eine Rolle. Laktobazillen

spalten die Peptide weiter zu Aminosäuren, wobei die Abbauprodukte von Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Arginin und Methionin das Brotaroma wesentlich mitbestimmen. Ornithin wird von den Stämmen *Lb. pontis* und *Lb. reuteri* aus Arginin synthetisiert (*Abbildung 2.1.3.5-2*), beim Backprozess bildet sich dann aus Ornithin die Substanz 2-Acetyl-1-pyrrolin in der Brotkruste, welche für das Röstaroma typisch ist [HAMMES und VOGEL, 2007; GÄNZLE et al., 2005].

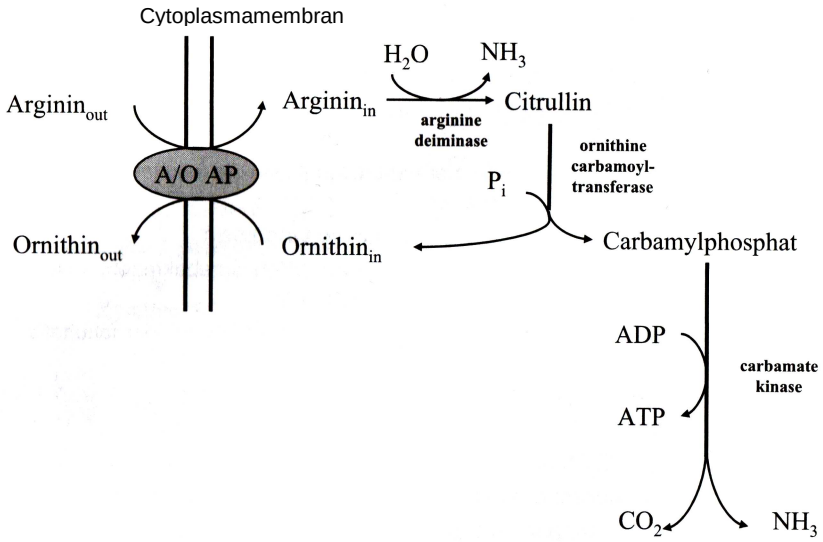


Abb. 2.1.3.5-2 Argininmetabolismus von *Lactobacillus pontis* und *Lb. reuteri*. Außer dem Gewinn von ATP erfolgt auch eine Abpufferung des pH-Wertes, da Ammoniak gebildet wird. Beim Backen wird aus dem synthetisierten Ornithin der Aromastoff 2-Acetyl-1-pyrrolin gebildet [QUELLE: HAMMES und VOGEL, 2007].

2.1.3.6 Genussmittel

Milchsäurebakterien sind auch an der komplexen Fermentation von Kaffee- und Kakaobohnen beteiligt, wobei in diesem Zusammenhang andere Bakterien und Pilze von größerer Bedeutung sind [HEIDER, 2007]. Trotzdem üben MSB einen nicht unwesentlichen, positiven Einfluss auf die biologische „Steuerung“ des Fermentationsablaufs und die Qualität aus, da durch ihr vermehrtes Wachstum der pH-Wert rasch abfällt, und somit die Entwicklung von Verderbnisorganismen unterdrückt wird. Bei Kaffeebohnen sind im frühen Fermentationsstadium Vertreter der Gattung *Weissella*, und vor allem *Leuconostoc* von Relevanz, im späteren Fermentationsverlauf spielen vor allem *Lactobacillus plantarum*, *Lb. pentosus*, sowie *Lb. brevis* eine wichtige Rolle [HOLZAPFEL und MÜLLER,

2007]. Bei der Fermentation von Kakaobohnen kommen üblicherweise *Lactobacillus ssp.* in den frühen Phasen vor, in den späteren Fermentationsphasen sind besonders *Lactococcus ssp.* anzutreffen [KOSTINEK und FRANZ, 2007].

2.1.3.7 Silage

Unter dem Begriff „Silage“ versteht man durch Milchsäuregärung konserviertes Viehfutter aus zerkleinertem Pflanzenmaterial. Für einen geregelten Ablauf der Gärung wird das Material luftdicht gelagert, und (an)organische Säuren oder Zucker in Form von leicht vergärbarer Melasse zugefügt, um das Wachstum der säuretoleranten MSB gegenüber Clostridien zu fördern. MSB-Arten, welche die Gärprozesse dominieren, gehören den Gattungen *Lactobacillus*, *Streptococcus* und *Leuconostoc* an [HEIDER, 2007]. Obwohl sich die Gärprozesse der fermentierten Gemüse und der Silage relativ ähnlich sind, darf in Anbetracht der Tiergesundheit bei der Herstellung von Silage kein Salz verwendet werden (dadurch erhöht sich jedoch auch die Gefahr von Fehlgärungen!) [BUCKENHÜSKES, 2007].

2.1.3.8 Milchsäurebakterien als Getränkeschädlinge

Milchsäurebakterien bilden eine Vielzahl an Stoffwechselprodukten: Im heterofermentativen Glukosestoffwechsel können Milch- und Essigsäure entstehen, aber auch Wasserstoffperoxid, Acetaldehyd, Kohlendioxid und Diacetyl können gebildet werden. Alle diese Substanzen beeinflussen jedoch die sensorische Qualität der Produkte: Essigsäure liefert eine als sensorisch kratzig empfundene Säurenote, Diacetyl und Acetoin weisen einen butterähnlichen Geruch und Geschmack auf; Bei festen Erzeugnissen (z.B. Rohwurst) besteht die Möglichkeit, dass Kohlendioxid zur Lochbildung führt, und Wasserstoffperoxid gilt als Verursacher von Verfärbungen – und führt zur Ranzigkeit [WEBER, 2008].

Die säuretoleranten, jedoch ernährungsphysiologisch anspruchsvollen Milchsäurebakterien finden mit Säften, Bier und Wein ideale Substrate vor, und können sich sogar in Bier und CO_2-imprägnierten Säften vermehren, da sie durch Kohlendioxid nicht gehemmt werden. Ihr rascher Zuckerumsatz resultiert

in einem schnellen Getränkeverderb – ein erhöhter Essigsäuregehalt in Getränken ist meist auf MSB zurückzuführen. Auch sorgen die von MSB gebildeten Polysaccharide (meistens von *Leuconostoc mesenteroides* verursacht) für eine negative Beeinflussung der sensorischen Eigenschaften, da sich die Viskosität der betreffenden Getränke soweit erhöht, dass diese „zäh“ bis „fadenziehend“ werden [DITTRICH et al., 2008].

Lactobacillus brevis und *Lactobacillus plantarum* wandeln Apfelsäure zu Milchsäure und CO_2 um, andere Arten wiederum bilden die Aromakomponenten Acetoin und Diacetyl (aus Citrat) in Zitrussäften, und verursachen damit einen buttermilchartigen Geschmack. Durch die übliche Pasteurisation werden *Lactobacillen* allerdings abgetötet [MÜLLER und TRIERWEILER, 2007; KOSTINEK und FRANZ, 2007; HAMMES und HERTEL, 2006].

Die wichtigsten zwei Gattungen der Getränkeschädlinge finden sich bei Säften unter den Heterofermentativen: *Leuconostoc* (obligat heterofermentativ; besonders *Leuconostoc oenos*) und *Lactobacillus* (teils fakultativ, teils obligat heterofermentativ). Bei Wein spielt auch die homofermentative Gattung *Pediococcus* eine wichtige Rolle. Als bedeutendste bierschädliche Arten wären *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus damnosus, Lactobacillus lindneri* und *Lactobacillus casei*, weiters auch *Lactobacillus backii*, *Lactobacillus coryniformis* und *Streptococcus lactis* zu nennen. [DITTRICH et al., 2008; KRÄMER, 2007].

Weiters zählen noch die Arten *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* und *Lb. buchneri* hinzu. Das Wachstum der Laktobazillen verursacht eine seidig-glänzende Trübung, die von einem Sauer- und Buttergeschmack (Diacetyl) begleitet wird, während schleimbildende Stämme für eine gewisse Klebrigkeit verantwortlich sind [HAMMES und HERTEL, 2006].

2.1.4 Probiotika

»Eure Nahrungsmittel sollen eure Heilmittel sein, und eure Heilmittel sollen eure Nahrungsmittel sein« (HIPPOKRATES von Kos, 400 v. Chr.)

„Probiotic“ (engl. probiotisch) ist ein etymologischer Hybridbegriff, der sich aus der Präposition „für“ (lat. *pro*) und „Leben“ (griech. *bios*) zusammensetzt, also „für das Leben“ bedeutet [HAMILTON-MILLER et al., 2003].

Nach FULLER (1989) sind Probiotika als lebender, probiotischer Nahrungszusatz zu verstehen, der durch eine vorteilhafte Beeinflussung der intestinalen mikrobiellen Balance der Darmflora des Wirtsorganismus gekennzeichnet ist. Bei der Expertenkonferenz der FAO/WHO (2001) wurde der Begriff „Probiotika“ als „Lebende Mikroorganismen, welche in ausreichend zugeführter Menge dem Wirtsorganismus einen gesundheitlichen Nutzen bringen“ definiert [FAO/WHO, 2001], der über ihren Ernährungswert hinaus geht [DOTAN und RACHMILEWITZ, 2005; SCHREZENMEIR und DE VRESE, 2001].

Diese Begriffserklärungen implizieren immer, dass sich nur lebende Mikroorganismen vorteilhaft auf die menschliche Gesundheit auswirken; allerdings zeigten japanische Wissenschaftler, dass sich möglicherweise auch von inaktivierten probiotischen Mikroorganismen bzw. deren Zellstrukturen ein positiver Effekt auf den Makroorganismus ableiten lässt [OUWEHAND et al., 2002].
Falls die präventiven bzw. therapeutischen Effekte durch Moleküle der Probiotika erklärbar sind, und diese in genügender Zahl pro mikrobieller Zelle, sowie einer entsprechend großen Halbwertszeit in Präperat und Wirtsorganismus vorhanden sind, kann die Wirkung durchaus von abgetöteten, probiotischen Mikroorganismen verursacht werden [ÖLSCHLÄGER und HACKER, 2009].

Die bekanntesten Probiotika stammen von Vertretern der Gattungen *Lactobacillus, Bifidobacterium* und *Enterococcus*, doch auch andere Mikroorganismen und sogar Hefen kommen zum Einsatz. [OUWEHAND et al., 2002].
Trotz der ständigen Identifizierung und Isolierung neuer probiotischer Stämme, die anschließend in diversen Studien untersucht und beschrieben werden, blieb die Anzahl der probiotischen Bakterien innerhalb der bekannten Milchsäurebakterienarten relativ begrenzt [KNEIFEL und DOMIG, 2009].

Tabelle 2-5 zeigt eine Zusammenstellung der meist verwendeten Mikroorganismen in probiotischen Produkten.

Tab. 2-5 Mikroorganismen, die in probiotischen Produkten Verwendung finden

Lactobacillus **Spezies**	***Bifidobacterium*** **Spezies**	**weitere Milchsäurebakterien**	**Sonstige**
Lb. acidophilus	*B. adolescentis*	*Enterococcus faecalis* [a)]	*Bacillus cereus („toyoi“)* [a),d)]
Lb. amylovorus	*B. animalis*	*Enterococcus faecium*	
Lb. casei	*B. bifidum*		
Lb. crispatus	*B. breve*	*Lactococcus lactis* [c)]	*Escherichia coli („Nissle 1917“)* [d)]
Lb. gallinarum [a)]	*B. infantis*		
Lb. gasseri	*B. lactis* [b)]	*Leuconoctoc*	
Lb. johnsonii	*B. longum*	*mesenteroides* [c)]	*Propionibacterium*
Lb. paracasei	*B. species* 420		*freudenreichii* [a),d)]
Lb. plantarum		*Pediococcus acidilactici* [c)]	
Lb. reuteri			*Saccharomyces cerevisiae*
Lb. rhamnosus		*Sporolactobacillus*	*(“boulardii”)*[d)]
Lb. delbrueckii		*inulinus* [a)]	
subsp. *bulgaricus*			
Lb. fermentum		*Streptococcus*	
Lb. helveticus		*thermophilus*	
Lb. salivarius			

[QUELLE: TRAPPITSCH, 2009; HOLZAPFEL et al., 2001]

[a)] hauptsächlich bei Tieren verwendet
[b)] wahrscheinlich synonym zu *B. animalis*
[c)] wenig bekannt von probiot. Eigenschaften
[d)] hauptsächlich pharmazeutische Präparate

Unter den im Darm vorherrschenden Mikroorganismen gelten die Genera *Lactobacillus* und *Bifidobacterium* als ausschließlich nutzbringend. Innerhalb ihrer ökologischen Nischen rufen sie keinerlei schädliche bzw. pathogene Reaktionen hervor, und bilden daher die beiden Hauptgattungen des sogenannten probiotischen Konzepts [KLAENHAMMER, 2007].

Abbildung. 2.1.4-1 stellt – unter Angabe der annähernden Bakterienanzahl der unterschiedlichen Genera – das allgemeine Schema der Zusammensetzung der vorherrschenden menschlichen Fäkalbakterien, sowie den damit verbundenen gesundheitlichen Auswirkungen, dar. Unter den angeführten Gründen, auf denen die Klassifikation basiert, wurden die Bakterien in drei Gruppen eingeteilt: Bakterien, die eine schädliche bzw. pathogene Wirkung auf die menschliche Gesundheit besitzen, welche, die vorteilhafte Effekte aufweisen, und jene, die über beides verfügen.

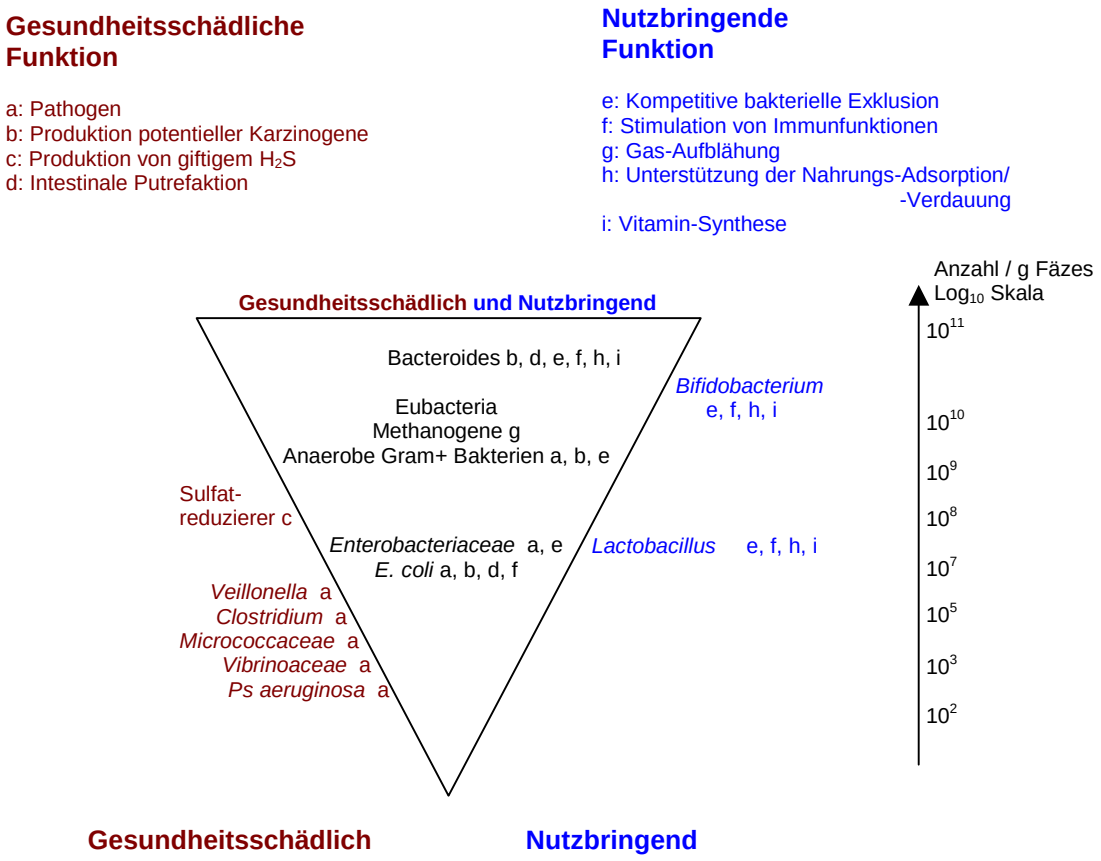


Abb. 2.1.4-1 Vorherrschende Bakterien des Darmes, in potenziell gesundheitsschädliche - bzw. nutzbringende Gruppen kategorisiert. [QUELLE: KLAENHAMMER, 2007; modifiziert]

Weitere Faktoren, die eine Rolle bei der Sicherheitsbeurteilung von Milchsäurebakterien spielen, werden in *Kapitel 2.1.7* erläutert.

2.1.4.1 Auswahlkriterien für den Einsatz probiotischer Kulturen

Relativ kurze Zeit nach den grundlegenden Arbeiten des Gynäkologen Albert Döderlein im Jahr 1890 und des Grazer Pädiaters Ernst Moro im Jahr 1900 wurde die Verwendung von Laktobazillen für therapeutische Zwecke erwogen. Der „Milch"-Mikrobiologe Sigurd Orla-Jensen beschäftigte sich ein ganzes Wissenschaftlerleben lang mit Milchsäurebakterien, und versuchte bereits 1912, den im Joghurt enthaltenen *Lb. bulgaricus* durch *Lb. acidophilus* zu ersetzen. Da *Lb. bulgaricus* jedoch ursprünglich aus dem Labmagen des Kalbes stammt, überstand diese Spezies die Magen-Dünndarm-Passage nur schlecht oder gar nicht [REUTER, 2009].

Doch nicht nur der Ursprung der probiotischen Bakterienkultur stellt einen kritischen Parameter bei der Auswahl dar, auch die entsprechende Anpassung der Kultur an das Substrat ist ein ausschlaggebender Faktor für den Erfolg der Entwicklung eines probiotischen Lebensmittels:

Später durchgeführte Versuche, ein handelsfähiges und somit stabiles, fermentiertes Milchprodukt herzustellen, welches eine ausreichend hohe Zahl lebender Zellen der an den Menschen angepassten *Lb. acidophilus*-Kultur aufweist, waren durch Fehlschläge gekennzeichnet, da die Stämme dieser Art nicht ausreichend an Kuhmilch als Ausgangssubstrat adaptiert waren, und das komplexe Casein nicht schnell genug abbauen konnten. Infolge verlängerter Produktionszeiten kam es zur Überwucherung durch Mikroorganismen, welche die vorangegangene Pasteurisierung überstanden hatten [REUTER, 2009].

Unterschiedliche probiotische Spezies und sogar Stämme innerhalb einer Spezies zeigen charakteristische Eigenschaften, welche deutlich ihre Überlebensfähigkeit im Lebensmittel, die Fermentationscharakteristik, und andere probiotische Leistungen beeinflussen. Daher ist die Auswahl der Stämme als kritischer Parameter zur Gewährleistung der Fermentation bzw. der probiotischen Leistungen zu betrachten. Wünschenswerte Eigenschaften für die Auswahl funktioneller Probiotika sind in *Tabelle 2-6* in vier Hauptkategorien zusammengefasst dargestellt.

Die Auswahlkriterien basieren auf *in vitro* Studien – einige Aspekte (z.B. Überlebensfähigkeit- und Retention im Darm, Immunstimulation, Adhärenz, antikarzinogene Effekte) benötigen jedoch zur endgültigen Abklärung *in vivo* Studien, welche sich umfangreich und teuer gestalten können. Die zugrundeliegenden Wirkungsmechanismen (siehe auch *Tabelle 2-7*), bei denen Probiotika funktionelle Effekte *in vivo* ausüben, müssen ebenfalls noch erforscht werden [KLAENHAMMER, 2007].

Tab. 2-6 Erwünschte Kriterien bei der Auswahl probiotischer Stämme

Eignung
▪ Taxonomische Identifizierung durch phylogenetische Analysen und rRNA-Sequenzierung ▪ Bakterien-Ursprung: die ausgewählte Spezies muss üblicherweise im Darm präsent sein, um die Überlebensfähigkeit im Darm zu sichern; Isolierung von einem gesunden Individuum ▪ Sicherheit: ungiftig, nicht-pathogen, GRAS-Status
Technologische Eignung
▪ Zur Massenproduktion und Lagerung geeignet (Adäquates Wachstum, ausreichende Konzentration, Einfrieren, Dehydratisierung, Lagerung und Vertrieb muss möglich sein) ▪ Überlebensfähigkeit hoher Keimzahlen (vorzugsweise 10^7 – 10^9 KbE/g) ▪ Stabilität der gewünschten Eigenschaften während der Kultur-Zubereitung, Lagerung und Auslieferung ▪ Erwünschte organoleptische Eigenschaften (bzw. nicht erwünschte Eigenschaften) gemeinsam mit dem Lebensmittel bzw. Fermentationsprozess ▪ Genetische Stabilität, aufrecht erhaltene phänotypische Eigenschaften ▪ Genetisch zugänglich für potenzielle Modifikationen
Konkurrenzfähigkeit
▪ Fähigkeit zum Überleben, zur Vermehrung und für metabolische Aktivitäten im Zielorganismus ▪ Gallenresistenz (Gallensekret) ▪ Säureresistenz (Magensaft) ▪ Konkurrenzfähig mit normaler Darmmikrobiota (auch gleicher- oder nahverwandten Spezies); potenziell beständig gegenüber Bacteriocinen, Säure, und anderen antimikrobiellen Stoffwechselprodukten, die von der ansässigen Darmmikrobiota gebildet werden ▪ Evaluierung der Adhärenz, Kolonisation und Retention
Leistung und Funktionalität
▪ Fähigkeit, eine (oder mehrere) klinisch dokumentierte Vorteile auf die Gesundheit auszuüben ▪ Antagonistisch gegenüber pathogenen- oder kariogenen Bakterien ▪ Produktion antimikrobieller Substanzen (Bacteriocine, H_2O_2, organische Säuren, andere inhibitorische Verbindungen) ▪ immunstimulierend ▪ entzündungshemmend ▪ antimutagen ▪ antikarzinogen ▪ Produktion bioaktiver Verbindungen (Enzyme, Vakzine, Peptide)

[QUELLE: KLAENHAMMER, 2007]

2.1.4.2 Gesetzliche Regelungen

In der Tierernährung wurden ab dem Jahr 1949 vorerst in der USA, und kurz darauf auch in Europa, zusätzlich zur täglichen Nahrung subtherapeutische Antibiotikagaben verabreicht, um die tägliche Gewichtszunahme der Tiere zu steigern, und deren Gesundheitszustand zu stabilisieren. Über die Jahre hin-

weg kam es allerdings zu einer Resistenzzunahme gegen die verwendeten Antibiotika und Chemotherapeutika. Probiotische Kulturen sollten daher als Alternative für die bis dahin eingesetzten nutritiven Antibiotika fungieren [REUTER, 2009].

Die europäische Kommission beschloss daher als wirksame Maßnahme gegen das Auftreten antibiotikaresistenter, pathogener Mikroorganismen eine schrittweise Verringerung der Vermarktung und des Einsatzes von Antibiotika als Wachstumsförderer in Futtermitteln, und letztendlich ein komplettes Verbot.
Das am 1. Jänner 2006 in Kraft getretene EU-weite, generelle Verbot der Verwendung von Antibiotika als Wachstumsförderer in Futtermitteln ist in der sog. Futtermittelzusatzverordnung (Verordnung (EG) Nr.1831/2003 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung) geregelt. Probiotika werden ebenfalls zu den Futtermittelzusatzstoffen gezählt, und unterliegen damit auch einer Zulassungspflicht. Deshalb ist der Einsatz dieser Mikroorganismen gleichermaßen in dieser Verordnung geregelt. Probiotika gehören laut Artikel 6 den „zootechnischen Zusatzstoffen“ an, welche *„…die Leistung von gesunden Tieren oder die Auswirkungen auf die Umwelt positiv beeinflussen sollen.“*

Die ständig steigende Zahl neuer Mikroorganismen in der menschlichen Ernährung erfordert eine Sicherheitsbewertung bzw. gesetzliche Regelung für Fermentationsmikroorganismen und Probiotika, um den Gesundheitsschutz der Verbraucher bzw. schwerkranker Patienten zu gewährleisten.
Die Verordnung (EG) Nr. 178/2002 dient auf europäischer Ebene zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit. Die spezielle Fragestellung zur Regelung der Anwendung von Probiotika könnte grundsätzlich in der Verordnung (EG) Nr. 258/97 „über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten“ festgelegt sein. Probiotika zählen zu den Lebensmittel-Zusatzstoffen, doch gerade diese sind in Artikel 2 ausdrücklich von der Ver-

ordnung ausgenommen. Die Verordnung (EG) Nr. 1924/2006 „über nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben über Lebensmittel“ stellt diesbezüglich bis dato die einzige Regelung von Probiotika in der Humanernährung dar, doch auf deren Sicherheit wird in dieser Verordnung auch nicht näher eingegangen [HELLER, 2009].

2.1.4.3 Gesundheitliche Relevanz von Probiotika

Obwohl eine Vielzahl positiver Berichte über die gesundheitsfördernde Wirkung von fermentierten Milchprodukten existieren, sind spezifisch gesundheitsbezogene Auswirkungen von Probiotika, wie etwa Hemmung der Kanzerogenese oder Immunstimulation bis dato noch nicht abgesichert, da diesbezüglich eindeutige Aussagen nur unter experimentell- und epidemiologisch hohem Aufwand zu bestätigen sind [KRÄMER, 2007].

Auch die vorteilhafte Wirkung von Probiotika bzw. konventionellem Joghurt auf das Plasmalipidprofil des Menschen wird widersprüchlich diskutiert:

In der Studie von FABIAN und ELMADFA (2007) wurden 33 junge, normocholesterolämischen Frauen in eine Gruppe, welche probiotisches Joghurt verzehrte, und in eine Kontrollgruppe, die konventionelles Joghurt erhielt, aufgeteilt. In beiden Gruppen kam es während der täglichen, vier wöchigen Joghurtaufnahme zu einer signifikanten Verbesserung des Gesamt-/HDL- bzw. LDL-/HDL-Cholesterol-Quotienten, was von den Autoren dieser Studie auf den regelmäßigen Verzehr des fermentierten Milchprodukts *per se* (bzw. auf den Einfluss von Sphingolipiden), und nicht auf die Wirkung probiotischer Kulturen, zurückgeführt wird. Weiters berichten FABIAN und ELMADFA, dass die positive Veränderung der Quotienten nicht nur von der Gesamt- bzw. LDL-Cholesterol-Senkung stammt, sondern auch von einer gleichzeitig erhöhten HDL-Cholesterolkonzentration herrührt.

Auch in der Studie von SADRZADEH-YEGANEH (2009) konnte nach sechswöchigem Joghurtverzehr sowohl in der probiotischen-, als auch in der konventionellen Gruppe eine signifikante Abnahme des Gesamt-/HDL-Cholesterin-Quotienten beobachtet-, und daher ebenfalls der positive Einfluss von konventionellem und probiotischem Joghurt auf das Lipidprofil gezeigt werden.

ST-ONGE et al. (2002) konnten in ihrer randomisierten, kontrollierten Cross-Over-Studie mit 13 leicht hypercholesterinämischen, männlichen Probanden, welchen für eine Dauer von vier Wochen „Kefir“ als fermentiertes Milchprodukt verabreicht wurde, weder einen Einfluss auf die Plasmatriglycerid-, noch auf die Gesamt-, LDL- und HDL-Cholesterin-Konzentrationen feststellen.
Auch GREANY et al. (2004) konstatierten in ihrer Studie mit Cross-Over Randomisierung keine positive Auswirkung auf das Plasmalipidprofil postmenopausaler Frauen, allerdings basieren die Ergebnisse dieser Untersuchung auf der Einnahme probiotischer Kapseln (mit den Stämmen *Lactobacillus acidophilus* DDS-1 und *Bifidobacterium longum*). Die Autoren beschreiben eine stammspezifische Abhängigkeit hypocholesterolämischer Eigenschaften, und bemerken weiters, dass die verwendeten Stämme der vorliegenden Studie diese Charakterzüge möglicherweise nicht aufweisen. Laut SANDERS (2000) könnten Ergebnisse, welche in Humanstudien die Wirksamkeit von Probiotika anzweifeln, sowohl in der Wirkungslosigkeit der getesteten Stämme, als auch in der niedrigen Dosierung von potenziell effektiven Stämmen, oder einem mangelhaften Studiendesign begründet sein.

Die Mechanismen, welche den positiven Auswirkungen von Probiotika bei diversen Erkrankungen zugrundeliegen, sind zwar größtenteils noch unbekannt, doch werden eine Modifikation des pH-Wertes im Darm, Sekretion antimikrobieller Verbindungen (z.B. H_2O_2, Bacteriocine) und folglich antagonistische Effekte gegenüber Pathogenen, die Vermeidung der Kolonisation von Pathogenen durch kompetitive Inhibition, sowie Konkurrenz um Nährstoffe und Wachstumsfaktoren – und weiters die Stimulation immunmodulierender Zellen und Laktaseproduktion diskutiert. [COLLADO et al., 2009; GUPTA und GARG, 2009].

Über Jahre hinweg waren viele Stämme mit probiotischem Potential Gegenstand zahlreicher experimenteller- und klinischer Untersuchungen, bei denen die prophylaktische und therapeutische Wirksamkeit im Zusammenhang mit den verschiedensten Erkrankungen analysiert wurde.

Viele dieser Studien beschäftigten sich insbesondere mit Probiotika in der Behandlung von Durchfällen unterschiedlichster Ätiologie:

In einer randomisierten, doppelblind Placebo-kontrollierten Studie erhielten 119 Kinder zusätzlich zur Antibiotika-Therapie ein Probiotikum (*Saccharomyces boulardii*), während 127 Kinder ein Placebo verabreicht bekamen. In der Verum-Gruppe war das Risiko an einer Antibiotika-assoziierten Diarrhoe zu erkranken, im Vergleich zur Placebo-Kontrollgruppe eindeutig herabgesetzt (3,4% vs. 17,3%) [KOTOWSKA et al., 2005].

Eine andere Untersuchung mit identischem Studiendesign kam zu einem ganz ähnlichen Ergebnis: In der Patientengruppe mit Antibiotikamedikation, welche konkomitierend ein probiotisches Getränk zu sich nahm, entwickelten nur 12%, in der Placebo-kontrollierten Gruppe hingegen 34% der Probanden, eine Antibiotika-assoziierte Diarrhoe [HICKSON et al., 2007]. Bei der Behandlung einer akut auftretenden Diarrhoe von Kindern stellen Probiotika ebenfalls einen sinnvolle Ergänzung dar: *S. boulardii* reduziert nicht nur die Stuhlfrequenz und die Dauer der Erkrankung, auch die Anzahl der Durchfall-Episoden in den darauffolgenden zwei Monaten wird nach BILLOO et al. (2006) um bis zu 50% gesenkt.

Einige Probiotika-Spezies (*S. boulardii* und eine Mischung von *Lactobacillus acidophilus* und *Bifidobacterium bifidum*) eignen sich laut einer Metaanalyse auch zur sicheren, effektiven (in 85% der Fälle wirksamen) Prävention der Reisediarrhoe [McFARLAND, 2007].

ANUKAM et al. (2008) zeigten in ihrer klinischen Studie, dass die Symptome der HIV-assoziierten Diarrhoe unter Einsatz eines probiotisch supplementierten (*Lb. rhamnosus* GR-1 und *Lb. reuteri* RC-14) konventionellen Joghurts eindeutig schneller verschwanden, als dies im Vergleich zur Kontrollgruppe, die nur herkömmliches Joghurt erhielt, zu beobachten war. Zudem erhöhte sich in der Probiotika-Gruppe die Anzahl der CD4-Zellen/µl.

Diese Ergebnisse konnten in der randomisierten, Placebo-kontrollierten, Cross-Over-Studie von SALMINEN et al. (2004) mit 17 HIV-infizierten, antiretroviral therapierten Patienten, welche unter lang anhaltender, nicht-infektiöser Diarrhoe litten, nicht bestätigt werden: Die Anzahl der CD4-Zellen/µl blieb während

der gesamten Studiendauer konstant, und Stuhlfrequenz bzw. -konsistenz, sowie gastrointestinale Symptome, wiesen sowohl in der Verum- als auch in der Placebo-Gruppe keine signifikanten Differenzen auf.
SZYMAŃSKI et al. (2006) beschreiben in ihrer randomisierten, doppelt verblindeten, Placebo-kontrollierten Studie, dass sich die Dauer einer Rotavirus-assoziierten Diarrhoe bei (Klein)Kindern durch die applizierte Kombination von drei verschiedenen *Lb. rhamnosus*-Stämmen (573L/1;573L/2; 573L/3) eindeutig verkürzen lässt. Für eine im Vergleich zu unbehandelten Kindern signifikant reduzierte Dauer der Diarrhoe muss der Behandlungsbeginn allerdings spätestens 72 Stunden nach Einsetzen des Durchfalls erfolgen, da die Durchfallsdauer vor Behandlungsstart mit der Dauer nach dem Start der Behandlung korreliert [SZYMAŃSKI et al., 2006].
Die (im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche nur eine orale Rehydratationslösung verabreicht bekam) signifikant verkürzte Dauer der Rotavirus-assoziierten Diarrhoe bei gleichzeitig verabreichter Probiotika-Gabe (einer Mischung von *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Saccharomyces boulardii*) wurde auch von TERAN et al. (2009) festgestellt.

Galt das primäre klinische Interesse von Probiotika der Prävention und Behandlung gastrointestinaler Infektionen und Antibiotika-assoziierter Diarrhoe [COLLADO et al., 2009], so kristallisierten sich nach und nach weitere positive Effekte heraus – die allerdings wiederum nicht in allen Studien bewiesen werden konnten.

Um den präventiven Effekt des Probiotikums *Lactobacillus* GG auf das Auftreten einer atopischen Dermatitis bei Kleinkindern im Alter von zwei Jahren zu testen, wurden Schwangere von Familien mit mehr als einem atopisch erkrankten Angehörigen (Mutter, Vater oder Kind) im Rahmen einer doppelblinden, Placebo-kontrollierten, prospektiven Studie zufällig entweder der Interventions- oder Placebogruppe zugeteilt. Die Supplementation startete vier- bis sechs Wochen vor dem voraussichtlichen Geburtstermin, und wurde postnatal sechs Monate aufrechterhalten. Da die Inzidenz der zwei Gruppen annähernd

gleich ausfiel (28% in der Studien- vs. 27,3% in der Vergleichsgruppe), der Schweregrad beider Gruppen vergleichbar war, und Kinder mit rezidivierenden (≥5) Episoden einer Bronchitis mit pfeifenden Atemgeräuschen zudem häufiger in der *Lactobacillus* GG-Gruppe als in der Placebogruppe aufzufinden waren (26% vs. 9,1%), kann laut KOPP et al. keine generelle Empfehlung zur Supplementierung mit *Lactobacillus* GG während der Schwangerschaft und frühen Kindheit zum Zwecke einer primären Prävention der atopischen Dermatitis ausgesprochen werden [KOPP et al., 2008].

In einer früher durchgeführten Studie mit gleichem Design [KALLIOMÄKI et al., 2001] zogen die Autoren hingegen ein positives Resümee, und kamen in ihrer Untersuchung zu der Schlussfolgerung, dass die Inzidenz prädisponierter Kinder, innerhalb der ersten zwei Lebensjahre an atopischen Ekzemen zu erkranken, durch die perinatale Gabe von *Lactobacillus rhamnosus* GG um 50% (im Vergleich zur Placebogruppe) reduziert ist.

Kurze Zeit später wurde überdies in einer Vier-Jahres-Follow-up-Studie gezeigt, dass sich der präventive Effekt von *Lactobacillus rhamnosus* GG bei gefährdeten Kindern bis zu einem Alter von vier Jahren erstreckt. Dieser Schutzmechanismus, der das Risiko an atopischen Ekzemen zu erkranken verringert, wurde mit der Generierung des antiinflammatorischen IL-10 und einer Umwandlung des Wachstumsfaktors „β“erklärt [KALLIOMÄKI et al., 2003].

Sogar der Blutdruck lässt sich von während der Fermentation erzeugten Peptiden modulieren, indem blutdrucksenkende ACE-inhibitorische Peptide aus Caseinen (Casokinine), β-Lactoglobulin (β-Lactorphine) und anderen Molkenproteinen (wobei alleine über 20 aus αs1- und β-Casein) durch einige spezifische Stämme von *Lactobacillus helveticus* freigesetzt werden. Die Peptide Val-Pro-Pro und Ile-Pro-Pro, welche aus αs1- und κ-Casein stammen und in der von *Lb. helveticus* fermentierten Milch enthalten sind, senkten in der klinischen Studie von Jauhiainen et al. (2005) sowohl den systolischen- als auch den diastolischen Blutdruck bei mild hypertonischen Patienten [DE VRESE und SCHREZENMEIR, 2009]. Eine andere Untersuchung mit gleichem Studiendesign konnte den blutdrucksenkenden Effekt der Lactotripeptide Val-Pro-Pro und Ile-Pro-Pro nicht feststellen [ENGBERINK et al., 2008].

Eine aktuelle Studie berichtet außerdem, dass bioaktive Peptide *Lb. helveticus*-fermentierter Milch im Rahmen einer Langzeitbehandlung die arterielle Steifigkeit hypertensiver Personen reduzieren [JAUHIAINEN et al., 2010].

In einer Vielzahl weiterer Untersuchungen werden Probiotika zur Prävention bzw. Therapie der unterschiedlichsten Erkrankungen vorgeschlagen. Eine detaillierte Zusammenstellung aller Erkrankungen, bei denen Probiotika (autorenabhängig) eine vorteilhafte Wirkung auf die Gesundheit bescheinigt wird, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, daher soll im Anschluss lediglich auf die wichtigsten positiven Effekte mit den in Verbindung stehenden, möglichen Wirkungsmechanismen eingegangen werden.

Tabelle 2-6 präsentiert die von Milchsäurebakterien ausgehenden, positiven Effekte auf die Gesundheit, mit deren assoziierten Wirkungsmechanismen, die jedoch in weiterer Folge durch zusätzliche Untersuchungen abgesichert werden müssen, da viele Mechanismen von *in vitro* durchgeführten Experimenten abgeleitet wurden, und anerkannte, methodisch hochwertige, klinische Studien *in vivo* oft noch ausständig sind.

Tab. 2-7 Zusammenfassung positiver Effekte von Milchsäurebakterien in Verbindung mit den vermutlich zugrundeliegenden Wirkungsmechanismen

positiver Effekt	möglicher Wirkungsmechanismus
Verminderung der Laktoseintoleranz	- Wirkung der bakteriellen β-Galaktosidase auf Laktose
Positiver Einfluss auf die intestinale Flora	- Beeinflussung der Aktivität der übermäßig wachsenden Flora verringert die Produktion von toxischen Metaboliten - Antibakterielle Eigenschaften
Prävention von Infektionen des Intestinaltrakts	- Erhöhung der Antikörperproduktion durch adjuvanten Effekt - Stimulation von systemischen oder sekretorischen Immunantworten - Kompetitive Exklusion - Änderung der intestinalen Bedingungen (pH, kurzkettige Fettsäuren, Bakteriocine) - Änderung von Toxin-Bindungsstellen - Änderung der Darmflora - Adhärenz an intestinale Mukosa verhindert Adhärenz von Pathogenen - Kompetition um Nährstoffe
Verbesserung des Immunsystems	- Stärkung der unspezifischen Abwehr gegen Infektionen - Erhöhung der phagozytischen Aktivität von Leukozyten - Erhöhung der IgA-Produktion - Proliferation von intraepithelialen Lymphozyten - adjuvanter Effekt bei antigenspezifischen Immunantworten - Regulation der Th1/Th2-Balance, Induktion der Zytokinsynthese

[QUELLE: TRAPPITSCH, 2009; modifiziert nach KLAENHAMMER, 2007]

Fortsetzung - Tab. 2-7 Zusammenfassung positiver Effekte von Milchsäurebakterien in Verbindung mit den vermutlich zugrundeliegenden Wirkungsmechanismen

positiver Effekt	möglicher Wirkungsmechanismus
Reduktion von inflammatorischen und allergischen Reaktionen	- Wiederherstellung der Homöostase des Immunsystems - Regulation der Zytokinsynthese - Prävention von Antigen-Translokation in den Blutkreislauf
Anti-Darmkrebseffekt	- Mutagenbindung - Karzinogendeaktivierung - Änderung der Aktivität von Darmmikroben - Verringerte prokanzerogene Enzymaktivitäten (β-Glucuronidase, Nitroreduktase, Azoreduktase) - Immunstimulation - Einfluss auf die Konzentration sekundärer Gallensalze
Blutfette, Herzerkrankungen	- Assimilation von Cholesterol - Änderung der Aktivität von Gallensalz-Hydrolase-Enzymen - Antioxidativer Effekt
Blutdruck-senkender Effekt	- Aktivität von Peptidase auf Milch führt zu blutdrucksenkenden Tripeptiden (Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitoren) - Zellwandkomponenten wirken als Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitoren
Infektionen des Urogenitaltrakts	- Adhäsion an Zellen des Harn- und Vaginaltrakts - Kompetitive Exklusion - Produktion von Inhibitoren (H_2O_2, „Biosurfactants“)
Infektionen durch *Heliobacter pylori*	- Kompetitive Exklusion - Produktion von Milchsäure - Produktion von antimikrobiellen Substanzen - Reduzierung der Urease-Aktivität von *H. pylori*
Karies	- Änderung der oralen Mikroflora - Änderung der Aktivität der oralen Mikroflora - Beeinflussung der Fähigkeit, an Zähne zu adhärieren
Nierensteine	- Beeinflussung der Degradation von Oxalat durch Änderung der Darmflora
Endotoxämie	- Inhibierung von Endotoxin-produzierender intestinaler Mikroflora

[QUELLE: TRAPPITSCH, 2009; modifiziert nach KLAENHAMMER, 2007]

Da jedoch alle diese Vorgänge hochspezifisch sind, besitzt die Charakterisierung der Eigenschaften bestimmter probiotischer Stämme hohen Stellenwert, um die besten geeigneten Stämme oder deren Kombinationen für die jeweilige Aufgabe auszuwählen [COLLADO et al., 2009].

2.1.5 Präbiotika

Präbiotika sind als unverdauliche Nahrungsbestandteile definiert, welche die Gesundheit des Wirtsorganismus durch selektive Stimulation des Wachstums- und/oder der Aktivität von einzelnen-/einer begrenzten Anzahl von Bakterien im Darm vorteilhaft beeinflussen [GIBSON und ROBERFROID, 1995]. Diese Definition überschneidet sich mehr oder weniger mit der Definition von Ballast-

stoffen, mit der Ausnahme seiner Selektivität für bestimmte Spezies. Diese Selektivität wurde für Bifidobakterien gezeigt, welche durch die Nahrungsaufnahme von fermentierbaren Oligosacchariden wie Inulin, Oligofruktosen oder Galaktooligosacchariden gefördert werden [SCHREZENMEIR und DE VRESE, 2001; DE VRESE und SCHREZENMEIR, 2009; NINESS, 1999].
Die Begriffserklärung von GIBSON und ROBERFROID (1995) wurde erneut aufgegriffen und abgeändert: Präbiotika sind selektiv fermentierte Inhaltsstoffe, welche spezifische Änderungen – sowohl der Zusammensetzung und/oder der Aktivität der gastrointestinalen Mikroflora – ermöglichen, und damit das Wohlergehen und die Gesundheit des Wirtsorganismus vorteilhaft beeinflussen [ROBERFROID, 2007].

Präbiotika zählen zu den Oligosacchariden, und lassen sich von den Ballaststoffen, die vorwiegend der Gruppe der Polysaccharide angehören, anhand des Polymerisationsgrades unterscheiden. Präbiotisch wirksamen Substanzen sind:

- Fructo-Oligosaccharide (FOS)
- Galacto-Oligosaccharide (GOS)
- Inulin
- Soy-Oligosaccharide
- Beta-Glukan
- Guar
- Xylo-Oligosaccharide
- Lactulose [MEIER, 2009]

Nahrungsmittelbestandteile, welche als „Präbiotika“ eingestuft sind, müssen grundsätzlich folgende Charaktereigenschaften aufweisen:

- Eingeschränkte Hydrolyse und Absorption im oberen Gastrointestinaltrakt,
- Selektive Wachstumsstimulation nutzbringender Bakterien des Kolons, und
- Potential zur Repression von Pathogenen sowie eine Limitierung der Virulenz durch mehrere Vorgänge, inklusive:
  - Verminderung der Virulenz,
  - Immunstimulation, und
  - Stimulation einer gesundheitlich vorteilhaften Mikrobiota, welche die Kolonisationsresistenz fördert [KLAENHAMMER, 2007].

Neben Inulin kommen auch Fructo-Oligosaccharide als natürliche Inhaltsstoffe in Artischocken, Bananen, Chicorée, Knoblauch, Roggen, Weizen und Zwiebeln vor; Galakto-Oligosaccharide sind in hoher Konzentration in der Muttermilch vorzufinden [MEIER, 2009]. Innerhalb der ersten zwei Lebensjahre bilden Bifidobakterien bei gestillten Babies die – mit bis zu 95% – vorherrschende Bakteriengattung der Darmmikrobiota, da GOS das Wachstum von Bifidobakterien und Laktobazillen stark stimulieren („Bifidogener Effekt" [FANARO et al., 2009]). Ungestillte Babies hingegen weisen eine höhere Zahl potentiell pathogener Bakterien wie Clostridien und Enterokokken im Fäzes auf [ÖLSCHLÄGER und HACKER, 2009; MACFARLANE et al., 2008; MEIER, 2009]. Aufgrund ihrer Beständigkeit finden GOS in einer breiten Palette von Nahrungsmitteln Anwendung, wo sie einen angenehmen Geschmack vermitteln, Textur und Mundgefühl erhöhen, und auch als Füllstoffe eingesetzt werden [MACFARLANE et al., 2008]. Die meisten präbiotischen Verbindungen besitzen einen bifidogenen Charakter, doch gibt es auch einige Ausnahmen, wie beispielsweise Fructo-Oligosaccharide, welche das Wachstum der im Dünndarm angesiedelten Laktobazillen stimulieren (siehe *Tabelle 2-8*) [KLAENHAMMER, 2007].

Tab. 2-8 Präbiotische Verbindungen, welche die intestinale Darmmikrobiota beeinflussen

Präbiotischer Einflussfaktor	Ursprung	Stimulierte Mikroorganismen	Effekt
Oligosaccharide	Zwiebel, Chicorée, Knoblauch, Sojabohne, Spargel, Topinambur	*Bifidobacterium* species	Steigerung der Bifidobakterienanzahl, Unterdrückung von Fäulnisbakterien, Prävention von Obstipation und Diarrhoe
Fructo-Oligosaccharide, Inulin, Oligofructose	Siehe oben	*Bifidobacterium* species, *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum*	Wachstum der Bifidobakterien und Förderung der Säurebildung
Fruktane	Aschefreier, weißer Puder der Topinamburknolle	*Bifidobacterium* species	Wachstumsförderung der Bifidobakterien
Humanes κ-Casein und abgeleitete Glykomakropeptide	Humanmilch: Chymotrypsin und Pepsin-Hydrolysat	*Bifidobacterium bifidum*	Wachstumsförderung
Stachyose und Raffinose	Sojabohnenextrakt	*Bifidobacterium* species	Wachstumsfaktor
Casein Makropeptid	Kuhmilch	*Bifidobacterium* species	Wachstumsförderung
Laktitol (4-*O*-β-D-Galaktopyranosyl-D-glucitol)	Synthetischer Zuckeralkohol der Laktose	*Bifidobacterium* species	Wachstumsförderung

[QUELLE: KLAENHAMMER, 2007]

Fortsetzung - Tab. 2-8 Präbiotische Verbindungen, welche die intestinale Darmmikrobiota beeinflussen

Präbiotischer Einflussfaktor	Ursprung	Stimulierte Mikroorganismen	Effekt
Laktulose (4-*O*-*β*-D-Galaktopyranosyl-D-fructose)	Synthetisches Derivat der Laktose	*Bifidobacterium* species	Wachstumsförderung

[QUELLE: KLAENHAMMER, 2007]

Präbiotika werden im oberen Intestinaltrakt nicht verdaut, sondern entweder durch die Mikrobiota des Kolons fermentiert, oder durch Enzyme der Laktobazillen und Bifidobakterien (β-Fructofuranosidase und β-Galactosidase) gespalten. Infolge des erhöhten Substrat-Aufkommens an Mono-, Di- und Trisacchariden wird das Wachstum der im Dickdarm vorhandenen Bifidobakterien sowie – zu einem kleineren Grad auch das der Laktobazillen – positiv beeinflusst, und unerwünschte Organismen unterdrückt [ÖLSCHLÄGER und HACKER, 2009; MEIER, 2009]. Die beim Fermentationsprozess der Präbiotika entstehenden kurzkettigen Fettsäuren (Propionsäure wird bei allen Präbiotika gebildet; bei der Fermentation von Inulin oder FOS entsteht Butansäure) supprimieren pathogene Keime durch ein Absinken des intestinalen pH-Wertes, dienen den Epithelzellen des Dickdarms als bedeutsame Energiequelle, und stimulieren weiters deren Proliferation und Differenzierung [MEIER, 2009; UCHIDA et al., 2007]. Zudem konnten für kurzkettige Fettsäuren eine Vielzahl antiinflammatorischer Effekte nachgewiesen werden [MEIER, 2009; SÄEMANN et al., 2000]. Es existieren zahlreiche Studien, die auf die positiven gesundheitlichen Effekte von FOS und GOS hinweisen, wie beispielsweise

- vermutete antikanzerogene Eigenschaften,
- gesteigerte Absorption von Mineralstoffen und Spurenelementen durch deren erhöhte Löslichkeit infolge des reduzierten, intestinalen pH-Wertes
- positive Beeinflussung des Lipidmetabolismus,
- antiinflammatorische Effekte
- immunstimulierende Effekte [MACFARLANE, 2008; MEIER, 2009; KLAENHAMMER, 2007]

Zu den hauptsächlich postulierten, die Gesundheit vorteilhaft-beeinflussenden Effekten der Präbiotika zählen die Stabilisierung der intestinalen Darmflora, die Vermeidung der Invasion pathogener Keime und die verschiedenartigen Effekte der kurzkettigen Fettsäuren [MEIER, 2009].

2.1.6 Synbiotika

Synbiotika stellen eine Mischung von Probiotika und Präbiotika dar, welche den Wirtsorganismus durch eine verbesserte Überlebensfähigkeit und Implantation lebender Mikroorganismen im Gastrointestinaltrakt, sowie durch selektive Stimulation des Wachstums- und/oder durch Aktivierung des Metabolismus einzelner- oder einer begrenzten Anzahl gesundheitsfördernder Bakterien im Darm vorteilhaft beeinflussen [GIBSON und ROBERFROID, 1995].
Da Präbiotika spezifische Substrate der Probiotika darstellen, repräsentieren Synbiotika eine intelligente Mischung aus Prä- und Probiotika, da sich die kombinierten Wirkungen der einzelnen Bestandteile potenzieren (Synergismus) [MEIER, 2009; FUJIMORI et al., 2009].
In bisher durchgeführten, klinischen Studien kamen unterschiedlichste Kombinationen von Pro- und Präbiotika zum Einsatz, daher lassen sich positiv erzielte Wirkungen nur schwer vergleichen [MEIER, 2009].
Im Anschluss sind einige klinische Studien aufgelistet, bei denen durch Synbiotika-Gabe vorteilhafte Effekte auf die Gesundheit beobachtet werden konnten:

- verbessertes klinisches Erscheinungsbild bei Patienten mit Colitis ulcerosa [FUJIMORI et al., 2009; FURRIE et al., 2005; HASKEY und DAHL, 2009]
- Remission bei Morbus Crohn [FUJIMORI et al., 2007]
- erhöhte Stuhlfrequenz bei Obstipations-prädominantem Reizdarmsyndrom [DUGHERA et al., 2007]
- reduziertes Krebsrisiko nach Polypektomie und bei Darmkrebspatienten [RAFTER et al., 2007]
- verbesserte Leberfunktion bei Patienten mit Leberzirrhose [RIORDAN et al., 2007]

- verminderte, postoperative, bakterielle Infektionsrate bei Lebertransplantationen [RAYES et al., 2005; RAYES et al., 2009]
- verbesserte Darmflora bei Patienten mit Kurzdarmsyndrom [KANAMORI et al., 2004; UCHIDA et al., 2007]
- Prävention & Behandlung allergischer Reaktionen [OGAWA et al, 2006]
- reduzierte Inzidenz septischer Komplikationen bei massivem SIRS [SHIMIZU et al., 2009]
- herabgesetzte Infektionsrate polytraumatisierter Patienten [SPINDLER-VESEL et al., 2007; KOTZAMPASSI et al., 2006; RAYES et al., 2009]

Die Ergebnisse der kürzlich durchgeführten klinischen Studien, welche den Einsatz von Pro- und Präbiotika in der Behandlung von intensivpflichtigen Patienten untersucht haben, sind vielversprechend; daher sind weitere, großangelegte, randomisierte Studien zur Abklärung, welche probiotischen Bakterienstämme dieser Patientengruppe den größten Nutzen bringen, gerechtfertigt. Es steht jedoch auch außer Frage, dass die erfolgreiche Verwendung eines probiotischen Stammes (bzw. die Kombination mehrerer Stämme) in einem gewissen Einsatzgebiet kein Garant für einen vergleichbaren Erfolg bei einer anderen Anforderung darstellt. Es sind mehrere Faktoren bekannt, welche für eine erfolgreiche Therapie mit Probiotika besonders wichtig erscheinen, wie die *Auswahl* und *Dosis* geeigneter probiotischen Stämme, der *Zeitpunkt* der Therapie-Initiierung [MADSEN, 2008], sowie die *Behandlungsdauer* [RAYES et al., 2009]. Genauso, wie sich nicht alle Antibiotika für jede Kondition/Erkrankung eignen, sind auch nicht alle Probiotika für jedes klinische Erfordernis qualifiziert [MADSEN, 2008]. Da des Weiteren zahlreiche Fragen bezüglich der molekularen Wirkungsmechanismen und klinischen Indikation von Präbiotioka unbeantwortet bleiben, sind zur präzisen Definition, welche Rolle Präbiotika als therapeutische Agenzien bei Intensivpatienten spielen, großangelegte, randomisierte, multizentrische Studien erforderlich. Diese Studien müssen klinisch-signifikante Verbesserungen relevanter klinischer Endpunkte identifizieren, bevor die Therapie kritisch-Erkrankter in großem Maßstab gerechtfertigt ist [MANZANARES und HARDY, 2008].

2.1.7 Beurteilung der Sicherheit von Milchsäurebakterien

Die Notwendigkeit der Sicherheitsbeurteilung von Milchsäurebakterien ergibt sich aus der Tatsache, dass Konsumenten fermentierter Milchprodukte oder pharmazeutische Präperate (sog. „Probiotika“) einer hohen Zahl an Keimen ausgesetzt sind [HAMMES, 1998; HELLER, 2009].

Milchsäurebakterien besitzen GRAS-Status für die Produktion fermentierter Nahrungsmittel und zählen damit zu den sogenannten STIFF-Mikroorganismen, da sie durch eine sichere Tradition in der Anwendung von Lebensmittel-Fermentationen gekennzeichnet sind [MONTVILLE und CHIKINDAS, 2007; KRÄMER, 2007]. Der GRAS-Status für die Produktion fermentierter Lebensmittel macht MSB oder ihre Stoffwechselprodukte jedoch nicht automatisch „GRAS“ für den Einsatz der Konservierung von Lebensmitteln, die nicht fermentiert sind. Nisin, dass von *Lactococcus lactis* produziert wird, ist das einzige Bacteriocin, welches eine GRAS-Bestätigung besitzt. Bacteriocine, die von GRAS-Organismen gebildet werden, besitzen selbst nicht automatisch GRAS-Status [MONTVILLE und CHIKINDAS, 2007]. Zudem gibt es noch weitere Restriktionen für den sicheren Einsatz der verwendeten MSB. Sie sollen:

- keine Gene aufweisen, die für übertragbare Resistenzen gegen Chemotherapeutika kodieren
- kein Mucin abbauen [HAMMES, 1998]
- den Darm nicht kolonisieren (da die Kolonisierung als wesentliche Voraussetzung zur Infektion bei pathogenen Bakterien angesehen wird)
- keine Toxine oder Hämolysine bilden [HELLER, 2009]
- bestimmte Aktivitäten von Enzymen (Azoreduktase, Nitroreduktase, β-Glucuronidase und Glycosidase) inhibieren, die bei der Umwandlung von Präkanzerogenen in Kanzerogene mitverantwortlich sind [ÖLSCHLÄGER und HACKER, 2009; BERNARDEAU et al., 2008]
- keine Thromben induzieren
- die Thrombozytenaggregation nicht aktivieren
- nicht an Fibrinogen und Fibronektin binden
- keine unerwünschten Stoffwechselprodukte, wie z.B. Indol, Phenol,

oder biogenen Amine (Histamin, Tyramin oder Phenylethylamin) bilden [HAMMES, 1998; HELLER, 2009; BERNARDEAU et al., 2008].

Die mögliche Produktion biogener Amine in fermentierten Lebensmitteln verursacht unerwünschte Nebenwirkungen wie Migräne, Bauchschmerzen, Erbrechen und Kreislaufbeschwerden. Fermentierte Lebensmittel weisen meist (tolerierbare) Mengen an unterschiedlichen Aminen auf [BERNARDEAU et al., 2008; KRÄMER, 2007], deren Gehalt durch die Verordnung (EG) 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel der KOMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN (2005) geregelt wird.
Der Abbau von biogenen Aminen erfolgt durch Mono- bzw. Diaminooxidasen in den unterschiedlichsten Organen. In Käse (speziell in langgereiftem Cheddar, Emmentaler und Blauschimmelkäse) sind erhöhte Histaminkonzentrationen feststellbar, die sehr oft unter Mitwirkung bestimmter *Lactobacillus*-Stämme (*Lb. buchneri* und *Lb. delbrueckii*) gebildet werden [KRÄMER, 2007].

Während *Lb. sakei* und *Lb. pentosus* in der Regel diesbezüglich kein Problem darstellen, bilden verhältnismäßig viele Stämme der Spezies *Lb. curvatus* vor allem das biogene Amin Tyramin. Außerdem sind einige Stämme der Genera *Leuconostoc* und *Pediococcus* in der Lage, in fermentierten Lebensmitteln durch Decarboxylierung von Aminosäuren biogene Amine zu bilden. Als wirkungsvolle Gegenmaßnahme sollte das zu verarbeitende Rohmaterial eine geringe Keimbelastung aufweisen – die entsprechenden Richtwerte für die Kontamination eines Lebensmittels sind in den „Prozesshygienekriterien“ der Verordnung (EG) 2073/2005 festgelegt. Weiters sollen die eingesetzten Starterkulturen nicht nur durch ihre Unfähigkeit zur Bildung biogener Amine gekennzeichnet sein, sondern auch durch ihr dominierendes Fermentationsverhalten, welches infolgedessen eine Kontaminationsflora mit Potential zur Bildung biogener Amine zu unterdrücken vermag [GÄNZLE, 2008; KRÄMER 2007].

Zudem weist eine Minderheit der Starter- und Hilfskulturen, sowie einige probiotische *Lactobacillus*-Stämme eine außergewöhnliche, übertragbare Antibiotikaresistenz auf [BERNARDEAU et al., 2008]. Als Überträger von Antibiotikaresistenzgenen kommen auch besonders Enterokokken in Frage [HELLER, 2009]. Diese Stämme besitzen das Potential, als Wirte von Antibiotikaresistenzgenen zu dienen, und bergen das Risiko eines Gentransfers zu anderen Bakterien in sich; daher ist Vorsicht geboten, und Analysen zur Antibiotika-Suszeptibilität somit gerechtfertigt.

Für die Gewährleistung der Konsumentensicherheit müssen Laktobazillen Sicherheitsanalysen unterzogen werden, die dem aktuellen Stand der Technik entsprechen [BERNARDEAU et al., 2008].
Der Nachweis eines einzeln vorhandenen Virulenzfaktors lässt noch keine Aussage über die Virulenz bzw. die Sicherheit des Mikroorganismus zu, da sich die Sicherheitsbewertung von Probiotika an der Sicherheitsbewertung von Pathogenen orientiert, und die Virulenz pathogener Organismen als Ergebnis eines komplexen Prozesses verstanden werden muss [HELLER, 2009].

Es gibt auch Situationen, bei denen der Einsatz von Probiotika grundsätzlich kontraindiziert ist, wie die niederländische Propatria (=Probiotics in Pancreatitis Trial)-Studie zeigt, an der 298 schwerkranke Pankreatitis-Patienten teilnahmen, und es in der Verum-Gruppe zu einer deutlich höheren Mortalität von 16% gegenüber der Placebo-Vergleichsgruppe mit 6% kam [BESSELINK et al., 2008]. BESSELINK et al. verweisen in ihrer Studie darauf, dass Probiotika speziell für schwer erkrankte Patienten keine harmlosen Nahrungsergänzungen darstellen.

MUÑOZ et al. (2005) berichten von drei Fällen, bei denen die Behandlung mit Probiotika als Auslöser einer Sepsis identifiziert werden konnte. Ein an Intensivpatienten verabreichtes Probiotikum (*Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*), welches in Europa für die Behandlung und Prävention *Clostridium difficile*-assoziierter Diarrhoe angewandt wird, konnte mittels DNA-Finger-

printing als sepsisauslösender Keim überführt werden, da die genetische Information mit der DNA der klinischen Isolate ident war. MUÑOZ et al. kommen in ihrer Studie ebenfalls zu dem Ergebnis, dass der Einsatz von Probiotika – speziell bei immunsupprimierten, schwerst kranken Patienten – sorgfältig, und neu überprüft bzw. hinterfragt werden sollte [MUÑOZ et al., 2005].

LAND et al. (2005) beschreiben eine Probiotika-induzierte *Lactobacillus*-Sepsis, welche bei einem sechs Wochen alten Säugling und einem sechs jährigen Mädchen im Zuge einer Therapie von Antibiotika-assoziierter Diarrhoe auftritt. Auch in diesem Fall gelingt mittels DNA-Fingerprinting bei beiden Patienten der Nachweis, dass die angewandten Probiotika-Stämme, sowie die klinischen *Lactobacillus*-Stämme ident sind [LAND et al., 2005].

2.2 Methoden zur Charakterisierung, Identifizierung und Differenzierung von Milchsäurebakterien

In den vergangenen Jahrzehnten fand eine Vielzahl unterschiedlichster Milchsäurebakterien-Stämme in einer breiten Palette von Nahrungs- bzw. Futtermitteln bei Mensch und Tier Verwendung [MOHANIA et al., 2008]. Die zuverlässige, exakte Identifizierung dieser Mikroorganismen auf Stammebene ist von besonderer Bedeutung, da sowohl deren gesundheitsrelevante/probiotische Wirkungen stammspezifisch stark variieren, als auch, um eine Qualitätskontrolle zugelassener Stämme und die Vermeidung gesundheitlicher Risiken zu gewährleisten, sowie darüber hinaus eine präzise Beschreibung neuer Stämme zu ermöglichen [MOHANIA et al., 2008; KNEIFEL und DOMIG, 2009].
In einer Studie von COEURET et al. (2004) wurden zehn kommerziell erhältliche, probiotische Produkte in Hinblick auf ihre fehlerfreie Etikettierung (Angabe von Gattung und Spezies, sowie in einigen Fällen die Anzahl spezifischer Stämme) untersucht: Fünf Produkte waren bezüglich der Anzahl der aufgelisteten Stämme, und drei hinsichtlich der Spezies falsch etikettiert; in vier Fällen konnten die angegebenen Stämme nicht detektiert werden. Da Sicherheit und Funktionalität stammabhängig sind, unterstreichen diese Ergebnisse die Signifi-

kanz einer akkuraten, validierten Identifizierung probiotischer Mikroorganismen, welche sowohl auf Spezies-, als auch auf Stammebene durchgeführt werden sollte, um nicht nur die Qualität der Produkte, sondern letztendlich auch vor allem den Schutz des Konsumenten zu gewährleisten [COEURET et al., 2004].

2.2.1 Phänotypische Methoden

Die Klassifizierung der Milchsäurebakterien erfolgte ursprünglich anhand ihrer phänotypischen Eigenschaften, wie z.B. Morphologie, Modus der Glukosefermentation, Wachstum bei unterschiedlichen Temperaturen, Konfiguration der Milchsäure, Fermentation verschiedener Kohlenhydrate, Analyse der Fettsäuremethylester (FAME), Proteinmuster der Zellwand bzw. löslicher Zellproteine [MOHANIA et al., 2008; GOLDBERG, 2002]. Die folgende Zusammenstellung liefert einen Überblick gebräuchlicher, phänotypischer Methoden:

- Proteinfingerprinting (Analyse der gesamt-löslichen, cytoplasmatischen Proteine; SDS-PAGE)
- Chromatographische Zellwandanalysen
- Motilitätsbestimmung
- Wachstum in NaCl
- Enzymatische Verfahren zur Ermittlung biochemischer Aktivitäten
- Antibiotika-Resistenzprofil (Antibiogramm)
- Resistenzverhalten gegenüber Chemotherapeutika
- Serotypisierung (Nachweis antigener Determinanten auf der Bakterienzelloberfläche)
- Multilocus-Enzym-Elektrophorese (Analyse der elektrophoretischen Mobilität bestimmter Enzyme; MLEE)

[WICHELHAUS et al., 2000; GOLDBERG, 2002; COEURET et al., 2003]

Bei der Phänotypisierung werden Bakterien aufgrund ihres Erscheinungsbildes oder ihrer biochemischen Reaktionen charakterisiert, doch bei veränderten bakteriellen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Mediumzusätze, pH-Wert) werden Genprodukte häufig variabel exprimiert. In der Folge kann es zur Ver-

änderung des Phänotyps kommen, worin auch gleichzeitig der generelle Nachteil dieser Art der Bakterien-Typisierung liegt [WICHELHAUS et al., 2000].

Phänotypische Methoden weisen inhärente Einschränkungen, wie mangelhafte Reproduzierbarkeit, Ambiguität einiger Techniken (welche überwiegend auf die Plastizität des Bakterienwachstums zurückzuführen sind), umfangreiche Logistik großangelegter Untersuchungen, sowie insuffizientes diskriminatives Potential, auf [MOHANIA et al., 2008; TEMMERMAN et al., 2004].

Studien, welche auf Vergleichen der 16S rRNA Sequenzdaten basieren, zeigten, dass einige Taxa, welche anhand phänotypischer Merkmale generiert worden waren, nicht mit den vorgeschlagenen phylogenetischen Verhältnissen korrespondierten. Dementsprechend sind nicht alle Spezies ausschließlich mit Hilfe phänotypischer Eigenschaften differenzierbar [HOLZAPFEL et al., 2001]. Dies trifft insbesondere auf die sogenannte *Lactobacillus acidophilus*-Gruppe, *Lb. casei* und *Lb. paracasei*-Gruppe, sowie auf die *Lb. plantarum*-Gruppe, zu [COEURET et al., 2003; HOLZAPFEL et al., 2001; TEMMERMAN et al., 2004]. Der exklusive Einsatz traditioneller, mikrobiologischer Methoden (morphologisch, physiologisch und biochemisch) zur Klassifizierung von Mikroorganismen resultiert in einem unklaren Bild über deren taxonomische Stellung; daher wird ein sogenannter Mehrphasenansatz („*polyphasic approach*“) favorisiert, welcher genotypische, chemotaxonomische und phänotypische Methoden im Kollektiv zur weiteren Abklärung des taxonomischen Status’ anwendet [PRAKASH et al., 2007; SCHLEIFER, 2009].
Da unterschiedliche Methoden sowohl unterschiedliche Aussagekraft, als auch Differenzierungsgrad besitzen, ist es somit sinnvoll, die erhaltenen Ergebnisse der verschiedenartigen Techniken zur möglichst akkuraten Identifizierung zu kombinieren. Eine Unterscheidung der Mikroorganismen erfolgt vorwiegend anhand genetischer Daten, welche die Zuordnung zu typischen Clustern gestatten, wobei jedoch auch einheitliche phänotypische Variationen berücksichtigt werden [KNEIFEL und DOMIG, 2009; FELIS und DELLAGLIO, 2007; TEMMERMAN et al., 2004].

2.2.2 Genotypische Methoden

Viele unterschiedliche, genotypische Techniken werden entweder zur Identifizierung von Milchsäurebakterien auf Speziesebene, oder zur Differenzierung dieser Mikroorganismen auf Stammebene eingesetzt. Die Hauptvorteile der DNA-basierten Typisierungsmethoden liegen in ihrem diskriminativen Potential und ihren vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten [MOHANIA et al., 2008]; allerdings muss die Anwendbarkeit für jede Fragestellung geprüft, und gegebenenfalls angepasst werden [GOLDBERG, 2002]. Gegenüber phänotypischen Untersuchungstechniken besitzen sie weiters den Vorteil, dass spezifische Merkmale beim Zielorganismus nicht exprimiert werden müssen [GOLDBERG, 2002].

Eng verwandte Stämme mit ähnlichen phänotypischen Eigenschaften lassen sich durch Einsatz genotypischer Methoden zuverlässig differenzieren [MOHANIA et al., 2008]. Zwar spielen klassisch-phänotypische Methoden (sog. *Biotyping*) bei der täglichen Routine-Analytik noch immer eine wichtige Rolle, allerdings haben genotypische Methoden bei der eingehenden Charakterisierung bzw. Differenzierung von Mikroorganismen zunehmend an Bedeutung gewonnen. Wie schon in *Kapitel 2.2.1* erwähnt, basiert die gegenwärtige Bakterientaxonomie im Sinne des „*polyphasic approach*“ auf einer Kombination phäno- und genotypischer Daten, welche ein zuverlässiges Konzept zur Identifizierung bzw. Charakterisierung von Bakterienstämmen darstellt [COPPOLA et al., 2008].

Genetische Typisierungstechniken können in verschiedene Kategorien mit unterschiedlicher taxonomischer Auflösung eingeteilt werden: Restriktions-Fragment-Längen-Poly-morphismus (RFLP)-Analyse der genomischen DNA, PCR-basierte Techniken und sonstige diverse Methoden, wie Plasmid-Profiling oder DNA-Sequenzierung [GIRAFFA und CARMINATI, 2008].

Der folgende Abschnitt liefert einen Überblick einiger, relevanter Methoden, welche bei der Typisierung Lebensmittel-assoziierter Milchsäurebakterien Verwendung finden.

- DNA-DNA-Hybridisierung
- 16S rRNA-Gensequenzierung
- Plasmid-Profiling
- Restriktionsendonuclease-Analyse (REA) chromosomaler DNA
- Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)
- Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)
- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)
- Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE)
- Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR
- PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)
- PCR basierend auf repetitiven chromosomalen Elementen (Rep-PCR)
- Amplifizierter Fragment-Längen-Polymorphismus (AFLP)
- PCR mit speziesspezifischen Primern

[WICHELHAUS et al., 2000; BIBILONI et al, 2008; KNEIFEL und DOMIG, 2009]

Eng verwandte Stämme können mit Hilfe sogenannter *DNA-Fingerprint-Verfahren*, wie z.B. der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR, Ribotypisierung, Restriktionsenzym-Analyse (REA) oder dem Plasmid-Profiling unterschieden werden [DONOHUE, 2004].

Im folgenden Teil werden nur die im Rahmen dieser Diplomarbeit verwendeten Methoden genauer beschrieben.

Grundlagen der PCR (Polymerase Chain Reaction)

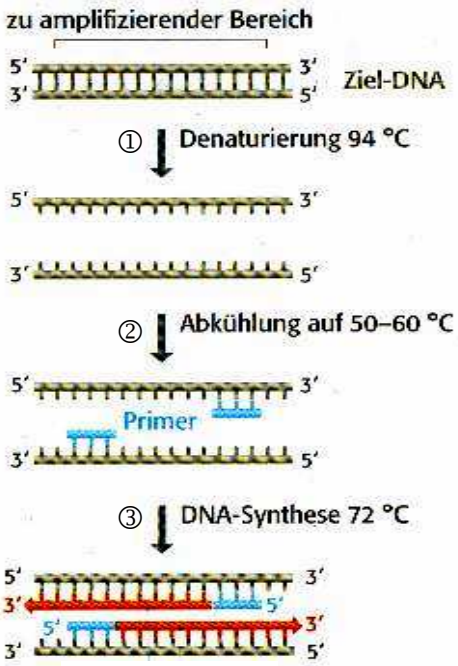
Im Jahr 1985 revolutionierte der Biochemiker Kary Mullis mit der Erfindung der Polymerasekettenreaktion die Molekularbiologie, wofür er 1993 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Die PCR dient der selektiven Replikation eines gewünschten Genfragmentes, um dieses in weiterer Folge der Klonierung bzw. Sequenzierung zugänglich zu machen, oder zum Nachweis der Anwesenheit einer bekannten Nucleinsäuresequenz. Prinzipiell kann jede (unbekannte) DNA-Sequenz zur Amplifikation ausgewählt werden, sofern die flankierenden Endsequenzen (Anheftungsstellen) dieser Template-DNA bekannt sind, damit zwei

geeignete Oligonucleotide (Primer) synthetisiert werden können, welche jeweils mit einem Einzelstrang-Ende der Ziel-DNA hybridisieren. Das Reaktionsgemisch des Amplifikationsansatzes setzt sich außer der DNA-Matrize und dem Primerpaar aus der gereinigten thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase (des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus*) und den vier Desoxyribonucleosidtriphosphaten (dNTPs) zusammen. Da sich die PCR durch eine hochgradige Sensitivität auszeichnet (theoretisch reicht bereits ein einziges Startmolekül), kann die Menge der Template-DNA sehr klein sein (wenige Nanogramm Ziel-DNA resultieren am Ende der PCR in einigen Mikrogramm PCR-Produkt). Im Gegensatz zum Klonieren findet die PCR in einem Probengefäß, welches sich in einem programmierbaren Thermocycler befindet, statt, und erfordert keine lebenden Zellen. Ein Zyklus der PCR ist in drei Schritte gegliedert:

① *Denaturierung:* Beim ersten Schritt wird das Reaktionsgemisch auf 94℃ erhitzt, und die Doppelhelix der Ziel-DNA durch Lösen der Wasserstoffbrücken zu *zwei Einzelstrangmolekülen* denaturiert

② *Annealing:* schnelle Temperaturreduktion auf 50-60℃ bewirkt eine *Hybridisierung* der Primer an die Endsequenzen (3'-Ende) der Template-DNA. Aufgrund des hohen Primer-Überschusses wird eine allfällige Rückbildung zur Doppelhelix der Ziel-DNA auf ein Minimum begrenzt

Abb. 2.2.2-1 Der erste Zyklus einer PCR.

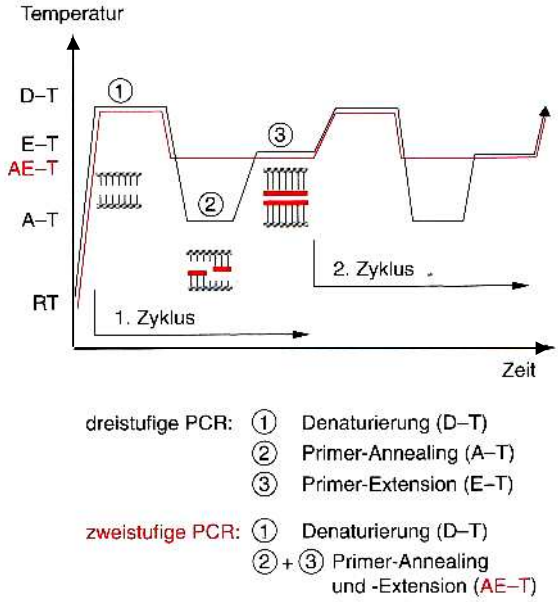


[QUELLE: BROWN, 2007; modifiziert]

③ *Extension:* Die Temperatur von 72℃ entspricht dem Optimum der *Taq*-DNA-Polymerase, welche die beiden Primer in Richtung der Zielsequenz verlängert (die *DNA-Synthese* erfolgt durchwegs von 5' nach 3' an beiden Strängen)

Im Regelfall werden 25 bis 35 solcher Amplifizierungszyklen nacheinander durchgeführt, wobei nur die Temperatur der Reaktionsmischung verändert werden muss. Alle folgenden Zyklen amplifizieren die Zielsequenz exponentiell, und nach n-Zyklen wurde die Sequenz im Idealfall um das 2^n-Fache amplifiziert.

Abb. 2.2.2-2 Temperatur/Zeit-Profil der zwei- bzw. dreistufigen PCR.



[QUELLE: LOTTSPEICH und ENGELS, 2006

Abb. 2.2.2-2 stellt die drei unterschiedlichen Temperaturstufen einer typischen PCR dar, wobei die Denaturierung der DNA in Schritt ① zu Beginn ca. 5-10 min beträgt, da die DNA noch in relativ komplexer Form vorliegt. In Schritt ② wird der Reaktionsansatz auf eine durch die Primer festgelegte Temperatur reduziert. Schritt ② und Schritt ③ betragen im Normalfall etwa eine Minute, bei sehr großen PCR-Produkten (>1000 bp) wird die *Extension*-Zeit entsprechend verlängert, um sicherzustellen, dass der komplette Strang synthetisiert ist (da bei den anschließenden Amplifikationszyklen nur vollständig synthetisierte DNA-Stränge als Template zur Verfügung stehen). Ab dem zweiten Zyklus reichen weniger als eine Minute zur Denaturierung, da nur die neu entstandenen Sequenzen doppelsträngig vorliegen sollten. Bei der zweistufigen PCR werden *annealing* und *extension* zu einem Reaktionsschritt vereint, welcher zumeist bei 72℃ stattfindet. Weitere, den Erfolg einer PCR beei nflussende Faktoren stellen die Auswahl geeigneter Primer und DNA-Polymerasen (mit/ohne *proof-reading*-Aktivität), die Pufferbedingungen (je nach verwendeter Polymerase; mit oder ohne Zusatz von $MgCl_2$, DMSO, BSA, usw.), die Konzentration der vier Desoxynucleotidtriphosphate, sowie Qualität und Menge der Template-DNA, dar. [BROWN, 2006; SCHMID, 2006; LOTTSPEICH und ENGELS, 2006; BROWN, 2007; JANSOHN, 2007; BERG et al., 2007]

2.2.2.1 Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR

Die häufig eingesetzte Technik der RAPD-PCR verbindet die Vorzüge von DNA-Fingerprinting mit denen der PCR und wurde von WILLIAMS et al. (1990) als einfache, kostengünstige und schnell durchführbare genotypische Methode zur Unterscheidung verschiedenartiger Organismen vorgeschlagen. Ein weiterer, entscheidender Vorteil ist, dass die genomische Basensequenz des zu untersuchenden Stammes nicht bekannt sein muss [PACK, 1997]. Wie bei anderen Methoden üblich, wird kein spezifisches Primerpaar zur Erzeugung genau definierter Fragmente verwendet, sondern mit nur einem einzelnen Zufallsprimer, der aus 10-12 bp besteht, eine Hybridisierung im low-strigency-Bereich forciert (das RAPD-PCR-Verfahren kann allerdings auch *mit zwei* zufällig gewählten Oligonucleotiden durchgeführt werden). Für eine Hybridisierung des Primers an nicht vollständig komplementäre Sequenzen muss die Annealingtemperatur auf unter 40 °C gesenkt werden. Entsprechend der Basensequenz des Primers erfolgt je nach Komplementarität die Amplifizierung der zufälligen Segmente der jeweiligen Bakterien-DNA mit unterschiedlichen Bindungskräften [HOELZEL und GREEN, 1998; MÜLHARDT, 2009; NICHOLL, 2002; PIEHL, 1995]. Der Primer bindet am DNA-Einzelstrang an mehreren, gegenläufig orientierten Stellen, die nicht zu weit auseinander liegen dürfen [PACK, 1997]. Die Stringenz aller nachfolgenden PCR-Zyklen wird bei zunehmender Komplementarität der Amplikons zum Primer erhöht, um nur noch die Fragmente der „besten unscharfen Paarungen“ zu amplifizieren [NEWTON und GRAHAM, 1994; NICHOLL, 2002]. Polymorphismen zwischen Bakterienstämmen resultieren aus Differenzen in der DNA-Sequenz, welche die Primerbindung blockieren oder die Amplifikation beeinträchtigen. Somit können vorhandene Stammdifferenzen einfach durch eine Verstärkung entsprechender DNA-Fragmente detektiert werden [MICHELI et al., 1997]. Die Amplifikate der jeweils zu vergleichenden DNA-Genome ergeben unter Zuhilfenahme der Gelelektrophorese Bandenspektren („Fingerprints“), die umso ähnlicher sind, je enger das Verwandschaftsverhältnis zweier Genome untereinander ist. Bei beinahe gleichen, jedoch nicht identischen Bakterienstämmen ist zur weiteren Differenzierung der Einsatz zusätzlicher Zufallsprimer angebracht [PIEHL, 1995].

2.2.2.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Bei dem Versuch, hochmolekulare Nucleinsäuren (> 20 kb) mit konventioneller Elektrophorese zu trennen, richten sich die DNA-Moleküle der Länge nach aus, und da bei allen Molekülen die Wanderung mit der gleichen, limitierenden Mobilität (*limiting mobility*) stattfindet, kommt es zu keiner Auftrennung [LOTTSPEICH und ENGELS, 2006; WESTERMEIER, 1990].

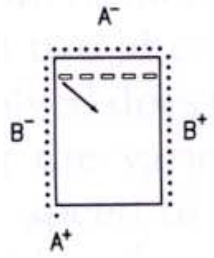
Hier wird nun die 1984 erstmals von Schwartz und Cantor beschriebene Variation der Agarose-Gelelektrophorese – die Pulsfeld-Gelelektrophorese – relevant: Das konstante, elektrische Feld der herkömmlichen Elektrophorese wird gegen ein multidirektionales, elektrisches Spannungsfeld mit häufig alternierendem (gepulstem) Richtungswechsel getauscht [GORLIER, 2002; JANSOHN, 2007; LOTTSPEICH und ENGELS, 2006].
Die Nucleinsäuren sind bei dieser Methode in zwei Konformationen präsent:
Bei abgeschaltetem elektrischen Feld liegen die DNA-Moleküle in freier Lösung, und somit in relaxierter, globulärer (gestauchter) Form vor, bei angelegtem elektrischen Feld erfolgt die Ausrichtung der Moleküle nach der *Reptationstheorie* (siehe *Kapitel 3.5.1*) entlang des Feldes (die Helixstruktur wird dabei gestreckt), und es kommt zu einer Wanderung in Richtung Anode. Wird nun die Orientierung des elektrischen Feldes gewechselt, so relaxiert das Molekül zunächst, und richtet sich anschließend in Richtung des neuen Feldes aus. Die Dauer der Relaxation und Reorientierung steht dabei in proportionalem Zusammenhang zur Molekülgröße: Größere Moleküle benötigen mehr Zeit zur Relaxation (*viskoelastische Relaxationszeit*) und erneuten Orientierung, und haben daher in der gegebenen Pulsdauer weniger Zeit für die eigentliche elektrophoretische Wanderung in Richtung des elektrischen Feldes, als kleinere DNA-Moleküle [LOTTSPEICH und ENGELS, 2006, RICHTER, 2003].
Die resultierende elektrophoretische Mobilität ist demnach von der Pulszeit bzw. der jeweiligen Dauer des elektrischen Feldes abhängig, wobei eine Auftrennung nach Molekülgröße bis zu einer Größenordnung von 10 Megabasen erreicht wird. Bei längeren Pulszeiten werden größere DNA-Fragmente besser aufgetrennt, bei kürzeren Zeiten die kleineren Fragmente [WESTERMEIER, 1990].

Verschiedene Techniken werden unter dem Begriff „Pulsfeld-Gelelektrophorese“ subsumiert, die sowohl für analytische, als auch präparative Trennungen eingesetzt werden, und deren Unterschiede vor allem in Richtung und Sequenz der einzelnen Pulse liegen [GORLIER, 2002; LOTTSPEICH und ENGELS, 2006]. Um den Rahmen dieser Arbeit nicht zu sprengen, soll im Folgenden nur kurz auf einige ausgewählte Methoden eingegangen werden:

◈ ***P**ulsed **F**ield Gradient **G**el **E**lectrophoresis (PFGE)*

Schwartz und Cantor entwickeln diese Technik im Jahr 1984, bei der zwei alternierend elektrische Felder zum Einsatz kommen. Die Felder (ein homogenes und ein inhomogenes) werden durch voneinander unabhängig spannungsvernetzte Punkt-Elektroden gebildet. Durch die nacheinander alternierende Wirkung der X- und Y-Reihen entsteht eine diagonale Auftrennung. Hefechromosomen *(Saccharomyces cerevisiae)* mit einer Molekülgröße >240 kb konnten mit dieser Methode erstmals aufgetrennt werden, was einen enormen technischen Durchbruch bedeutete, da der Auftrennungsbereich der Gelelektrophorese auf das 40-fache angehoben wurde [GORLIER, 2002; BIRREN und LAI, 1993].

Abb. 2.2.2.2-1 Schemadiagramm der PFGE



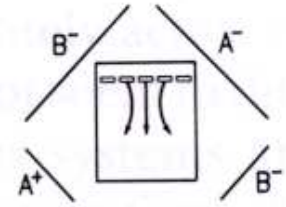
[QUELLE: BIRREN und LAI, 1993]

◈ ***O**rthogonal **F**ield **A**lternation **G**el **E**lectrophoresis (OFAGE)*

Carle und Olson beschreiben 1984 eine Variante, bei der zwei inhomogene Felder verwendet werden. Da uneinheitliche elektrische Felder, sowie eine über das Gel variiernde Feldgeometrie zur Anwendung kommen, weisen gleichgroße DNA-Moleküle – abhängig von der Lokalisation im Gel – unterschiedliche Wanderungseigenschaften auf. Die Molekülbewegung

erfolgt dementsprechend entlang einer gekrümmten Bahn. Feldstärke und Reorientierungswinkel schwanken, daher ist der Vergleich der Bandenspektren sowie die Größenbestimmung der verdauten genomischen DNA schwierig. Auch die Optimierung der Laufbedingungen sowie die Reproduzierbarkeit der Auftrennung zwischen den einzelnen Labors erweist sich aufgrund der uneinheitlichen elektrischen Felder als äußerst kompliziert [GORLIER, 2002; BIRREN und LAI, 1993].

Abb. 2.2.2.2-2 Schemadiagramm der OFAGE



[QUELLE: BIRREN und LAI, 1993]

◈ ***Field Inversion Gel Electrophoresis (FIGE)***

Bei der 1986 von Carle et al. eingeführten Technik unterscheiden sich die beiden angelegten Felder in ihrer Orientierung um 180°, wobei sich das vorwärts gerichtete Feld entweder durch eine höhere Stärke des elektrischen Feldes, oder eine längere Pulsdauer (das Verhältnis von vorwärtsgerichteter zu gegenläufiger Zeit ist meist 3 : 1) auszeichnet, um die Netto-Wanderung der Nucleinsäuren in eine einheitliche Richtung (zur Anode) zu gewährleisten.

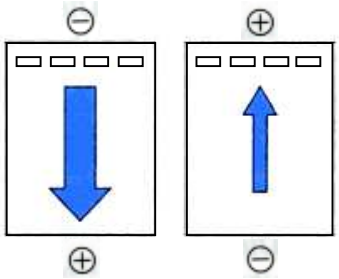


Abb. 2.2.2.2-3 Prinzip der Feldinversionsgelelektrophorese (FIGE).
In alternierender Reihenfolge werden zwei um 180 ° versetzte elektrische Felder angelegt. Die Wanderrichtung zur Anode wird durch einen längeren oder stärkeren Puls in dieser Richtung festgelegt.

[QUELLE: RICHTER, 2003]

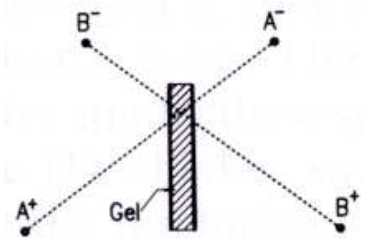
Da die Moleküle einen Großteil der Zeit rückwärts laufen, entstehen sehr lange Trennzeiten, außerdem kann mitunter Bandeninversion auftreteten, wenn größere DNA-Fragmente schneller als kleinere wandern. Die Größenbestimmung der DNA ist dadurch erschwert; dieser Umstand kann jedoch mit

der Auswahl adäquater Pulssequenzen (ansteigende Pulslängen, *ramping*) vermieden werden. Der Vorteil dieser Methode liegt in einer Auftrennung von DNA-Molekülen über einen sehr weiten Größenbereich oder der sehr hohen Auflösung eines relativ begrenzten Größenbereichs [FINNEY, 1998; GORLIER, 2002; LOTTSPEICH und ENGELS, 2006; RICHTER, 2003].

◈ ***T**ransverse **A**lternating **F**ield **E**lectrophoresis (TAFE)*

Gardiner et al. modifizieren 1986 Schwartz's PFGE-Konzept, indem sie das elektrische Feld schräg verlaufend zum Gel positionieren. Seit der Verwendung homogener elektrischer Felder über die gesamte Gelbreite, können die charakteristisch gebogenen Auftrennungsbanden vermieden werden, doch die Reorientierungswinkel der elektrischen Felder durch das Gel sind beim TAFE-System nicht konstant: Der Winkel zwischen den elektrischen Feldern variiert vom Gelanfang mit 115° bis zum Gelende mit rund 165°. Daher wandern die Moleküle nicht mit gleich bleibender Geschwindigkeit durch das Gel, und es kommt zum sogenannten „Bandenstacking", d.h. einer ungewollten Aufstapelung der DNA-Fragmente, gekoppelt mit einer verminderten Auflösung gegen Gelende, da die kleinsten Fragmente durch ansteigende Reorientierungswinkel abgebremst werden [BIRREN und LAI, 1993].

Abb. 2.2.2.2-4 Schemadiagramm der TAFE. In der Mitte eines aquarium-ähnlichen Puffertanks befindet sich das aufrecht stehende Gel, zwischen zwei links und rechts, oberhalb und unterhalb des Gels befindlichen Elektrodenpaaren, die sich diagonal gegenüber stehen, wird das elektrische Feld hin- und hergeschaltet. [QUELLE: WESTERMEIER, 1990]



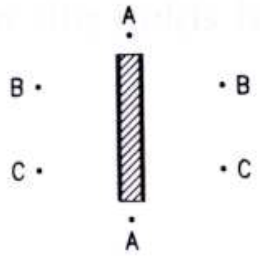
[QUELLE: BIRREN und LAI, 1993]

◈ ***S**imultaneous **T**angential/**R**ectangular **I**nversion **D**ecussate **E**lectrophoresis*

Diese Methode wird von Kolbe und Sim 1991 als Modifikation des TAFE-Systems entwickelt. Durch ein additiv angebrachtes Elektrodenpaar in Gelebene besitzt man nun die Möglichkeit, den Reorientierungswinkel zu verändern – das auf das Gel wirkende elektrische Feld setzt sich somit aus

dem vertikalen und den horizontalen Feldern zusammen. Bei Veränderung des Verhältnisses der Spannungspotentiale zwischen vertikalem und horizontalen Feldern, kann der Winkel des resultierenden elektrischen Feldes gegenüber dem Gel verändert werden. Durch die veränderte Geometrie der Elektroden soll das von der TAFE bekannte Bandenstacking gegen Gelende auf ein Minimum reduziert werden [BIRREN und LAI, 1993].

Abb. 2.2.2.2-5 Schemadiagramm der ST/RIDE

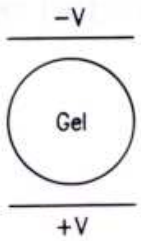


[QUELLE: BIRREN und LAI, 1993]

◈ *Crossed-Field, Rotating Electric Field und **R**otating **G**el **E**lectrophoresis*

Um eine periodisch wechselnde Orientierung des elektrischen Feldes, das auf die DNA wirkt, zu erhalten, können nun nicht nur alternierende Felder, sondern auch ein regelmäßig rotierendes Gel innerhalb eines konstanten (homogenen) elektrischen Feldes (Southern et al., 1987), eingesetzt werden. DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe können mittels angepasster Rotationsfrequenz des Gels getrennt werden. Zusätzlich kann man den Reorientierungswinkel leicht durch eine Veränderung des Rotationswinkels variieren. Wie von Birren et al. 1988 demonstriert, ist der Reorientierungs-winkel einer der Parameter, der bei Variation schnellere Auftrennungen ohne Auflösungsverlust erlaubt. Die Nachteile der Crossed-Field- und RGE-Systeme liegen in ihrem Unvermögen, die Feldorientierung schnell zu wechseln und in ihren langen Laufzeiten infolge der rotationsbedingten Totzeit [BIRREN und LAI, 1993].

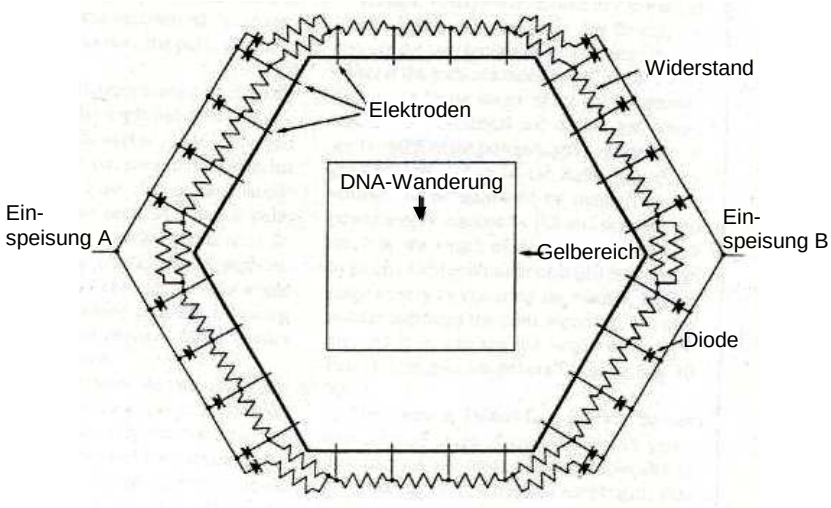
Abb. 2.2.2.2-6 Schemadiagramm der RGE.



[QUELLE: BIRREN und LAI, 1993]

◈ ***C**ontour-Clamped **H**omogeneous **E**lectric **F**ield (CHEF)*

1986 erkennen Chu et al., dass man nur bei Verwendung *homogener* elektrischer Felder gerade Bandenspuren erhält. Zur Erzeugung dieser Felder werden die Elektroden hexagonal um das Gel herum angeordnet, und die Versorgungsspannung so unter den Elektroden aufgeteilt, dass der gebildete Spannungsgradient an jeder Stelle des Gels konstant ist [BIRREN und LAI, 1993].

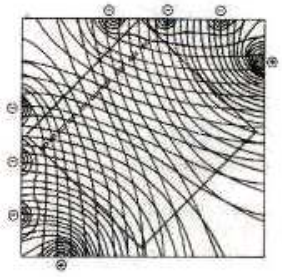


[QUELLE: FINNEY, 1998]

Abb. 2.2.2.2-7 Schaltungsanordnung eines CHEF Spannungsteilers. Die Position der 24 Elektroden sowie die resultierende Richtung der DNA-Wanderung werden schematisch dargestellt. Die Elektroden sind mit Dioden bestückt, um unerwünschte Feldausreißer zu reduzieren [FINNEY, 1998; GE HEALTHCARE, 2006].

Bei quadratischer Elektroden-Anordnung führt der 90-grädige Reorientierungswinkel zu keiner Auftrennung, daher müssen die Elektroden im stumpfen Winkel formiert sein [BIRREN und LAI, 1993].

Von der Probe aus gesehen, sollen die elektrischen Felder mindestens einen Winkel von 110° zueinander haben. Diese Bedingung wir d beispielsweise durch inhomogene Felder mit punktförmigen Elektroden auf rechteckigen Schienen (*Abbildung 2.2.2.2-8*) oder in hexagonaler Positionierung (*Abbildung 2.2.2.2-9*) erreicht [JANSOHN, 2007].



[QUELLE: WESTERMEIER, 1990]

Abb. 2.2.2.2-8 Zweifach inhomogene Felder bei rechtwinklig angeordneten Punkt-Elektroden

Einer der Hauptvorteile der CHEF-Methode besteht in der Fähigkeit, eine große Anzahl an DNA-Proben in geradlinigen Spuren aufzutrennen. Durch die Beschaffenheit des verwendeten elektronischen Schaltkreises kann die originale CHEF-Methode nur homogene Felder mit einem fixen Reorientierungswinkel (entweder 60° oder 120°) generieren. Durch eine veränderte elektronische Schaltung kann dieser Winkel variiert werden [BIRREN und LAI, 1993].

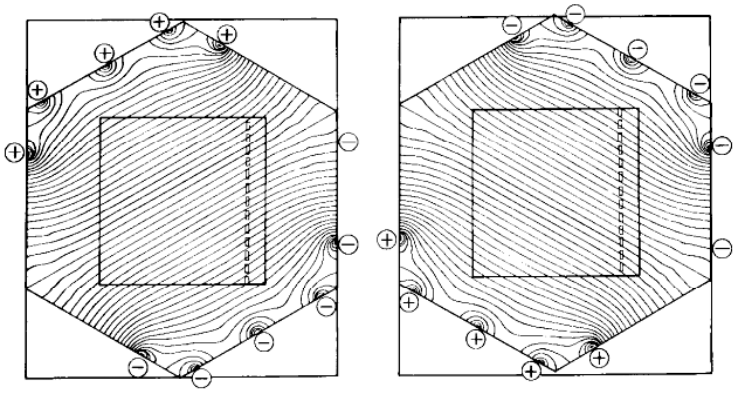


Abb. 2.2.2.2-9
Homogene Feldlinien bei zwei unterschiedlich angelegten Feldern unter Verwendung hexagonal angeordneter Punkt-Elektroden.
Links: Nord/Süd-Feld
Rechts: Ost/West-Feld

[QUELLE: GE HEALTHCARE, 2006

Mit einem Kontrollgerät wird das elektrische Feld zwischen zwei gegenüberliegenden Elektroden angelegt. Die Nucleinsäuren wandern im Zick-Zack-Kurs, da die Richtungen der elektrischen Feldvektoren jeweils um +60° bzw. –60° gegenüber der vertikalen Gelachse verschoben sind.

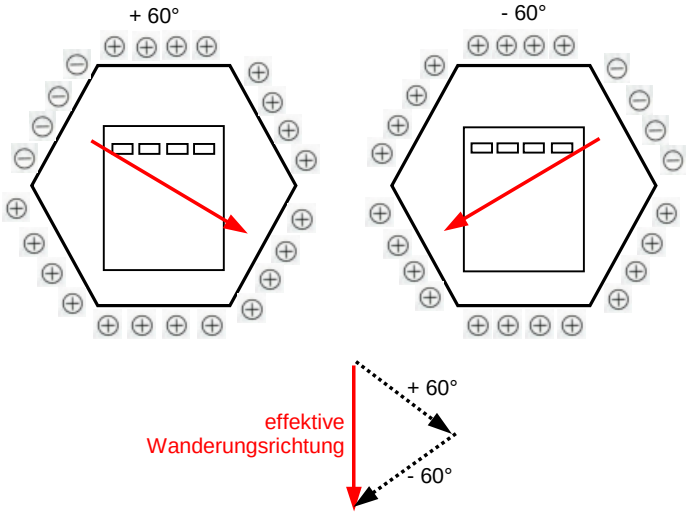


Abb. 2.2.2.2-10
Prinzip der Contour-Clamped Homogeneous Electric Field-Elektrophorese (CHEF).
Die Pulse werden in verschiedenen Richtungen angelegt.
Aus der Summe der Feldvektoren aller angelegten elektrischen Felder ergibt sich die Bewegungsrichtung der DNA-Moleküle im Zick-Zack-Kurs

[QUELLE: LOTTSPEICH und ENGELS, 2006; modifiziert]

Eine Veränderung des elektrischen Feldes ist durch Variation der Vektorwinkel sowie der Pulsdauer und -stärke möglich [GORLIER, 2002; LOTTSPEICH und ENGELS, 2006].

Anhand der nachstehend angeführten empirischen Formel lassen sich für die *CHEF-Methode* die anzulegende Spannung, einzustellende Pulszeiten sowie Laufzeiten und Trennleistung ableiten:

Maximale aufgelöste DNA-Größe [kb] $0{,}034 \times (T + 40) \times V^{1,1} \times (3 - A)^{0,6} \times t^{0,875}$

Minimale aufgelöste DNA-Größe [kb] 0,75 x maximale Größe

Laufgeschwindigkeit eines 10-kb-Fragmentes [cm/h]

$$\frac{0{,}0012 \times (T + 25) \times V^{1,6} \times \cos(\theta/2)}{A}$$

T : Temperatur [℃]

V : Feldstärke [V x cm^{-1}]

A: % Agarose (mit 0,8 multiplizieren, falls *pulsed-field-grade*-Agarose verwendet wird)

t: Pulszeit [s]

θ: Reorientierungswinkel

Die Gleichung bezieht sich auf 0,5 x TBE-Puffer ; falls GTBE- oder TAE-Puffer im Lauf verwendet wird, sind die aufgetrennten Molekülgrößen etwas größer und das Gel läuft ca. 20% bzw. 30% schneller [FINNEY, 1998; JANSOHN, 2007].

Die Probenvorbereitung inklusive Zellaufschluss und Restriktion erfolgt in den Agaroseblöckchen (sog. Inserts) *in situ*, da die großen DNA-Moleküle beim Pipettieren durch die Scherkräfte brechen würden. Die Agarosematrix schützt die eingebettete DNA vor Scherkräften und ermöglicht ferner eine einfache Bearbeitung der Proben. Die Inserts werden danach in vorgeformte Geltaschen eingesetzt [BIO-RAD, 1995; JANSOHN, 2007; WESTERMEIER, 1990].

Ein homogenes Laufverhalten sowie ein gleichmäßig temperierter Elektrophoreseansatz werden durch den Einsatz einer Peristaltikpumpe, die für einen ständig zirkulierenden Puffer sorgt, erreicht.

Die Wahl der optimalen (Kühl-)Temperatur hängt von der Molekülgröße ab:
Im vorgegebenen Zeitabschnitt werden bei 30℃ größere Moleküle besser aufgetrennt als bei 10℃. Beim Einsatz erhöhter Feldst ärken im Vergleich zur konventionellen Agarosegel-Elelektrophorese, ist ein Puffer mit geringerer Leitfähigkeit (beispielsweise 0,5 x TBE-Puffer) erforderlich, damit sich die Wärmeentwicklung während der Elektrophorese auf ein Minimum beschränkt. [JANSOHN, 2007; LOTTSPEICH und ENGELS, 2006].

Für die Auftrennung sehr großer DNA-Fragmente (>2000 kb) ist es wichtig, die Spannung entsprechend zu veringern, die Lauf- und Pulszeit wird im Allgemeinen erhöht.

Tab. 2-9 Allgemein übliche Laufparameter

Size (Mb)	0.01-0.05	<0.1	0.1-2	2-6	6-12
% agarose	1.2	1.2	1.2	0.6*	0.6*
Buffer (xTBE)	0.15	0.15/0.5	0.5	0.5	0.50
Temperature/°C - in MultiTemp II (set value)	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
- in elpho. unit	12-14	12-14	12-14	12-14	12-14
Voltage/V (HEX)	450	ca 300	165-200	40-100	25-50
Voltage (point)	450	ca 370	300-330	60-100	ca 30
Pulse time (s)	0.3-1.0	1-10	10-120	3-75 (min)	50-100 (min)
Run times (h)	1-4	1-6	17-24	24h-3 days	3-6 (days)

* mit 0,6 % Agarose erfolgt eine schnellere Auftrennung auf Kosten der Auflösung
[QUELLE: GE HEALTHCARE, 2006]

Für jede Probengröße kann die optimale Spannung in *Tab. 2-9* abgelesen werden.
Bei der Auswahl einer bestimmten Pulszeit werden die Moleküle, die kleiner oder größer als der gewählte Auflösungsbereich („resolution window“) sind, nicht ideal aufgelöst.
Der gewählte Auflösungsbereich ist eine Funktion der Feldstärke, des Stromes und der Pulszeit

Tabelle 2-9 zeigt eine Zusammenstellung der empfohlenen Parameter. Für Moleküle, die kleiner als 100 kb Größe sind, können problemlos höhere Spannungen verwendet werden [GE HEALTHCARE, 2006].

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Bakterienstämme

Im Rahmen der Diplomarbeit wurden verschiedene Spezies der Gattung *Lactobacillus* unter Verwendung bestimmter molekularbiologischer Methoden differenziert, identifiziert und mit den jeweils zugehörigen Typstämmen verglichen.

3.1.1 Typstämme

Die Typstämme, die zur Charakterisierung der unterschiedlichen Isolate verwendet wurden, stammen vom externen Auftraggeber Lactosan bzw. aus der institutseigenen Sammlung der Abteilung Lebensmittelchemie der Universität für Bodenkultur Wien. Der Typstamm stellt die taxonomische Grundlage für eine Spezies – und oft auch für ein ganzes Genus – dar [REUTER, 2009].
In *Tabelle 3-1* wurde die institutsinterne Codierung, Herkunft und Bezeichnung vom Verfasser dieser Arbeit übernommen.

Tab. 3-1 Zusammenstellung der verwendeten Typstämme

Code	Gattung	Spezies	Subspezies	Herkunft	Bezeichnung
Lb 32^{T}	*Lactobacillus*	*buchneri*	–	DSMZ	DSM 20057 ATCC 4005
Lb 92^{T}	*Lactobacillus*	*sakei*	*sakei*	DSMZ	DSM 20017 ATCC 15521
LAC 727	*Lactobacillus*	*buchneri*	–	Lactosan	–

3.1.2 Lactobacillus-Isolate

Lactobacillen sind grampositive, nicht sporulierende, unbewegliche aerotolerante Anaerobier, die zumeist stäbchenförmig sind, und eine Neigung zur Kettenbildung aufweisen. Ihren Namen verdanken sie der Fähigkeit, aus Kohlenhydraten Milchsäure zu produzieren, somit sind sie selbst säuretolerant, und vermögen in einem für viele andere anaerobe Bakterien schon lebensfeindlichen Milieu zu überleben [BLASCHEK et al., 1998; TERNES et al., 2007].

Folgende *Lactobacillus-Isolate* sollten nun sowohl in Hinblick auf Differenz bzw. Identität untereinander, als auch zu den Typstämmen geprüft werden:

Tab. 3-2 Zusammenstellung der zu prüfenden *Lactobacillus*-Isolate

Versuchsreihe	Stamm	Bezeichnung	Herkunft
1(A)	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905	Lactosan
1(A)	*Lactobacillus buchneri*	A 39	Lactosan
1(A)	*Lactobacillus buchneri*	A 99	Lactosan
1(A)	*Lactobacillus buchneri*	A 100	Lactosan
1(A)	*Lactobacillus buchneri*	A 155	Lactosan
1(N)	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905	Lactosan
1(N)	*Lactobacillus buchneri*	A 39	Lactosan
1(N)	*Lactobacillus buchneri*	A 99	Lactosan
1(N)	*Lactobacillus buchneri*	A 100-1	Lactosan
1(N)	*Lactobacillus buchneri*	A 100-1*	Lactosan
1(N)	*Lactobacillus buchneri*	A 155	Lactosan
2	*Lactobacillus sakei*	LAC 812	Lactosan
2	*Lactobacillus sakei*	LAC 921	Lactosan
2	*Lactobacillus sakei*	LAC 945	Lactosan
2	*Lactobacillus sakei*	BS 1	Lactosan
2	*Lactobacillus sakei*	GW 2	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 1	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 3	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 4	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 5	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 6	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 7	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 9	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 10	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 11	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 12	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 13	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 14	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 15	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 16	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 17	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 18	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 19	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 20	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 21	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 22	Lactosan
3	*Lactobacillus buchneri*	LAC 905 23	Lactosan

Tabelle 3-2 zeigt eine Zusammenstellung der zu untersuchenden Milchsäurebakterien, deren Bezeichnung vom externen Auftraggeber übernommen wurde. Unter der Rubrik „Versuchsreihe“ sind die jeweils miteinander zu vergleichenden Isolate in chronologischer Versuchsreihenfolge angeführt, wobei die dritte Versuchsreihe insofern eine Ausnahme darstellt, als die Stämme LAC 905 & A 100-1* der ersten Versuchsreihe ($1^{(N)}$) auch zum Identitätsvergleich der Stämme der dritten Reihe herangezogen wurden.

Die in *Tab. 3-2* angeführte Versuchsreihe $1^{(A)}$ beinhaltet die (alten) Zellmassen der Stämme vom 08.05.2009, die bereits von der Vorgängerin (Teresa Herzig) des Verfassers dieser Arbeit mittels RAPD-PCR analysiert wurden. Die weitere Differenzierung dieser Isolate mittels PFGE ist in *Kapitel 4.2* beschrieben.

Die in *Tab. 3-2* angeführte Versuchsreihe $1^{(N)}$ beinhaltet die (neuen) Zellmassen der Stämme vom 02.07.2009, die sowohl mittels RAPD-PCR als auch mit PFGE analysiert wurden.

3.2 Zellmassenanzucht und –ernte

Das optimale Wachstum der Gattung *Lactobacillus* bedarf komplexer Anforderungen: Bei leicht saurem Milieu (zwischen pH 4,5 und 6,4) muss das Substrat – abgesehen von Kohlenhydraten als Energie- und Kohlenstoffquelle – Aminosäuren, Peptide, Nucleotide und Vitamine im mesophil temperierten Bereich beinhalten. [BLASCHEK et al., 1998; DOMIG, 1998].

Die Isolate der Stämme *Lactobacillus buchneri* und *Lactobacillus sakei* wurden daher in einem jeweils geeigneten Nährmedium (MRS-Bouillon; anaerobe Inkubation beider Stämme: erster Stamm bei 37℃, letzterer bei 30℃) in einer über Nachtkultur (ONC) angezüchtet, um genügend Zellmasse für molekularbiologische Analysen zu erhalten. Nach erfolgter Zellmassenernte wurden die Zellen zweimal gewaschen und anschließend aufgeteilt, um eventuell notwendige, weitere Untersuchungen durchführen zu können bzw. um Reservezellmasse zu erhalten.

Die Zellmasse des Auftraggebers wurde bereits einmal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und danach bei –20℃ eingefroren, daher konnten die Arbeitsschritte der Anzucht und Ernte entfallen.

3.2.1 Geräte und Hilfsmittel

Tab. 3-3 Geräte und Hilfsmittel zum Waschen und Portionieren der Zellmasse

Gerät / Hilfsmittel	Beschreibung	Hersteller
Analysenwaage	Mettler AE 163	MettlerToledo
Autoklav	VARIOKLAV Dampfsterilisator 400 EP-Z	Thermo SCIENTIFIC
Eppendorf-Gefäße	1,5 ml; 2 ml	Eppendorf
Fingerschüttler	MS1 Minishaker	IKA
Glasflaschen	100 ml mit Schraubdeckel	Schott/Duran
Kolbenhubpipetten	1000 µl	GILSON
Kühlzentrifuge	J2 – HS	Beckman
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Messkolben	100 ml	Schott/Duran
pH-Meter	pH 211	Hanna Instruments
Pipettenspitzen	SafeSeal®-Tips, diverse Größen	Biozym
Pipettierhelfer	-	Bibby
Sterilpipetten	25 ml, No./REF 86.1685.001	SARSTEDT
Tiefkühler	-20℃	Gorenje

3.2.2 Reagenzien und Lösungen

(a) Reagenzien

Tab. 3-4 Reagenzien zum Waschen und Portionieren der Zellmasse

Reagenz	Beschreibung	Hersteller
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	A1104.1000	AppliChem
NaCl	A2942,1000	AppliChem
NaOH, 99 %	9356.5	Roth

(b) Lösungen

EDTA-Puffer (0,5 M; pH 8,5)

18,61 g EDTA

2 g NaOH

in 80 ml UHQ-Wasser lösen,

mit konz. NaOH auf pH 8,5 einstellen,

auf 100 ml mit UHQ-Wasser auffüllen, mischen und autoklavieren

EDTA-Puffer (50 mM; pH 8,5)

10 ml EDTA-Puffer (0,5 M; pH 8,5)

mit 90 ml UHQ-Wasser (steril) mischen

physiol. NaCl-Lösung (0,9%)

9 g NaCl in 1 l deionisiertem Wasser lösen und autoklavieren

3.2.3 Waschen der Zellen

- Auftauen der bei –20℃ gefrorenen Zellmasse bei Rau mtemperatur
- Biomassepellet aus 10 ml MRS-Bouillon wird mit 10ml physiol. NaCl-Lösung versetzt
- Mit Vortex mischen (Zellmasse muss sich auflösen)
- Sedimentation der Zellmasse durch Zentrifugieren bei 3500 rpm und 4℃ für 10 min
- Überstand vorsichtig abdekantieren und verwerfen
- Die Biomasse wurde nun zweimal gewaschen und wird anschließend portioniert

3.2.4 Portionierung der Zellmasse

- Pellet der Biomasse wird in 3 ml steriler EDTA-Lösung (50 mM / pH 8,5) resuspendiert
- Nun erfolgt die Aufteilung der Zellsuspension:
  - → für **RAPD-PCR** werden je 450 µl Aliquot in sterile 1,5 ml Eppendorf-Gefäße pipettiert (entspricht einer Bouillonkultur von 1,5 ml)
  - → für **PFGE** werden je 1500 µl Aliquot in sterile 2 ml Eppendorf-Gefäße pipettiert (entspricht einer Bouillonkultur von 5 ml)
- Eppendorf-Gefäße zentrifugieren bei 10.000 rpm, 4°C für 10 min; Überstand mit Pipette und steriler Spitze vorsichtig absaugen und verwerfen

- Restliche Zellsuspension zentrifugieren bei 10.000 rpm, bei 4°C für 10 min und Überstand ebenfalls mit Pipette und steriler Spitze vorsichtig absaugen und verwerfen
- Portionierte Zellmassen bei –20℃ bis zur weiteren Ve rwendung einfrieren

3.3 DNA-Isolierung

3.3.1 Allgemeines

Es gibt eine Vielzahl an DNA-Isolierungsmethoden. Welche letztendlich die Methode der Wahl ist, bedingen die Nukleinsäureart sowie auch ihre geplante, weitere Verwendung [JANSOHN, 2007].

Bei der klassischen DNA-Präparierung gram-positiver Bakterien werden physikalische Verfahren, bei denen die Zellwände durch mechanische Kräfte zerstört werden, und chemische Methoden, bei denen es zu einer Lyse (Auflösung) kommt, angewandt [BROWN, 2006].

Bei der Präparierung der DNA aus Bakterienzellen setzt man meistens chemische Verfahren mit speziellen Enzymen, beispielsweise mit dem im Jahr 1922 vom Bakteriologen Alexander Fleming entdeckten Lysozym, ein. Der wichtigste Zellwandbestandteil gram-positiver Bakterien ist das Peptidoglykan Murein, welches in bis zu 20 Lagen die Zelle umhüllt, und durch Lysozym in Disaccharide mit angehängten Peptiden gespalten wird [CHRISTEN und JAUSSI, 2005].

Durch EDTA-Zusatz werden Magnesiumionen, die für die Aufrechterhaltung der Gesamtstruktur der Zellhülle unentbehrlich sind, entfernt. Zudem werden Enzyme, die DNA-abbauend wirken, gehemmt.

Der Zusatz des Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) unterstützt die Entfernung von Lipidmolekülen, und bewirkt so ein Zerreißen der Zellmembran [BROWN, 2006]. Um den Bakterienzellextrakt nun von Proteinen und RNA zu reinigen, bedient man sich einer Salzfällung oder Extraktion aus einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch wobei eine Auftrennung in eine organische, proteinhaltige und eine wässrige, nukleinsäurehaltige Phase erfolgt [JANSOHN, 2007].

Manche Zellextrakte enthalten so viel Protein, dass die Phenolextraktion mehrmals wiederholt werden müsste, um die Nucleinsäuren zu reinigen. Da durch jedes Zentrifugieren und Mischen allerdings ein gewisser DNA-Anteil bricht, ist die Behandlung mit Proteinase K vor der Extraktion die Methode der Wahl; zugesetzte Ribonuclease entfernt die RNA in der wässrigen Phase [BROWN, 2006].
Danach wird die DNA durch Alkohol präzipitiert, und bei der anschließenden Zentrifugation der Niederschlag in einem geeigneten Puffer aufgenommen. Diese Technik ist in der Regel aufwendig, bei niedrigen Nukleinsäure-Konzentrationen schlecht reproduzierbar und liefert im Allgemeinen DNA mittlerer Qualität [JANSOHN, 2007].

Es besteht auch die Möglichkeit der Anwendung eines kommerziell erhältlichen DNA-Isolierungs-Kits, das auf einer Methode, die Silikagelmembranen in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze kombiniert, beruht [JANSOHN, 2007]. Die Vorteile eines solchen Kits sind:

- Einfache Handhabung, dadurch Zeit- und Geldersparnis
- Vermeidung gesundheitsschädlicher phenol- und chloroformhältiger Abfälle
- Hochreine DNA
- Standardisierte Arbeitsabläufe und bessere Reproduzierbarkeit.

Um reproduzierbare, vergleichbare Ergebnisse bei der RAPD-PCR als Fingerprinting-Methode zu erhalten, ist es wichtig, dass zur DNA-Gewinnung jeweils die exakt gleiche Methode angewandt wird [DOMIG, 1998].

Alle Nukleinsäureproben der vorliegenden Diplomarbeit sind aufgrund der oben genannten Gründe und Vorteile ausschließlich mit dem „DNeasy® Blood & Tissue“ Kit der Marke „QIAGEN“ extrahiert worden, daher soll in weiterer Folge auch nur noch auf diese Isolierungsmethode eingegangen werden.

Funktionsprinzip des „QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue Kits“

(silikagelbasierende Spinsäulen-Technologie)

DNeasy® Blood & Tissue Kits sind für die rasche Aufreinigung von Gesamt-DNA (z.B. genomischer, viraler und mitochondrialer DNA) konzipiert. Die Proben können frischen oder gefrorenen Ursprungs sein, und tierischem Gewebe, Zellen, Blut oder Bakterien entstammen.

Die DNA-Extraktion benötigt weder Phenol noch Chloroform, bedarf minimaler Handhabung, und ist durch den hohen Reinheitsgrad bestens für die nachfolgende PCR geeignet. (Um die Reinheit einer DNA-Lösung zu bestimmen, wird die Absorption eines passend verdünnten Aliquots (10 bis 50 fach) bei 260 und 280 nm gemessen. Der Quotient beider Werte ($A_{260/280}$) beschreibt die Reinheit der Nukleinsäureisolate. Die mit dem DNeasy® Blood & Tissue Kit erreichbaren Werte von 1,7 bis 1,9 entsprechen einer DNA-Reinheit von 85 bis 95 %.)

Zuerst wird die Probe durch Proteinase K lysiert, während ein optimal eingestelltes Puffermilieu („Buffer AL“) für eine bestmögliche, selektive DNA-Bindung an die DNeasy® Membran sorgt. Die Membran kombiniert die Eigenschaften der gezielten Bindung einer Silikagelmembran in Anwesenheit hoher chaotroper Salzkonzentrationen, welche Wasser von hydratisierten Molekülen in Lösung entfernen, mit denen der MicroSpin®-Technologie.

Bei der Zentrifugation passieren Kontaminanten und Enzyminhibitoren die Membran, da sie nicht gebunden werden.

Verbliebene Kontaminanten und Enzyminhibitoren werden durch genau aufeinander abgestimmte Pufferbedingungen effizient in zwei Waschschritten („Buffer AW1 und AW2“) entfernt, und die fertig isolierte DNA anschließend mit Wasser (pH ≥7) oder einem Niedrigsalzpuffer („Buffer AE“) eluiert (Der Einsatz des Puffers AE (pH 9) garantiert eine optimale „Bergung“ und Stabilität der zu eluierenden DNA; bei langfristiger Aufbewahrung der DNA wird die Anwendung des Puffers sogar nachdrücklich empfohlen, zumal die in Wasser gelagerte DNA der sauren Hydrolyse unterliegt) [QIAGEN, 2006].

3.3.2 Geräte und Hilfsmittel

Tab. 3-5 Geräte und Hilfsmittel zur DNA-Isolierung

Gerät / Hilfsmittel	Beschreibung	Hersteller
Analysenwaage	Mettler AE 163	MettlerToledo
Eppendorf-Gefäße	1,5 ml; 2 ml	Eppendorf
Fingerschüttler	MS1 Minishaker	IKA
Glasflaschen	25 ml mit Schraubdeckel	Schott/Duran
Kolbenhubpipetten	diverse	GILSON
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Messkolben	10 ml	Schott/Duran
Pipettenspitzen	SafeSeal®-Tips, diverse Größen	Biozym
Sammeltubes (2 ml) / DNeasy®-Säulchen	im DNeasy® Tissue Kit enthalten	QIAGEN
Tiefkühler	-20℃	Gorenje
Thermoblock	Bioer Heating Block HB-202	Biozym
Thermomixer	Bioer Mixing Block MB-102	Biozym

3.3.3 Reagenzien und Lösungen

Tab. 3-6 Reagenzien und Lösungen zur DNA-Isolierung

Reagenz / Lösung	Beschreibung	Hersteller
DNeasy® Blood & Tissue Kit (50) bestehend aus:	69504	QIAGEN
▪ Proteinase K		
▪ Buffer AL	Bindepuffer	
▪ Buffer AW1	1. DNA-Waschpuffer	
▪ Buffer AW2	2. DNA-Waschpuffer	
▪ Buffer AE	Elutionspuffer	
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	A1104,1000	AppliChem
Ethanol (100 %)	1.00983	Merck
Lysozym	L7651	Sigma
Salzsäure, 32 %, p.a.	1.00319	Merck
Tris Pufferan® ≥ 99,3 %	AE15.3	Roth
Triton® X-100	T8787	Sigma

Die Waschpuffer AW1 und AW2 werden vor der ersten Verwendung mit Ethanol (96 – 100 %) verdünnt (siehe Angaben des Herstellers am Etikett).

Weiters erfolgt die Herstellung nachstehend angeführter Lösungen, aus welchen der Lysispuffer erstellt wird. Der Lysispuffer dient der Suspendierung des Zellmassenpellets *(Kapitel 3.3.4).*

Tris-HCl-Puffer (1 M; pH 8)

12,11 g Tris
in 80 ml UHQ-Wasser lösen,
mit konz. HCl auf pH 8 einstellen,
auf 100 ml mit UHQ-Wasser auffüllen, mischen und autoklavieren

EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8)

18,61 g EDTA
2 g NaOH
in 80 ml UHQ-Wasser lösen,
mit konz. NaOH auf pH 8 einstellen,
auf 100 ml mit UHQ-Wasser auffüllen, mischen und autoklavieren

Lysispuffer

20 mM Tris-HCl (pH 8,0)	➔	200 µl 1 M Tris-HCl (pH 8,0)
2 mM EDTA-Na_2	➔	40 µl 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0)
1,2 % Triton® X-100	➔	0,12 g Triton® X-100, auf 10 ml mit sterilem UHQ-Wasser auffüllen

Lysozym wird erst vor der unmittelbaren Verwendung in einem Verhältnis von 20 mg Lysozym pro ml Lysispuffer zugesetzt (20 mg/ml); dadurch entsteht der *fertige Lysispuffer* (welcher je Probe nun eine Konzentration von 3,6 mg Lysozym / 180 µl *einsatzbereitem Lysispuffer* aufweist).

3.3.4 Durchführung

Die DNA-Isolierung wurde nach Maßgabe des „QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue Handbooks“ vom Juli 2006 und dem darin beschriebenen Protokoll zur „Isolierung genomischer DNA gram-positiver Bakterien“ bewerkstelligt:

- Gefrorene Zellmassenpellets auftauen
- Heizblöcke (37℃ und 56℃) einschalten und 1,5 ml Epp endorf-Reaktions-gefäße in der Anzahl der Proben vorbereiten
- Jedes Bakterien-Zellmassenpellet wird in 180 µl des vorher erstellten Lysispuffers suspendiert
- Mindestens 30 (40) min bei 37℃ inkubieren
- 25 µl Proteinase K und 200 µl Puffer AL hinzugeben, danach mit Vortex gut mischen

  Anmerkung: Proteinase K nicht direkt zu Puffer AL zugeben!
- 30 min bei 56℃ inkubieren
- 200 µl Ethanol (96-100 %) zugeben und gründlich vortexen, sodass eine homogene Lösung entsteht (Ein eventuell auftretender weißer Niederschlag muss vollständig auf die DNeasy®-Säulchen (in einem 2 ml Sammeltube sitzend) übertragen werden)
- 1 min bei 8000 rpm (6000 x g) zentrifugieren, bei Bedarf auch länger
- Abzentrifugiertes Lösungsmittel mit gebrauchtem Sammeltube verwerfen
- DNeasy®-Säulchen auf ein neues 2 ml Sammeltube setzen
- 500 µl Puffer AW1 zugeben
- 1 min bei 8000 rpm (6000 x g) zentrifugieren, bei Bedarf auch länger
- Inhalt des Sammeltubes und selbiges abermals verwerfen
- DNeasy®-Säulchen auf ein neues 2 ml Sammeltube setzen
- 500 µl Puffer AW2 zugeben
- 3 min bei 14.000 rpm (20.000 x g) zentrifugieren (Die Dneasy®-Membran muss am Ende trocken sein, da restliches Ethanol nachträgliche Reaktionen beeinträchtigen kann)
- Lösungsmittel und gebrauchtes Sammeltube verwerfen (Ethanol-Verschleppung vermeiden!)
- DNeasy®-Säulchen auf ein vorbereitetes 1,5 ml Eppendorf-Reaktions-gefäß setzen
- 100 µl Puffer AE direkt auf die DNeasy®-Membran pipettieren
- 1 min bei Raumtemperatur inkubieren (DNA löst sich dabei aus der Membran)
- 1 min bei 8000 rpm (6000 x g) zentrifugieren

▪ Wiederholung der 3 letzten Schritte (DNA-Ausbeute beträgt nun 200 µl)
Die DNA-Isolate werden nun aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20℃ eingefroren.

Das Aliquotieren reduziert auftretende Scherkräfte und somit Beschädigungen der DNA durch eine herabgesetzte Gefrier-Tau-Frequenz [JANSOHN, 2007]. Außerdem wird eine mögliche Kontamination der gesamten DNA-Lösung durch häufiges Pipettieren vermindert.

3.4 Randomly Amplified Polymorpic DNA (RAPD) PCR

3.4.1 Allgemeines

Unter Einsatz eines Primers mit zufälliger Sequenz und zumeist zehn Basenpaaren Länge kommt es in einer PCR-Reaktion mit geringer Stringenz zur Anlagerung an komplementäre bzw. nahezu komplementäre Sequenzen der genomischen DNA des zu analysierenden Bakteriums, worauf je nach Komplementarität die Amplifizierung der zufälligen Segmente der jeweiligen Bakterien-DNA erfolgt. Die Amplifikate der RAPD-Methode ergeben nach elektrophoretischer Auftrennung ein charakteristisches DNA-Fingerprintmuster, welches eine Differenzierung auf Spezies- und Stammebene ermöglicht. Zur Erhöhung der Wiederholbarkeit der mitunter schlecht reproduzierbaren RAPD-Muster muss die Anwendung dieser Technik unter sorgfältig kontrollierten, standardisierten Bedingungen geschehen [KNEIFEL und DOMIG, 2009; MOHANIA et al., 2008].

Primerdesign der RAPD-PCR

Die Eignung eines zufällig gewählten Primers zur Behandlung einer speziellen Fragestellung ist – neben dem Zufallsprinzip – auch empirisch erforscht.
Obwohl die Basensequenz der verwendeten RAPD-Primer zufällig gewählt wird, müssen doch mindestens zwei Basiskriterien – wie von WILLIAMS et al. (1990, 1993) hingewiesen – erfüllt sein: Der GTP- und CTP-Gehalt muss mindestens 40 % betragen (normalerweise kommen Oligonucleotide mit einem

50 – 80 %igen G+C-Gehalt zum Einsatz), und die Abwesenheit palindromischer Sequenzen muss gewährleistet sein [MICHELI et al., 1997]. Außerdem sollten die Primer keine längeren Sequenzabschnitte gleicher Basen aufweisen.
Primer mit einem höheren G+C-Gehalt können erfolgreicher als welche mit einem niedrigeren G+C-Gehalt eingesetzt werden, und symmetrische bzw. zu sich selbst komplementäre Basenfolgen sollten vermieden werden, um ein sogenanntes „Self-priming“ auszuschließen [PIEHL, 1995].
Der G+C-Gehalt der Gattung *Lactobacillus*, welcher für die genetische Gattungs- und Artentypisierung von besonderem Interesse ist, beträgt zwischen 32 und 53 mol % [BLASCHEK et al., 1998].

3.4.2 Geräte und Hilfsmittel

Tab. 3-7 Geräte und Hilfsmittel für die RAPD-PCR

Gerät / Hilfsmittel	Beschreibung	Hersteller
Eppendorf-Gefäße	1,5 ml; 2 ml	Eppendorf
Erlenmeyerkolben (+Stopfen)	1000 ml	Schott/Duran
Fingerschüttler	MS1 Minishaker	IKA
Kolbenhubpipetten	2 µl; 10 µl; 20 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl	GILSON
Kühlblöcke	-	Isocube
Messzylinder	50ml; 100 ml; 250 ml; 1000 ml	Schott/Duran
Mikrozentrifuge	Combi-Spin, FVL-2400N	BIOSAN
PCR-Reaktionsgefäße mit Deckel	Multiply®-Pro 0,5 ml 72.735.100	SARSTEDT
PCR-Werkbank	captair®bio Biocap DNA/RNA	Erlab®
Pipettenspitzen	SafeSeal®-Tips, diverse Größen	Biozym
Thermocycler	TRIO-Thermoblock TB-1	Biometra
Tiefkühler	-20℃	Gorenje
Untersuchungshandschuhe	Latex, puderfrei	TOP GLOVE

3.4.3 Reagenzien und Lösungen

Um Kontaminationen zu vermeiden, erfolgen alle weiteren Arbeitsschritte ausschließlich unter einem PCR-Abzug (captair®bio Biocap DNA/RNA) mit Arbeitshandschuhen, und bis zur Lagerung im Tiefkühler werden sämtliche Pipettierschritte zügig in Kühlblöcken erledigt.

(a) Reagenzien

Tab. 3-8 Reagenzien für die RAPD-PCR

Reagenz	Beschreibung	Hersteller
dATP (100 mM)	DNTP-Set 1, K039.1	Roth
dCTP (100 mM)	DNTP-Set 1, K039.1	Roth
dGTP (100 mM)	DNTP-Set 1, K039.1	Roth
dTTP (100 mM)	DNTP-Set 1, K039.1	Roth
DNA-Polymerase	DyNAzyme™ II, F-501L, 2U/µl	Finnzymes
Enzympuffer (10 x) für DyNAzyme™	F-511	Finnzymes
Mineralöl f. d. Molekularbiologie	HP50.3	Roth
RAPD-Primer	laut Literatur *(siehe Tab. 3-9)*	HVD Life-Sciences

(b) Lösungen

Für den optimalen Reaktionsablauf werden Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTP) in gleichen Konzentrationsverhältnissen, sowie ein Puffersystem samt zugehöriger, thermostabiler Polymerase, benötigt.

dNTP-Mix

100 µl dATP (pH 8,4 – 8,6)

100 µl dCTP (pH 8,4 – 8,6)

100 µl dGTP (pH 8,4 – 8,6)

100 µl dTTP (pH 8,4 – 8,6)

mit 600 µl sterilem UHQ-Wasser mischen

bei –20℃ aufbewahren

DyNAzyme™ II (pH 7,4)

20 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT (Dithiothreitol) ; 100 mM KCl ;

0,5 % TWEEN 20; 0,5 % Nonidet P 40; 200 µg / ml BSA; 50% Glycerol

Enzympuffer (10 x) für DyNAzyme™

100 mM Tris-HCl (pH 8,8)

500 mM KCl

0,1 % Triton® X-100

15 mM $MgCl_2$

DyNAzyme™-Mastermix

1000 µl Enzympuffer (10 x)

200 µl dNTP-Mix

200 µl DyNAzyme™

mit 7700 µl sterilem UHQ-Wasser mischen,

aliquotieren und bei –20℃ aufbewahren

RAPD-Primer (Oligonukleotide)

25 µl Primer (100 pmol/µl Stocklösung)

mit 175 µl sterilem UHQ-Wasser verdünnen (auf 12,5 pmol/µl),

anschließend bis zur weiteren Verwendung bei –20℃ lag ern

In nachstehender Tabelle sind die Primer, welche für die RAPD-PCR verwendet wurden, in der Reihenfolge der institutsinternen Nummerierung aufgelistet.

Tab. 3-9 Auflistung der verwendeten RAPD-Primer

Primer	Basensequenz 5´----3´	Länge [bp]	GC-Anteil [%]	alter Name	Literatur
RAPD-1	5´-GGT GCG GGA A-3´	10	70	-	Pharmacia RAPD-Primer-Set
RAPD-2	5´-GTT TCG CTC C-3´	10	60	-	Pharmacia RAPD-Primer-Set
RAPD-3	5´-GTA GAC CCG T-3´	10	60	-	Pharmacia RAPD-Primer-Set; VAN DEN BRAAK et al., 2000
RAPD-4	5´-AAG AGC CCG T-3´	10	60	-	Pharmacia RAPD-Primer-Set
RAPD-5	5´-AAC GCG CAA C-3´	10	60	-	Pharmacia RAPD-Primer-Set
RAPD-6	5´-CCC GTC AGC A-3´	10	70	-	Pharmacia RAPD-Primer-Set
RAPD-7	5´-AGC AGC GTG G-3´	10	70	-	COCCONCELLI et al., 1995
RAPD-8	5´-ACG CGC CCT-3´	9	77,8	-	JOHANSSON et al., 1995
RAPD-9	5´-ACG GTC TTG G-3´	10	60	SCHAEFER	MOLNÁR et al., 1995
RAPD-10	5´-TGC CGA GCT G-3´	10	70	OPA-02	MOLNÁR et al., 1995; WARD et al., 1997
RAPD-11	5´-TGG GCG TCA A-3´	10	60	OPL-02	HOLZAPFEL et al., 1997
RAPD-12	5´-ACG CAG GCA C-3´	10	70	OPL-05	HOLZAPFEL et al., 1997

RAPD-13	5´-GCG ATC CCC A-3´	10	70	CRA 23	DAUD KHALED et al., 1997
RAPD-14	5´-GGG AAC GTC T-3´	10	60	OPM-05	WARD et al., 1997
RAPD-15	5´-AGG CGG GAA C-3´	10	70	OPL-07	WARD et al., 1997
RAPD-16	5´-AGG TTG CAG G-3´	10	60	OPL-16	WARD et al., 1997
RAPD-17	5´-AGG TGA CCG T-3´	10	60	OPA-18	VINCENT et al., 1997
RAPD-18	5´-GGC ATG ACC T-3´	10	60	OPL-01	DU PLESSIS et al., 1995
RAPD-19	5´-GAC TGC ACA C-3´	10	60	OPL-04	DU PLESSIS et al., 1995
RAPD-20	5´-GCG TGA CTT G-3´	10	60	Primer 24	BALREIRAS COUTO et al., 1996
RAPD-21	5´-AGG AGG AGG A-3´	10	60	Primer 28	BALREIRAS COUTO et al., 1996
RAPD-22	5´-CAA TCG CCG T-3´	10	60	OPA-11	BALREIRAS COUTO et al., 1996
RAPD-23	5´-CTG GCG ACT G-3´	10	70	KAY-3	MONSTEIN et al., 1998; KLEIN et al., 1998; ISSACK et al., 1996
RAPD-24	5´-GAA GCC AGC C-3´	10	70	OPV-07	Lactosan
RAPD-25 =RAPD-43	5´-GGA CGG CGT T-3´	10	70	OPV-08	Lactosan; KLEIN et al., 1998
RAPD-26	5´-GGA GGG TGT T-3´	10	60	AB1-15	ISSACK et al., 1996
RAPD-27	5´-GTG CAA TGA G-3´	10	50	CHI-1	CHIEW und HALL, 1998
RAPD-28	5´-TCC CGC GCA-3´	9	77,8	QUE-1	QUEDNAU et al., 1998
RAPD-29	5´-TCA CGC TGC A-3´	10	60	AP4	BARBIER et al., 1996
RAPD-30	5´-GGT GAC GCA G-3´	10	70	OPB-7	MANNU et al., 1999
RAPD-31	5´-ATG TAA CGC C-3´	10	50	P2	FITZSIMONS et al., 1999
RAPD-32	5´-AGG TTC TAG C-3´	10	50	Gen 15006	SON et al., 1999
RAPD-33	5´-AAA TCG GAG C-3´	10	50	Gen 25011	SON et al., 1999
RAPD-34	5´-CAG CAC CCA C-3´	10	70	RP	WARD et al., 1999
RAPD-35	5´-TGA CGC ATG G-3´	10	60	OPV-01	REUTER (Lactosan)
RAPD-36	5´-AGA GCC GTC A-3´	10	60	OPY-07	GAYA et al., 1999
RAPD-37	5´-AGA CGA TGG G-3´	10	60	OPY-11	GAYA et al., 1999
RAPD-38	5´-TGC TCT GCC C-3´	10	70	Rapd-P1	MANGIN et al., 1999; VAN DEN BRAAK et al., 2000
RAPD-39	5´-CTG CTG GGA C-3´	10	70	Rapd-P3	MANGIN et al., 1999
RAPD-40	5´-AGT CAG CCA C-3´	10	60	OPA 3	Camino, Pamplona
RAPD-41	5´-CAG CAC CCA C-3´	10	70	OPA-13	VINCENT et al., 1998
RAPD-42	5´-ACG CCC AGG T-3´	10	70	OPV-06	KLEIN et al., 1998
RAPD-44	5´-AGA TCC CGC C-3´	10	70	OPV-14	KLEIN et al., 1998
RAPD-45	5´-GGG TGT GCA G-3´	10	70	OPV-19	KLEIN et al., 1998
RAPD-46	5´-TCG CCA GCG A-3´	10	70	CUGEA-1	MOMOL et al., 1997
RAPD-47	5´-GTT GCG ATC C-3´	10	60	CUGEA-2	MOMOL et al., 1997
RAPD-48	5´-GCG GTA CCC G-3´	10	80	CUGEA-3	MOMOL et al., 1997
RAPD-49	5´-GCG AAT TCC G-3´	10	60	CUGEA-4	MOMOL et al., 1997
RAPD-50	5´-CGA TCG ATG C-3´	10	60	CUGEA-5	MOMOL et al., 1997
RAPD-51	5´-GGA AGC TTC G-3´	10	60	CUGEA-6	MOMOL et al., 1997
RAPD-53	5´-GGA CGA CAA G-3´	10	60	OPR 13	Ronimus et al., 1996
RAPD-54	5´-CTG AGA CGG A-3´	10	60	OPG 5	Daffonchio et al., 1998
RAPD-55	5´-CCG AGT CCA-3´	9	66	Andersson	Andersson et al., 1999
RAPD-56	5´-CCG GCG GCG-3´	9	100	0910-08	Svensson et al., 1999
RAPD-57	5´-CCA CAG CAG T-3´	10	60	OPB 18	Lechner et al., 1998

3.4.4 Durchführung

Wie auch in *Kapitel 3.4.3* erfolgen alle weiteren Arbeitsschritte unter einem PCR-Abzug (Biocap^{TM} RNA/DNA dynamisch) mit Arbeitshandschuhen, und bis zum Einstellen in den Thermocycler werden sämtliche Pipettierschritte zügig in Kühlblöcken ausgeführt.

Um die Arbeitsweise zu beschleunigen, wird ein Prämix aus Mastermix und Primer entsprechend der Probenanzahl (=n) erstellt, wobei Pipettierverluste eingeplant werden müssen (Herstellung des Prämix' daher nach z.B. n+1).

Tab. 3-10 Pipettierschema des Amplifikationsansatzes für die RAPD-PCR

Komponente	**Volumen**
Mastermix	22,5 µl
RAPD-Primer (12,5 pM / µl)	2,0 µl
Prämix	24,5 µl
DNA	0,5 µl
Gesamtreaktionsvolumen	**25,0 µl**

- Kühlblöcke aus Tiefkühler nehmen und auftauen lassen
- UV-Lampe der PCR-Werkbank zur Dekontamination 30 min einschalten
- PCR-Reaktionsgefäße in Anzahl der Proben vorbereiten und benötigte Lösungen (Mastermix, Primer, DNA-Aliquote) im Kühlschrank auftauen
- Laut dem in *Tab. 3-10* beschriebenen Pipettierschema wird der Prämix aus 22,5 µl Mastermix und 2 µl Primer nach n+1 (Pipettierverluste, s.o.) hergestellt
- 24,5 µl Prämix werden in allen, schon vorbereiteten PCR-Tubes vorgelegt
- Die Reaktionsgefäße der DNA-Aliquote werden kurz auf leichter Stufe am Fingerschüttler gemischt und gleich danach je 0,5 µl DNA-Lösung unter die Oberfläche des vorgelegten Prämix' jedes PCR-Tubes pipettiert
- Nach Pipettieren aller Ansätze werden die PCR-Reaktionsgefäße kurz auf niedriger Stufe gemischt und anzentrifugiert
- Jede Probe wird mit 2 Tropfen PCR-Öl überschichtet
- Alle PCR-Tubes werden sofort nach beendigtem Pipettiervorgang in den Thermocycler gestellt und das RAPD-Temperaturprogramm gestartet

Tab. 3-11 Temperaturprogramm der RAPD-PCR

Ablauf	Zyklusanzahl	Temperatur	Zeit
Initialer Denaturierungsschritt	1	95 ℃	5 min
Denaturierung	45	95 ℃	1 min
Primeranlagerung (Annealing)		36 ℃	1 min
Kettenverlängerung (Extension)		72 ℃	2 min
Endphase (finale Elongation)	1	72 ℃	8 min
bis zur Entnahme	1	4 ℃	Unendlich

Nach Abschluss der RAPD-PCR werden die fertigen PCR-Produkte gleich für eine elektrophoretische Auftrennung genutzt, oder bis zur weiteren Verwendung bei –20℃ aufbewahrt.

3.5 Agarosegel-Elektrophorese

3.5.1 Allgemeines

Die effektivste und gleichzeitig effizienteste Methode zur Identifizierung und Trennung von linearen DNA-Fragmenten mit 0,1 bis 60 kb Länge ist die Agarosegel-Elektrophorese, da bei geringstem Materialeinsatz ein hohes Auflösungsvermögen über einen großen Längenbereich schnell und kostengünstig realisiert werden kann [JANSOHN 2007; LOTTSPEICH und ENGELS, 2006; MÜLHARDT, 2009].

Das Prinzip der Agarosegel-Elektrophorese beruht darauf, dass sämtliche Nucleinsäuren innerhalb eines sehr großen pH-Bereichs durch die Phosphatgruppen des Phosphodiesterrückgrads negativ geladen sind, und (im Gegensatz zu Proteinen) relativ pH-unabhängig im elektrischen Gleichstromfeld zur Anode wandern [LOTTSPEICH und ENGELS, 2006; NICHOLL, 2002].

Nucleinsäuren weisen als weiteren, wichtigen Unterschied zu Proteinen eine konstante Ladungsdichte auf, daher ist das Verhältnis von Molekulargewicht zu Ladung stets gleichbleibend [LOTTSPEICH und ENGELS, 2006].

Die Wanderungsgeschwindigkeit geladener Moleküle wird auch als *elektrophoretische Mobilität (u)* bezeichnet. Sie ist eine signifikante, charakteristische Größe, welche von den p*K*-Werten der geladenen Gruppen, der Größe und Gestalt des Moleküls, der Beschaffenheit des Trägermaterials, der Art, dem pH-

Wert, der Konzentration und der Temperatur des Puffers, sowie der elektrischen Feldstärke, abhängt [WESTERMEIER, 1990].
Nucleinsäuren besitzen jedoch – unabhängig von ihrem Molekulargewicht – eine gleich große elektrophoretische Mobilität in freier Lösung.
Mobilitätsunterschiede ergeben sich erst in fester Gelmatrix und sind *ausschließlich* auf verschiedene Molekülgrößen bzw. -längen zurückzuführen.
Folgende zwei Theorien beschreiben nun den Konnex zwischen Größe und Mobilität der Nucleinsäurefragmente bei elektrophoretischer Auftrennung:

Der **Ogston-Siebeffekt** geht davon aus, dass in Lösung befindliche Nucleinsäuren theoretisch Kugelform annehmen, dessen *Größe* mit einem Kugelradius beschrieben werden kann. Ist der Kugeldurchmesser nun kleiner als das Porensystem der Gelmatrix, können die Moleküle wandern.
Die **Reptationstheorie** besagt, dass sich Nucleinsäuren entlang des elektrischen Feldes linear ausrichten, und „schlangenartig“ durch die Gelmatrix winden können. Das Kriterium der Größenselektion dieser Theorie ist die längere Dauer der Bewegung bei *längeren Molekülen* [LOTTSPEICH und ENGELS, 2006].

Die Trennschärfe ist von der Porösität der verwendeten Matrix abhängig. In *Tabelle 3-12* ist die Größentrennung von DNA-Fragmenten in Abhängigkeit der Agarosekonzentration dargestellt:

Tab. 3-12 Größentrennung von DNA-Fragmenten bei verschiedenen Agarosekonzentrationen

Agarosekonzentration [% w/v]	optimaler Auftrennungsbereich linearer, doppelsträngiger DNA-Fragmente [kb]
0,3	5 – 60
0,6	1 – 20
0,7	0,8 – 10
0,9	0,5 – 7
1,2	0,4 – 6
1,5	0,2 – 3
2,0	0,1 – 2

[QUELLE: LOTTSPEICH und ENGELS, 2006]

Zur Auftrennung kleinerer Nucleinsäuremoleküle, wie z.B. bei der DNA-Sequenzierung, sind hochauflösende Polyacrylamidgele verfügbar. [NEWTON und GRAHAM, 1994; NICHOLL, 2002]. Damit können Fragmente mit bis zu 1000 bp Länge, und solche, die aus mehreren hundert Nucleotiden bestehen und sich nur um ein einziges Nucleotid in der Länge unterscheiden, getrennt werden. Mit der Anwendung der Wechselfeld- oder Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE, siehe *Kapitel 3.7*) können in Agarosegelen sogar ganze Chromosomen, die Millionen von Nucleotiden enthalten, durch einen speziell alternierenden Rhythmus elektrischer Felder (Pulszeiten) getrennt werden [BERG et al., 2007]. Unterschiedlich große DNA-Fragmente besitzen daher uneinheitliche Wanderungsgeschwindigkeiten, sodass die Moleküle in einzelne Fraktionen aufgetrennt werden [NICHOLL, 2002]. Je kleiner diese Moleküle sind, desto größer ist ihre Wanderungsgeschwindigkeit und somit die zurückgelegte Wegstrecke, die eine reziproke Proportionalität zum $\log_{10}$ der Anzahl der Basenpaare aufweist [BERG et al., 2007; NICHOLL, 2002].

Zum Ausgleich unterschiedlicher Trennzeiten und Feldstärken, sowie zur zuverlässigen Größenermittlung und Identifizierung der Probenfragmente werden Längenmarker mit genau definierten Fragmentgößen in benachbarter Gelspur mitaufgetrennt. Die Auswahl dieser Längenstandards ist von der zu erwartenden Größe der DNA-Fragmente abhängig [LOTTSPEICH und ENGELS, 2006; NEWTON und GRAHAM, 1994].

Die Elektrophorese ist abgeschlossen, sobald der Farbmarker das Gelende erreicht hat. Anschließend mit Ethidiumbromid gefärbte Banden werden durch Fluoreszenz unter UV-Licht sichtbar gemacht [WESTERMEIER, 1990].

3.5.2 Geräte und Hilfsmittel

Tab. 3-13 Geräte und Hilfsmittel für die Agarosegel-Elektrophorese

Gerät / Hilfsmittel	Beschreibung	Hersteller
Autoklav	VARIOKLAV Dampfsterilisator 400 EP-Z	Thermo SCIENTIFIC
Elektrophoreseapparatur	HE 100	Hoefer
Erlenmeyerkolben (+Stopfen)	1000 ml	Schott/Duran
Fingerschüttler	MS1 Minishaker	IKA
Gelgießrahmen/-trägerplatte	20 x 25 cm Gel	Hoefer

Kapillarspitzen	720031; 10 µl, farblos	Biozym
Kolbenhubpipetten	10 µl	GILSON
Kühlpumpe	MultiTemp III	Pharmacia Biotech
Magnetrührer	IKAMAG® RCT	IKA
Magnetrührer	MINI MR Standard	IKA
Magnetrührstäbchen	-	-
Messkolben	100 ml; 5 l	Schott/Duran
Messzylinder	100 ml; 250 ml; 1000 ml	Isolab
Mikrowelle	R-207	Sharp
Pipettenspitzen	SafeSeal®-Tips, 10 µl	Biozym
Probenkämme	2 x 20er und 2 x 30er Kamm	Hoefer
Reaktionsgefäße mit Deckel	Multiply®-Pro 0,5 ml 72.735.100	SARSTEDT
Schraubflaschen	50 ml; 250 ml; 1000 ml	Schott/Duran
Scotch-Tape	Klebeband	Scotch®
Stromversorgung	EPS 301	Pharmacia Biotech
Vakuumpumpe	Model: XX5522050	Millipore
Waage	PT 310	sartorius
Wasserbad	W16	HGL
Zentrifuge	113	Sigma

3.5.3 Reagenzien und Lösungen

(a) Reagenzien

Tab. 3-14 Reagenzien für die Agarosegel-Elektrophorese

Reagenz	Beschreibung	Hersteller
100 bp DNA-Ladder	15628-050	Invitrogen
Borsäure ≥ 99,5 %, p.a.	P010.3	Roth
Bromphenolblau	8122	Merck
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	A1104.1000	AppliChem
Ficoll® 400	Type 400, F8016-5G	Sigma-Aldrich
LE Agarose	840004	Biozym
NaOH, 99 %	9356.5	Roth
Salzsäure, 32 %, p.a.	1.00319	Merck
Tris Pufferan® ≥ 99,3 %	AE15.3	Roth
Xylencyanol FF	X-4126	Sigma

(b) Lösungen

EDTA-Lösung (0,5 M; pH 7,6)

18,61 g EDTA
2 g NaOH
in 80 ml UHQ-Wasser lösen,
mit konz. NaOH auf pH 7,6 einstellen,
auf 100 ml mit UHQ-Wasser auffüllen, mischen und autoklavieren

EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8)

18,61 g EDTA
2 g NaOH
in 80 ml UHQ-Wasser lösen,
mit konz. NaOH auf pH 8 einstellen,
auf 100 ml mit UHQ-Wasser auffüllen, mischen und autoklavieren

Laufpuffer (TBE-Puffer)

Prinzipiell wird ein Tris-Acetat-(TAE-) oder Tris-Borat-(TBE-) Puffer zur Auftrennung der DNA verwendet. Beim TAE-Puffer laufen die Banden zwar schärfer, doch für längere Elektrophoresen ist der TBE-Puffer wesentlich besser geeignet, da er sich nicht so schnell zersetzt und eine höhere Pufferkapazität aufweist. Zudem laufen lineare DNA-Moleküle in TBE-Puffer ca. zehn Prozent schneller [LOTTSPEICH und ENGELS, 2006].
In der vorliegenden Arbeit kommt ausschließlich TBE-Laufpuffer zum Einsatz.

TBE-Puffer (5 x)

54 g TRIS
27,5 g Borsäure
20 ml EDTA (0,5 M; pH 8)
in deionisiertem Wasser lösen, auf 1 l auffüllen und autoklavieren

TBE-Puffer (0,5 x)

100 ml TBE-Puffer (5 x) mit

900 ml mit deionisiertem Wasser (steril) mischen (1:10 Verdünnung)

Tris-HCl (2 M; pH 7,6)

24,22 g Tris

in 80 ml UHQ-Wasser lösen,

mit konz. HCl auf pH 7,6 einstellen,

auf 100 ml mit UHQ-Wasser auffüllen, mischen und autoklavieren

TE-Puffer (10 mM Tris ; 1 mM EDTA ; pH 7,6)

500 µl Tris-HCl (2 M; pH 7,6) steril

200 µl EDTA (0,5 M; pH 7,6) steril

auf 100 ml mit sterilem UHQ-Wasser auffüllen und mischen

Gelladepuffer (6 x)

0,25 % Bromphenolblau ➔ 25 mg Bromphenolblau

0,25 % Xylencyanol FF ➔ 25 mg Xylencyanol FF

15 % Ficoll® 400 ➔ 1,5 g Ficoll® 400

auf 10ml mit sterilem UHQ-Wasser auffüllen und durch Schütteln auflösen

100 bp DNA-Marker

25 µl 100 bp DNA-Ladder (Originallösung 1µg/µl)

50 µl Gelladepuffer (6 x) steril

225 µl TE-Puffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7,6) steril

am Fingerschüttler mischen und bei –20℃ lagern

Agarosegel-Lösung (2 %) für HE 100

4 g LE-Agarose mit

200 ml TBE-Puffer (0,5 x)

in der Mikrowelle aufschmelzen und

in das auf 50℃ temperierte Wasserbad stellen

3.5.4 Durchführung

Tab. 3-15 Daten zur Anfertigung der Agarosegel-Lösung für die Elektrophoreseapparatur HE 100

Apparatur	Dimension [cm]	Geldicke [mm]	Agarose für 2 %iges Gel [g]	TBE-Puffer (0,5 x) [ml]
HE 100	20 x 25	4	4	200

- 4 g LE-Agarose in einem sterilen 250 ml Schraubglas einwiegen und in 200 ml 0,5 x TBE-Puffer suspendieren
- Agarose-Suspension in der Mikrowelle aufkochen lassen und nach der ersten Dampfblasenbildung vorsichtig schwenken
- Vorigen Schritt so oft ausführen, bis die Lösung vollkommen klar ist und keine Schlieren mehr zu sehen sind
- Lösung für ca. 30 min in das auf 50℃ temperierte Wasse rbad stellen
- Auftauen der PCR-Produkte im Kühlschrank
- 25 µl PCR-Produkt werden mit 6,5 µl Gelladepuffer versetzt und mittels Fingerschüttler gemischt:
  Der Gelladepuffer besitzt ein hohes spezifisches Gewicht, um die Proben am Boden der Geltaschen zu halten, und die dunkle Farbe ermöglicht eine optische Kontrolle des Fortschritts der Elektrophorese [RICHTER, 2003].
- Proben kurz anzentrifugieren, um eine saubere Phasentrenung (PCR-Ölschicht / Gelladepuffer-versetzte Proben) zu erhalten
- Bis zur Elektrophorese Proben in den Kühlschrank stellen
- Gelgießrahmen und –trägerplatte mit Ethanol reinigen
- Gelträgerplatte an den offenen Stirnseiten (in Elektrophoreselaufrichtung) mit Scotch-Tape abkleben, sodass die Gellösung nicht ausläuft
- Gelträgerplatte in den Gelgießrahmen (auf waagrechtem Untergrund!) legen
- Agarosegel-Lösung gleichmäßig und luftblasenfrei auf die Gelträgerplatte gießen und die Probenkämme unverzüglich einsetzen (die entstehenden Aussparungen der Probenkämme im Gel bilden später die Probentaschen; Kammzinken sollen ungefähr 1 mm über der Trägerplatte positioniert sein, bei kleinerem Abstand neigt das Gel beim Ablösen zum Einreißen, bei größerem Abstand entstehen zu flache Probentaschen)

- Gel erstarrt eine Stunde bei RT bis zum weiteren Einsatz
  (falls das Gel nicht unmittelbar danach für eine Elektrophorese Verwendung findet, erfolgt eine Überschichtung mit 0,5x TBE-Puffer und die weitere Lagerung im Kühlschrank)
- Beide Klebebänder von der Gelträgerplatte lösen, und diese samt erstarrtem Agarosegel in die Elektrophoreseapparatur, die mit 955 ml 0,5x TBE-Laufpuffer befüllt ist, einlegen
- Vorsichtig die Probenkämme entfernen
- Einschalten der Kühlung der HE 100 und Kontrolle des eingestellten Temperaturwertes (20℃)
- 100 bp-Ladder auftauen, kurz mischen und anzentrifugieren
- Proben (versetzt mit Gelladepuffer) und Marker in die Probentaschen des submarinen Agarosegels pipettieren (Auftragemengen siehe *Tab. 3-15*; die Kammdimension richtet sich nach der Probenanzahl)

Tab. 3-16 Auftragevolumina von Probe bzw. Marker in Abhängigkeit der Kammdimension

Kammdimension	Auftragevolumen	
	Probe	Marker
20 Zinken	10 µl	5 µl
30 Zinken	6 µl	3 µl

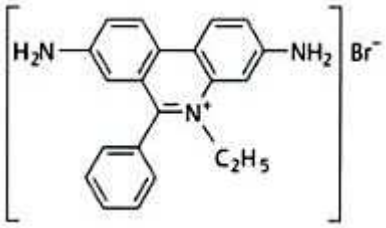
- Nach vollendetem Probenauftrag wird die Elektrophorese gestartet
  (Es wird eine voreingestellte Spannung von 150 V für die Dauer von drei Stunden an der Elektrophoreseeinheit angelegt, der Strom beträgt 50 – 60 mA)
- 15 Minuten nach dem Start wird der Magnetrührer unterhalb der Elektrophoreseapparatur aktiviert, um eine optimale Umwälzung des Laufpuffers zu gewährleisten
- Nach Abschluss der Elektrophorese wird das Agarosegel mit Trägerplatte aus der Apparatur genommen, der Laufpuffer (welcher später zum Entfärben dient) abgesaugt, und das Gel gefärbt *(Kapitel 3.6)*

3.6 Färben, Entfärben und Fotografieren der Agarosegele

3.6.1 Allgemeines

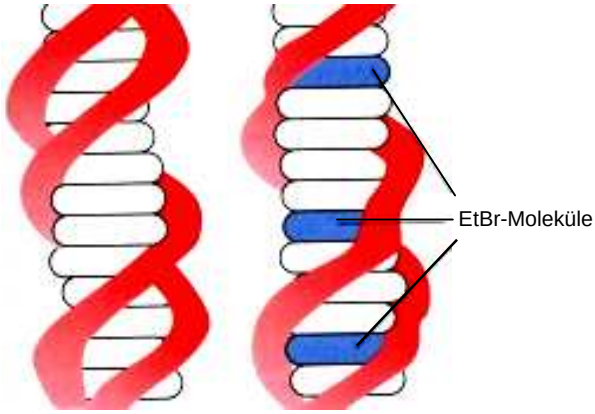
Die Standardmethode zur Detektion von elektrophoretisch getrennter DNA in Gelen ist die Färbung mit Ethidiumbromid, da der rote Phenanthridin-Farbstoff durch seine planare Struktur die Fähigkeit zur Interkalation zwischen die gestapelten Basenpaare der Nucleinsäuren besitzt.

Abb. 3.6.1-1 Ethidiumbromid (EtBr)



[QUELLE: RICHTER, 2003]

Abb. 3.6.1-2 DNA-Doppelhelix vor und nach der Einlagerung von EtBr-Molekülen (=Interkalation)



[QUELLE: RICHTER, 2003]

Das Absorptionsspektrum von Ethidiumbromid verändert sich infolge der Bindung an die DNA, und durch die starke Fluoreszenz des Ethidiumbromid-Nucleinsäure-Komplexes bei Anregung mit UV-Licht (254, 302 oder 366 nm) werden rot-orange leuchtende Banden im sichtbaren Bereich (500 – 590 nm) deutlich. Die vorhandene DNA-Konzentration bzw. Länge der Nukleinsäure ist dabei der emittierten Lichtintensität proportional, die in Agarose-Gelsystemen nachweisbare Mindestmenge an DNA beträgt 2 – 5 ng. Die schwache Hintergrund-Fluoreszenz, die Ethidiumbromidreste verursachen, lassen sich durch Wässern entfernen.
Die Befähigung zur Interkalation macht Ethidiumbromid jedoch auch zu einem starken Mutagen, daher sind geeignete Schutzvorkehrungen im Umgang mit diesem Farbstoff angebracht [JANSOHN, 2007; RICHTER, 2003].

Um Ethidiumbromidkontaminationen außerhalb des Färberaums zu vermeiden, und für eine maximale Gewährleistung der Gesundheit, ist das Tragen von

Schutzkleidung und Nitril-Schutzhandschuhen während des gesamten Hantierens mit dieser Chemikalie unerlässlich. Die Schutzkleidung verbleibt danach im Färberaum, die Handschuhe werden in einem Abfallkübel für Sondermüll entsorgt. Alle EtBr-haltigen Lösungen werden nach Verwendung in einen eigens dafür vorgesehenen Sondermüllkanister gegossen. Vor der Entsorgung in den Ausguss wird der Inhalt des Kanisters durch Adsorption des Ethidiumbromids an Aktivkohle inaktiviert und die beaufschlagte Aktivkohle als fester Sonderabfall getrennt gesammelt.

Alternativen, wie die gebräuchlichen Fluoreszenzfarbstoffe „SYBR Green I“ und „SYBR Gold“ sind auch zur Quantifizierung in Fluoreszenzmessgeräten verwendbar. Ihre Vorteile liegen in einer reduzierten Mutagenität bei verbesserter Nachweisgrenze (20 pg DNA), die Nachteile in geringerer Lichtstabilität (und damit Wiederverwendbarkeit) sowie dem hohen Kostenaufwand [JANSOHN, 2007].

3.6.2 Geräte und Hilfsmittel

Tab. 3-17 Geräte und Hilfsmittel zum Färben, Entfärben und Fotografieren der Agarosegele

Gerät / Hilfsmittel	Beschreibung	Hersteller
Entfärbewanne	-	-
Färbewanne	-	-
Kamera	Model 810	GeneXpress
Kolbenhubpipetten	50 µl	Socorex
Messer	20 cm	-
Meßzylinder	1000 ml	Duran
PC-Software	GeneScope V1.73 for BioSens Gel Imaging System	Shanghai Bio-Tech
Pipettenspitzen	200 µl, gelb	SARSTEDT
Rührwerk	RE 16; zur Dekontamination der EtBr-Lösung	IKA-Rührwerk
Sondermüllkanister	30 l	NEUBER
Untersuchungshandschuhe	Nitrile, puderfrei, blau	TOP GLOVE

3.6.3 Reagenzien und Lösungen

(a) Reagenzien

Tab. 3-18 Reagenzien zum Färben der Agarosegele

Reagenz	Beschreibung	Hersteller
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	A2218.2; 1 %	Roth
EtBr “Green Bag” Disposal Kit	1123 50 200	MP Biomedical

(b) Lösungen

Färbelösung (rd. 1 µg EtBr/ml)

70 µl Ethidiumbromid (1 %ige EtBr-Stammlösung) mit
700 ml deionisiertem Wasser (steril) mischen

Entfärbelösung

900 ml gebrauchter 0,5x TBE-Elektrophoresepuffer

3.6.4 Durchführung

Bei den folgenden Arbeitsschritten müssen Schutzbekleidung sowie Nitril-Handschuhe getragen werden:

- 700 ml dest. Wasser (steril) in die Färbewanne gießen und 70 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) hineinpipettieren
- Agarosegel von der Trägerplatte lösen und vorsichtig in die Färbelösung legen (Vorsicht: Spritzgefahr!)
- Eine Stunde in der Färbewanne belassen
- In eine weitere Wanne (=Entfärbewanne) 900 ml gebrauchten 0,5x TBE-Elektrophoresepuffer füllen
- Gel für eine weitere halbe Stunde in der Entfärbelösung belassen (Das Gel muss sofort nach dem Entfärben fotografiert werden, da die Interkalation von EtBr, und somit die Fluoreszenz-Emission unter UV-Licht der auf dieser Art gefärbten Nukleinsäuren, nicht dauerhaft bestehen bleibt)
- Gel vorsichtig aus der Entfärbelösung nehmen und mit dem Messer halbieren

- Die Gelhälften (eine nach der anderen) luftblasenfrei auf den UV-Transilluminator legen und das Gerätetürchen schließen, UV-Licht einschalten
- Kamera-Software starten, das Gel mit verschiedenen Belichtungszeiten fotografieren und die jeweilige Bilddatei im persönlichen Ordner am Netzwerk abspeichern
- Die EtBr-kontaminierten Gele und Handschuhe werden in einem Abfallkübel für Sondermüll entsorgt, alle EtBr-haltigen Lösungen werden nach Verwendung in einen eigens dafür vorgesehenen Sondermüllkanister gegossen (siehe *Kapitel 3.6.1*)

3.7 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

3.7.1 Allgemeines

Das Funktionsprinzip der konventionellen Gel-Elektrophorese beruht im Großen und Ganzen auf einem Siebeffekt der DNA-Moleküle, welche jedoch nur bis zu einer gewissen Größe effektiv aufgetrennt werden. Demgegenüber ermöglicht die Pulsfeld-Gelelektrophorese die Auftrennung großer DNA-Fragmente, welche zuvor durch Schneiden der gesamt-genomischen DNA mit selten schneidenden Restriktionsenzymen entstanden. Diese Fragmente werden in einem gepulsten, ständig die Orientierung wechselnden elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt, da sich die fadenförmigen DNA-Moleküle immer wieder nach Richtung des elektrischen Spannungsfeldes ausrichten müssen, und diese Reorientierung bei langen Molekülen langsamer als bei Kürzeren erfolgt; daher besitzen kleinere DNA-Fragmente eine entsprechend längere „Wanderstrecke“ im Agarosegel. Auf Stammebene wird diese Methode aufgrund ihrer hervorragenden Trennschärfe als „Gold-Standard“ der DNA-Fingerprint-Verfahren betrachtet, infolge des hohen Arbeitsaufwandes ist sie bei großen Probenzahlen allerdings nur eingeschränkt geeignet [KNEIFEL und DOMIG, 2009; KNIPPERS, 2006; MAYER et al., 2007; AXELSSON, 2004; BERNARDEAU et al., 2008].

Die Einteilung der Kapitel *Probenvorbereitung, Gelvorbereitung, Elektrophorese, Färben, Entfärben und Fotografieren* erfolgt nach Tagen, da die fortlaufende Durchführung einiger aufeinanderfolgender Arbeitsschritte am selben Tag unabdingbar ist, und die anschließenden Inkubationszeiten 18 bis 24 Stunden betragen.

3.7.2 Probenvorbereitung

3.7.2.1 Geräte und Hilfsmittel

Tab. 3-19 Geräte und Hilfsmittel zur Probenvorbereitung der PFGE

Gerät / Hilfsmittel	**Beschreibung**	**Hersteller**
Analysenwaage	Mettler AE 163	MettlerToledo
Cell-Saver-Spitzen	1000 µl, premium	Biozym
Eppendorf-Reaktionsgefäße	1,5 ml; 2 ml	Eppendorf
Fingerschüttler	MS1	IKA
Insert-Mulden	170-3713; CHEF Disposable Plug Mold: 10 x 5 x 1,5 mm	Bio-Rad
Kolbenhubpipette	5 ml	Socorex
Kolbenhubpipetten	20 µl; 100 µl; 200 µl; 1 ml	GILSON
Magnetrührer	IKAMAG® RCT	IKA
Magnetrührstäbchen	-	-
Messkolben	5 l	Schott/Duran
Messzylinder	50ml; 100 ml; 250 ml; 1000 ml	Duran
Mikrowelle	R-207	Sharp
Petrischale	Glas	-
Pipettenspitzen	20 µl; 100 µl; 200 µl; 1 ml; 5 ml	Biozym
Polystyrolgefäße (=Sterilins)	30 ml	Sterilin
Schraubflaschen	100 ml; 250 ml	Schott/Duran
Schüttel- [teil] Inkubator [teil]	Unimax 1010 (= Schüttelteil) Inkubator 1000 (= Temperaturteil)	Heidolph Heidolph
Skalpell	MARTOR, No. 11	Solingen
Spatel	diverse Größen	-
Thermoblock	Bioer Heating Block HB-202	Biozym
Thermomixer	Bioer Mixing Block MB-102	Biozym
Untersuchungshandschuhe	Latex, puderfrei	TOP GLOVE
Wasserbad	W16	HGL

3.7.2.2 Reagenzien und Lösungen

(a) Reagenzien

Tab. 3-20 Reagenzien zur Probenvorbereitung der PFGE

Reagenz	Beschreibung	Hersteller
Borsäure ≥ 99,5 %, p.a.	P010.3	Roth
BSA-Lösung (100x), 10 mg/ml	9001	BioLabs
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	A1104.1000	AppliChem
Low Melting Agarose	840.101	Biozym
Lysozym	L-7641	Sigma
NaOH, 99 %	9356.5	Roth
NEBuffer 2 (10x)	B7002S	BioLabs
NEBuffer 3 (10x)	B7003S	BioLabs
NEBuffer 4 (10x)	B7004S	BioLabs
N-Laurylsarcosine-Na ≥ 94 %	L9150	Sigma
Proteinase K	7528.8	Roth
Restriktionsenzyme	siehe *Tab. 3-20*	BioLabs
Salzsäure, 32 %, p.a.	1.00319	Merck
SDS	A1112.0100	AppliChem
Tris Pufferan® ≥ 99,3 %	AE15.3	Roth

(b) Lösungen

EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8)

18,61 g EDTA
2 g NaOH
in 80 ml UHQ-Wasser lösen,
mit konz. NaOH auf pH 8 einstellen,
auf 100 ml mit UHQ-Wasser auffüllen, mischen und autoklavieren

EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8,5)

18,61 g EDTA
2 g NaOH
in 80 ml UHQ-Wasser lösen,
mit konz. NaOH auf pH 8,5 einstellen,
auf 100 ml mit UHQ-Wasser auffüllen, mischen und autoklavieren

EDTA-Puffer (50 mM; pH 8,5)

10 ml EDTA-Puffer (0,5 M; pH 8,5)
mit 90 ml UHQ-Wasser (steril) mischen

TBE-Puffer (5 x)

54 g TRIS
27,5 g Borsäure
20 ml EDTA (0,5 M; pH 8)
in UHQ-Wasser lösen, auf 1 l auffüllen und autoklavieren

TBE-Puffer (0,5 x)

100 ml TBE-Puffer (5 x) mit
900 ml UHQ-Wasser (steril) mischen (1:10 Verdünnung)

Low Melting Agarose Lösung (1 %): *für die Insertherstellung*

1 g Low Melting Agarose mit
100 ml EDTA (50 mM; pH 8,5)
in der Mikrowelle aufschmelzen und
in das auf 50℃ temperierte Wasserbad stellen

Low Melting Agarose Lösung (0,8 %): *für die Insertfixierung im Gel*

800 mg Low Melting Agarose mit
100 ml 0,5x TBE-Puffer
in der Mikrowelle aufschmelzen und
in das auf 50℃ temperierte Wasserbad stellen

Lyse-Lösung (0,2 % Lysozym; 0,05 % N-Laurylsarcosine-Na):

für 1 Stamm à 5 Inserts
8 mg Lysozym in
4 ml EDTA-Puffer (50 mM; pH 8,5) lösen,
2 mg N-Laurylsarcosine-Na in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß einwiegen
und zur Lysozym-Lösung hinzugeben

SDS-Lösung (10 %)

10 g SDS mit UHQ-Wasser auf 100 ml auffüllen

Tris-HCl-Puffer (1 M; pH 8)

12,11 g Tris

in 80 ml UHQ-Wasser lösen,

mit konz. HCl auf pH 8 einstellen,

auf 100 ml mit UHQ-Wasser auffüllen, mischen und autoklavieren

NDS-Lösung

2 ml Tris-HCl-Puffer (1 M; pH 8)

20 ml SDS-Lösung (10%; steril) auf

200 ml mit EDTA-Lösung (steril; 0,5 M; pH 8,5) auffüllen und mischen

NDS/Proteinase K-Lösung (0,2 %)

für 1 Stamm à 5 Inserts

4 mg Proteinase K in

4 ml NDS-Lösung (auf 50℃ temperiert) lösen

Restriktionsenzym-Puffer (900 µl/Insert)

mit BSA-Anteil:	ohne *BSA-Anteil:*
90 µl Enzympuffer-Konzentrat (10x)	90 µl Enzympuffer-Konzentrat (10x)
801 µl UHQ-Wasser (steril)	810 µl UHQ-Wasser (steril)
9 µl BSA-Konzentrat (100x)	

Restriktionsenzym-Lösung (300 µl/Insert)

Enzymkonzentration: [10 U/µl] oder

[20 U/µl] ➔ 1 µl Enzym mit

300 µl Restriktionsenzym-Puffer mischen

Enzymkonzentration: [50 U/µl] ➔ 0,4 µl Enzym mit

300 µl Restriktionsenzym-Puffer mischen

TE-Puffer (pH 8)

1000 µl Tris-HCl (1 M; pH 8) steril
200 µl EDTA (0,5 M; pH 8) steril auf
100 ml mit sterilem UHQ-Wasser auffüllen und mischen

Restriktionsenzyme

Die Analyse der isolierten Nucleinsäuren ist, durch deren Vorliegen als kompakte bzw. hochmolekulare Struktur, in den seltensten Fällen *unmittelbar* möglich. Daher wird die DNA mittels Restriktionsenzymen, die meist bakteriellen Ursprungs sind, in kleinere Fragmente genau definierter Länge zerlegt. Diese Fragmente entstehen durch die Fähigkeit der Enzyme, je nach ihren spezifischen Erkennungssequenzen an doppelsträngige DNA-Moleküle zu binden, und die Phosphodiesterbindung beider DNA-Stränge hydrolytisch zu spalten.

Die Restriktionsenzyme, die in der Analytik zum Einsatz kommen, gehören üblicherweise dem Typ II an, welche im Gegensatz zu Typ-I und Typ-III-Restriktionsenzymen nur eine Restriktionsaktivität, und nicht auch noch eine Methylierungsaktivität, besitzen.

Typ-II-Restriktionsenzyme erzeugen Fragmente definierter Länge mit definierten Enden durch die Spaltung der DNA innerhalb ihrer definierten Erkennungssequenz. Typ-I und Typ-III-Restriktionsenzyme erzeugen hingegen, durch die Spaltung der DNA an einem zur spezifischen Erkennungsstelle definierten Abstand, Bruchstücke definierter Länge, jedoch mit variablen Enden.

Durch die Spaltung innerhalb der meist palindromischen, vier bis acht Nucleotide langen Erkennungssequenz, welche konventionsgemäß in 5'–3'-Richtung angegeben wird, können enzymspezifisch drei verschiedene Typen von DNA-Enden entstehen: Kohäsive Enden (engl.: *„sticky ends“*) mit 5'-überhängenden- oder 3'-überhängenden Enden, und stumpfe Enden (engl.: *„blunt ends“*).

Meistens werden Restriktionsenzyme mit Erkennungssequenzen, die sechs Basen lang sind, verwendet, da die resultierenden Fragmente gut auftrennbar sind [LOTTSPEICH und ENGELS, 2006].

In *Tabelle 3-21* sind alle verwendeten Restriktionsenzyme sowie deren Spezifikationen angeführt.

Tab. 3-21 Spezifikationen der verwendeten Restriktionsenzyme der PFGE
(N) ist entweder: A oder C oder G oder T

Enzym	Schnittsequenz (5'→3'), (3'→5')	Puffer	Inkubations-temperatur	Units/µl
Apa I	5'…GGGCC↓C…3' 3'…C↑CCGGG…5'	NEB 4 + BSA	25 ℃	50
Not I	5'…GC↓GGCCGC…3' 3'…CGCCGG↑CG…5'	NEB 3 + BSA	37 ℃	10
Sac II	5'…CCGC↓GG…3' 3'…GG↑CGCC…5'	NEB 4	37 ℃	20
Sal I	5'…G↓TCGAC…3' 3'…CAGCT↑G…5'	NEB Sal + BSA oder NEB 3 + BSA	37 ℃	20
Sfi I	5'…GGCCNNNN↓NGGCC…3' 3'…CCGGN↑NNNNCCGG…5'	NEB 2 + BSA	50 ℃	20
Xba I	5'…T↓CTAGA…3' 3'…AGATC↑T…5'	NEB 2 + BSA	37 ℃	20

3.7.2.3 Durchführung

1. Tag: Insertherstellung und Zelllyse

- Low Melting Agarose Lösung (1 %, für die Insertherstellung) nach dem Aufschmelzen in der Mikrowelle in das auf 50 ℃ temperi erte Wasserbad stellen
- Herstellung der Lyse-Lösung nach dem Schema n+1 (n=Probenanzahl), da Pipettierverluste berücksichtigt werden müssen (siehe *Kapitel 3.4.4*):
  4 ml EDTA/ Probe in eine sterile Schraubflasche füllen,
  8 mg Lysozym/Probe in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß einwiegen, in die Schraubflasche überführen und im Schüttelinkubator (37 °C, 200 rpm) lösen
- 2 mg N-Laurylsarcosine-Na/Probe im vorigen Eppendorf-Reaktionsgefäß einwiegen, zur Lysozym-Lösung hinzugeben (Eppi mit 1 ml Lösung spülen) und ebenfalls im Schüttelinkubator lösen lassen
- Große Petrischale aus Glas mt Ethanol auswischen
- Insertmulden (mit Handschuhen) auseinanderbrechen, beschriften (5 Mulden/Stamm) und in die vorbereitete Petrischale legen

- Jedes Proben-Zellmassenpellet wird in 100 µl EDTA (50 mM; pH 8,5) resuspendiert, und mittels Fingerschüttler bis zum Vorliegen einer homogenen Suspension gemischt
- 600 µl der 1 %igen Low Melting Agarose Lösung mittels Cell-Saver-Spitze zur Suspension pipettieren und durch 3-4 maliges Aufsaugen mischen
- ZM-EDTA-Puffer-Gel-Gemisch luftblasenfrei in Insertmulden pipettieren, sodass an der künftigen Insertoberseite ein kleiner Gupf entsteht
- Die befüllten „Molds“ in der zugedeckten Petrischale für mindestens eine Stunde bei 4 ℃ in den Kühlschrank stellen
- In der Zwischenzeit werden Polystyrolgefäße (30 ml) in der Anzahl der Proben beschriftet, mit je 4 ml Lyselösung (aus der Schraubflasche im Schüttel-inkubator) befüllt, und im Schüttelinkubator bei 37 ℃ und 200 rpm inkubiert
- Nach mindestens einer Stunde werden die „Molds“ wieder aus dem Kühlschrank genommen, der Gupf mit einem sterilen Skalpell abgezogen, und die Inserts mittels beiliegendem Kunststoffspatel in die Sterilins gestoßen (nach jeder Probe muss das Skalpell abgeflammt und geputzt werden!)
- Die Inserts werden über Nacht (mindestens 24 Stunden) in den Sterilins, welche sich im Schüttelinkubator (bei 37℃ und 200 rpm) befinden, belassen

2. Tag: Proteinase K – Verdau

- NDS-Lösung solange in das auf 50 ℃ temperierte Wasserb ad stellen, bis sie klar ist (zwischendurch mehrmals schütteln)
- Lyse-Lösung vorsichtig von den Inserts mit der 5 ml Pipette absaugen
- Zu den Inserts nun 4 ml NDS-Lösung zusetzen, die NDS-Lösung wieder ins Wasserbad stellen
- Sterilins 30 min bei RT im Schüttelinkubator schütteln („Äquilibrieren“)
- In der Zwischenzeit: Herstellung der NDS/Proteinase K-Lösung nach dem Schema n+1 (s.o.):
  4 ml NDS-Lösung/Probe in eine sterile Schraubflasche füllen,
  4 mg Proteinase K/Probe in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß einwiegen, in die Schraubflasche überführen und im Schüttelinkubator oder Wasserbad bei 50 ℃ lösen

- NDS-Lösung vorsichtig von den Inserts absaugen
- 4 ml NDS/Proteinase K-Lösung in jedes Sterilin pipettieren
- Inserts bei 50 ℃ und 200 rpm über Nacht (mindestens 18 Stunden) im Schüttelinkubator belassen, sodass der Proteinase K-Überschuss durch Eigenverdau deaktiviert wird

3. Tag: Waschen der Inserts

- NDS/Proteinase K-Lösung vorsichtig absaugen
- Inserts mit 4 ml EDTA-Puffer (50 mM; pH 8,5) versetzen und im Schüttelinkubator für 30 min bei 200 rpm und RT waschen
- Der vorige Arbeitsschritt (=Waschvorgang) wird 8x wiederholt
- Die Inserts verbleiben in der letzten EDTA-Waschlösung, und werden bis zur weiteren Verwendung bei 4 ℃ im Kühlschrank gelagert

4. Tag: Schneiden mit Restriktionsenzym

- Pro Stamm wird ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß beschriftet und mit 400 µl TE-Puffer (pH 8) vorbereitet
- Aus jedem Sterilin wird ein Insert entnommen, in je ein vorbereitetes Eppendorf-Gefäß überführt und für 30 min bei 4 ℃ in den Kühlschrank gestellt
- Nach 30 min wird der TE-Puffer vorsichtig abgesaugt, 400 µl frischer TE-Puffer zugesetzt, und wieder für 30 min bei 4 ℃ in den Kühlschrank gestellt
- In der Zwischenzeit wird der Restriktionsenzympuffer (je nach gewähltem Enzym: mit – oder ohne BSA-Anteil, siehe *Tab. 3-21*) mit 10 %igem Pipettierverlustzuschlag pro Probe in einem Sterilin frisch zubereitet
- Der TE-Puffer wird zum zweiten Mal abgesaugt, durch 300 µl frischen Enzympuffer ersetzt und für 1 Stunde bei 4 ℃ in den Kühlschrank gestellt
- Nach 1 Stunde wird der Enzympuffer abgesaugt, durch 300 µl frischen Enzympuffer ersetzt und für 1 Stunde bei 4 ℃ in den Kühlschrank gestellt
- Kurz vor Ablauf der Stunde wird zur verbleibenden Menge Enzympuffer die entsprechende Menge Restriktionsenzym (ebenfalls mit 10 %igem Sicherheitszuschlag pro Probe) zugesetzt

- Der Enzympuffer wird zum zweiten Mal abgesaugt und durch 300 µl Enzymlösung ersetzt
- Die Inserts werden beim entsprechenden Temperaturoptimum des Restriktionsenzyms (siehe *Tab. 3-21)* über Nacht (mindestens 18 Stunden) im Thermomixer belassen
- Falls die Inserts nicht schon am nächsten Tag für die Elektrophorese verwendet werden, wird die Enzymlösung abgesaugt, durch 300 µl TE-Puffer ersetzt und mindestens 30 min bei 4 ℃ äquilibriert.
  Danach wird der TE-Puffer abgesaugt, durch 300 µl EDTA-Puffer (50 mM; pH 8,5) ersetzt und so können die Inserts über längere Zeit bei 4 ℃ gelagert werden.

3.7.3 Gelvorbereitung

3.7.3.1 Geräte und Hilfsmittel

Tab. 3-22 Geräte und Hilfsmittel zur Gelvorbereitung der PFGE

Gerät / Hilfsmittel	Beschreibung	Hersteller
Gelgießrahmen	15 x 15 cm, Gummi	Pharmacia
Gelträgerplatte	-	Pharmacia
Kolbenhubpipetten	100 µl; 200 µl; 1 ml	GILSON
Magnetrührer	IKAMAG® RCT	IKA
Magnetrührstäbchen	-	-
Messkolben	5 l	Schott/Duran
Mikrowelle	R-207	Sharp
Pipettenspitzen	100 µl; 200 µl; 1 ml	Biozym
Probenkamm & Halterungen	23 Zinken	Pharmacia
Schraubflaschen	100 ml; 250 ml	Schott/Duran
Skalpell	MARTOR, No. 11	Solingen
Spatel	diverse Größen	-
Untersuchungshandschuhe	Latex, puderfrei	Top Glove
Waage	PT 310	sartorius
Wasserbad	W16	HGL

3.7.3.2 Reagenzien und Lösungen

(a) Reagenzien

Tab. 3-23 Reagenzien zur Gelvorbereitung der PFGE

Reagenz	Beschreibung	Hersteller
Borsäure ≥ 99,5 %, p.a.	P010.3	Roth
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	A1104.1000	AppliChem
Low Melting Agarose	840.101	Biozym
Low Range PFG Marker	N0350S, 25 µg/ml, 0,13 kb bis 194 kb	BioLabs
NaOH, 99 %	9356.5	Roth
LE Agarose	840004	Biozym
Tris Pufferan® ≥ 99,3 %	AE15.3	Roth

(b) Lösungen

EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8)

18,61 g EDTA

2 g NaOH

in 80 ml UHQ-Wasser lösen,

mit konz. NaOH auf pH 8 einstellen,

auf 100 ml mit UHQ-Wasser auffüllen, mischen und autoklavieren

TBE-Puffer (5 x)

54 g TRIS

27,5 g Borsäure

20 ml EDTA (0,5 M; pH 8)

in UHQ-Wasser lösen, auf 1 l auffüllen und autoklavieren

TBE-Puffer (0,5 x)

100 ml TBE-Puffer (5 x) mit

900 ml UHQ-Wasser (steril) mischen (1:10 Verdünnung)

TE-Puffer (pH 8)

1000 µl Tris-HCl (1 M; pH 8) steril
200 µl EDTA (0,5 M; pH 8) steril auf
100 ml mit sterilem UHQ-Wasser auffüllen und mischen

Low Melting Agarose Lösung (0,8 %): *für die Insertfixierung im Gel*

800 mg Low Melting Agarose mit
100 ml 0,5x TBE-Puffer
in der Mikrowelle aufschmelzen und
in das auf 50 ℃ temperierte Wasserbad stellen

Agaroselösung (1,1 %): *für die Agarosegelherstellung*

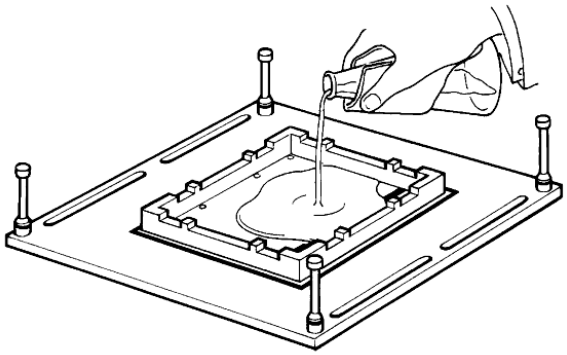
1,32 g LE Agarose mit
120 ml 0,5x TBE-Puffer
in der Mikrowelle aufschmelzen und
in das auf 50℃ temperierte Wasserbad stellen

3.7.3.3 Durchführung

5. Tag: (a) Gelvorbereitung

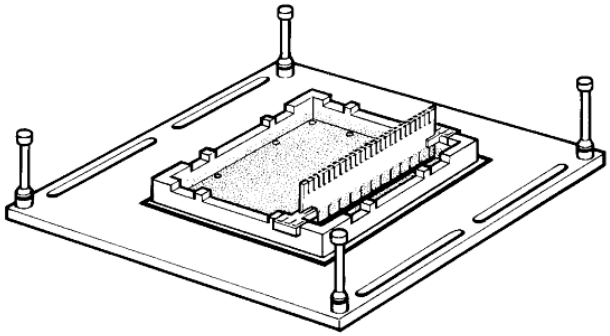
- 1,32 g LE-Agarose in einem sterilen 250 ml Schraubglas einwiegen und in 120 ml 0,5 x TBE-Puffer suspendieren
- Agarose-Suspension in der Mikrowelle aufkochen lassen und nach der ersten Dampfblasenbildung vorsichtig schwenken
- Vorigen Schritt so oft ausführen, bis die Lösung vollkommen klar ist und keine Schlieren mehr zu sehen sind
- Lösung für ca. 30 min in das auf 50℃ temperierte Wasse rbad stellen
- Gelträgerplatte und Gelgießrahmen mit Ethanol reinigen und auf waagrecht ausgerichteten Untergrund legen
- Agarosegel-Lösung (1,1 %) gleichmäßig und luftblasenfrei innerhalb des Gelgießrahmens auf die Gelträgerplatte gießen…

Abb. 3.7.3.3-1
Gelgießvorgang. Das Gel wird innerhalb des Gelgießrahmens luftblasenfrei auf die Gelträger-platte gegossen.



[QUELLE: GE HEALTHCARE, 2006]

…und Probenkamm unverzüglich einsetzen



[QUELLE: GE HEALTHCARE, 2006]

Abb. 3.7.3.3-2
Polymerisationsanordnung des Gels. Gegossenes Agarosegel mit eingesetztem Probenkamm (im Bild: Doppelkamm mit 12 bzw. 23 Zinken). Der Probenkamm wird seitlich mit Clips, die auf dem Gelgießrahmen aufliegen, fixiert.

- Gel polymerisiert eine Stunde bei RT bis zum weiteren Einsatz
- Die Enzymlösung der Inserts absaugen, durch 300 µl TE-Puffer ersetzen und mindestens 30 min bei 4 ℃ äquilibrieren
- Das Verguss-Agarose-Aliquot (Low Melting Agarose Lösung (0,8 %) für die Insertfixierung) in der Mikrowelle aufschmelzen und in das auf 50 ℃ temperierte Wasserbad stellen
- Nach einer Stunde wird der Probenkamm entfernt und die Probentaschen mit 0,5x TBE-Puffer gefüllt (Markertaschen freilassen)
- Ungefähr 1 mm Marker herausdrücken, mit dem abgeflammten Skalpell abschneiden und in die Mitte der Geltaschenwand (in Laufrichtung) kleben

- Inserts müssen eventuell in umgekehrter Reihenfolge (wenn das Gel auf der Gelträgerplatte „am Kopf“ steht) mit abgeflammtem Spatel und Skalpell eingebracht werden, die Größe des eingebrachten Inserts ist abhängig von der schon im Vorversuch ermittelten Bandenintensität. Wenn das Insert geteilt wird, sieht die runde Seite nach unten und der Schnitt nach oben. Das Insert wird bis zum Gelboden versenkt und an die Gelwand in Laufrichtung gedrückt.
- Nachdem sämtliche Proben und Marker eingebracht sind, wird der 0,5x TBE-Puffer in den Probentaschen wieder abgesaugt
- Die mit Proben bzw. Marker gefüllten Taschen werden mit Verguss-Agarose überschichtet, um ein mögliches Aufschwimmen der Inserts während der Elektrophorese zu unterbinden
- Nachdem die Verguss-Agarose erstarrt ist (ca. 15 min), kann die Elektrophorese gestartet werden

3.7.4 Elektrophorese

3.7.4.1 Geräte und Hilfsmittel

Tab. 3-24 Geräte und Hilfsmittel für die PFGE

Gerät / Hilfsmittel	Beschreibung	Hersteller
Elektrophorese-Einheit	Gene Navigator	Pharmacia
Hexagonale Elektrode	HEX Elektroden Kit 18-07-07	Pharmacia
Kühlanlage	MultiTemp III	Pharmacia Biotech
Pulsfeld-Einheit	GN Kontrolleinheit	Pharmacia Biotech
Stromversorgung	EPS 301	Pharmacia Biotech
Untersuchungshandschuhe	Latex, puderfrei	TOP GLOVE
Wasserwaage	-	-

3.7.4.2 Lösungen

TBE-Puffer (5 x)

54 g TRIS

27,5 g Borsäure

20 ml EDTA (0,5 M; pH 8)

in UHQ-Wasser lösen, auf 1 l auffüllen und autoklavieren

TBE-Laufpuffer (0,5 x)

250 ml TBE-Puffer (5 x), steril mit

2250 ml UHQ-Wasser (steril) mischen (1:10 Verdünnung)

3.7.4.3 Durchführung

5. Tag: (b) Pulsfeld-Gelelektrophorese

- Kühlung der Elektrophorese-Einheit (10 ℃) einschalten
- Kontrolle, ob die Elektrophorese-Einheit waagrecht steht
- 2,5 Liter 0,5x TBE-Laufpuffer in das Gerät einfüllen und die Umwälzpumpe einschalten
- Gelgießrahmen entfernen und die Gelträgerplatte samt Gel in die Elektrophorese-Einheit einsetzen
- Elektrode über der Platte an das Gerät stecken, Elektroden aufklemmen und den Deckel schließen (siehe *Abb. 3.7.4.3-1*)

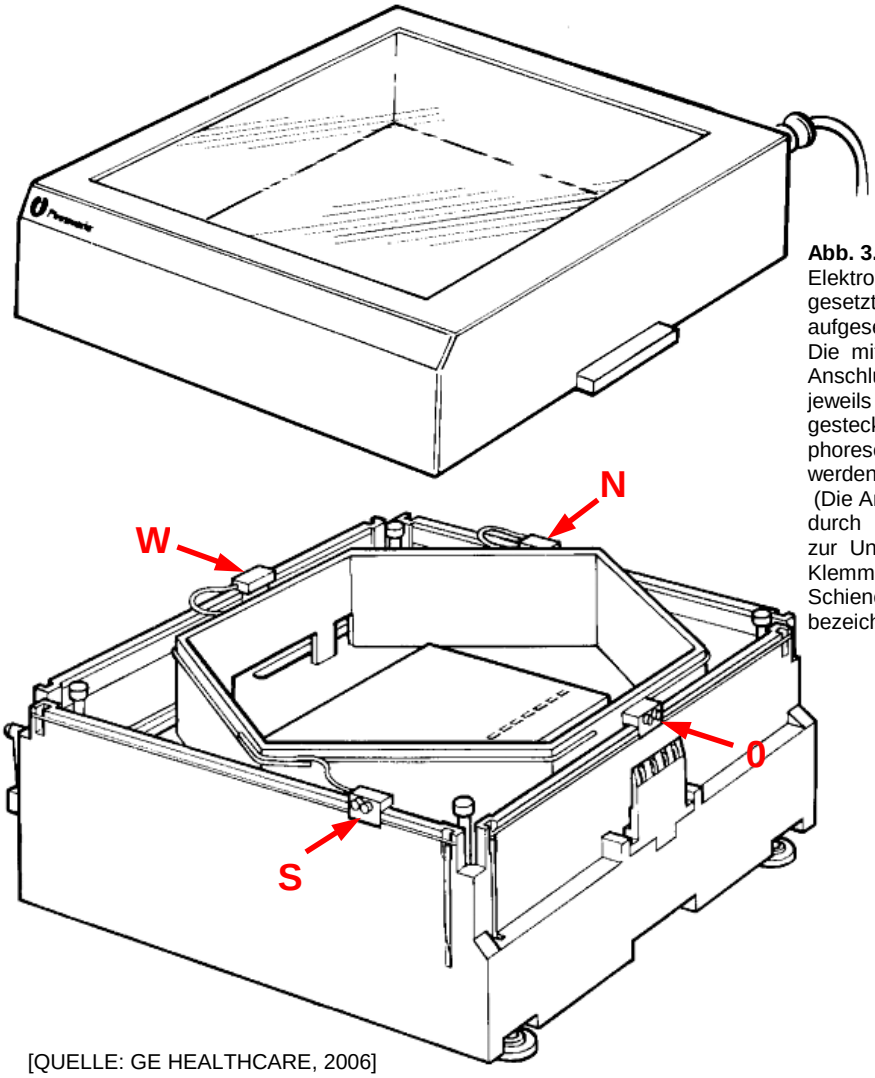


Abb. 3.7.4.3-1
Elektrophorese-Einheit mit eingesetzter Gelträgerplatte und aufgesetzter, hexagonaler Elektrode. Die mit der Elektrode verbundenen Anschlussklemmen werden auf die jeweils stromführenden Schienen gesteckt. Vor dem Start der Elektrophorese muss der Deckel aufgesetzt werden.
(Die Anschlussklemmen sind im Bild durch rote Pfeile gekennzeichnet; zur Unterscheidung werden sowohl Klemmen, als auch die zugehörigen Schienen mit Himmelsrichtungen bezeichnet)

[QUELLE: GE HEALTHCARE, 2006]

- Kontrolleinheit einschalten und Eingabe der (variablen) Pulszeit:
  Die *Konfiguration der Pulszeit* begründet sich in der Größe der aufzutrennenden Moleküle: Längere Pulszeiten lösen größere Moleküle besser auf, kürzere Pulszeiten analog die kleineren. Die Trennungen können bis zu mehreren Tagen andauern [WESTERMEIER, 1990].

  fixe Parameter sind: Laufzeit……24 h
  Leistung……30 W
  Spannung……175 V
  max. Stromstärke……200 mA

- *Stromversorgung der Elektrophorese-Einheit* und *Kontrolleinheit* gleichzeitig einschalten, die Elektrophorese beginnt

3.7.5 Färben, Entfärben und Fotografieren

Färbelösung (rd. 1 µg EtBr/ml)

60 µl Ethidiumbromid (1 %ige EtBr-Stammlösung) mit
600 ml deionisiertem, autoklaviertem Wasser mischen

Entfärbelösung

gebrauchter 0,5x TBE-Laufpuffer

Das Färben, Entfärben und Fotografieren der Agarosegele erfolgt wie in *Kapitel 3.6* beschrieben.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 RAPD-PCR

Die Amplifikation der zuvor isolierten DNA wurde mittels RAPD-PCR (wie in *Kapitel 3.4.4* erläutert) durchgeführt.
Unter Zuhilfenahme der typischen Bandenmuster, die nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte resultieren, können die Stämme gut differenziert bzw. identifiziert werden. Um Unterscheidung bzw. Gleichheit der Stämme zu untermauern, wurden die *Lactobacillus*-Isolate im Sinne einer DNA-Fingerprint-Analyse mit mehreren RAPD-Primern, die aus jeweils rund zehn beliebigen Nucleotiden bestehen, untersucht. Die Auswertung der erhaltenen DNA-Bandenspektren erfolgte visuell.

4.1.1 Lactobacillus buchneri – Versuchsreihe $1^{(N)}$

Die insgesamt acht Stämme (sechs *Lb. buchneri*-Stämme der Versuchsreihe $1^{(N)}$ (siehe *Tab. 3-2*), der institutseigene Typstamm (Lb 32^{T}) und der Typstamm des externen Auftraggebers (LAC 727)) wurden mittels RAPD-PCR und allen zur Verfügung stehenden 55 Zufallsprimern (siehe *Tab.3-9*) analysiert.
Die Untersuchung sollte folgende drei Fragen beantworten:

- Unterscheiden sich die sechs Teststämme vom Typstamm LAC727 ?
- Unterscheiden sich die „A-Isolate“ vom LAC 905 ? und
- Unterscheiden sich die zwei Isolate A 100-1 und A 100-1* voneinander ?

Jene Bandenspektren der RAPD-Primer, die eine Differenzierung der Stämme untereinander erlauben, sowie ein Teil der unspezifischen Bandenmuster, die keine Differenzierung der Probeisolate zulassen, sind im Anschluss angeführt.
Die restlichen Abbildungen, deren Auswertung keine weiteren Hinweise liefern, befinden sich im Anhang (siehe *Kapitel 9*).

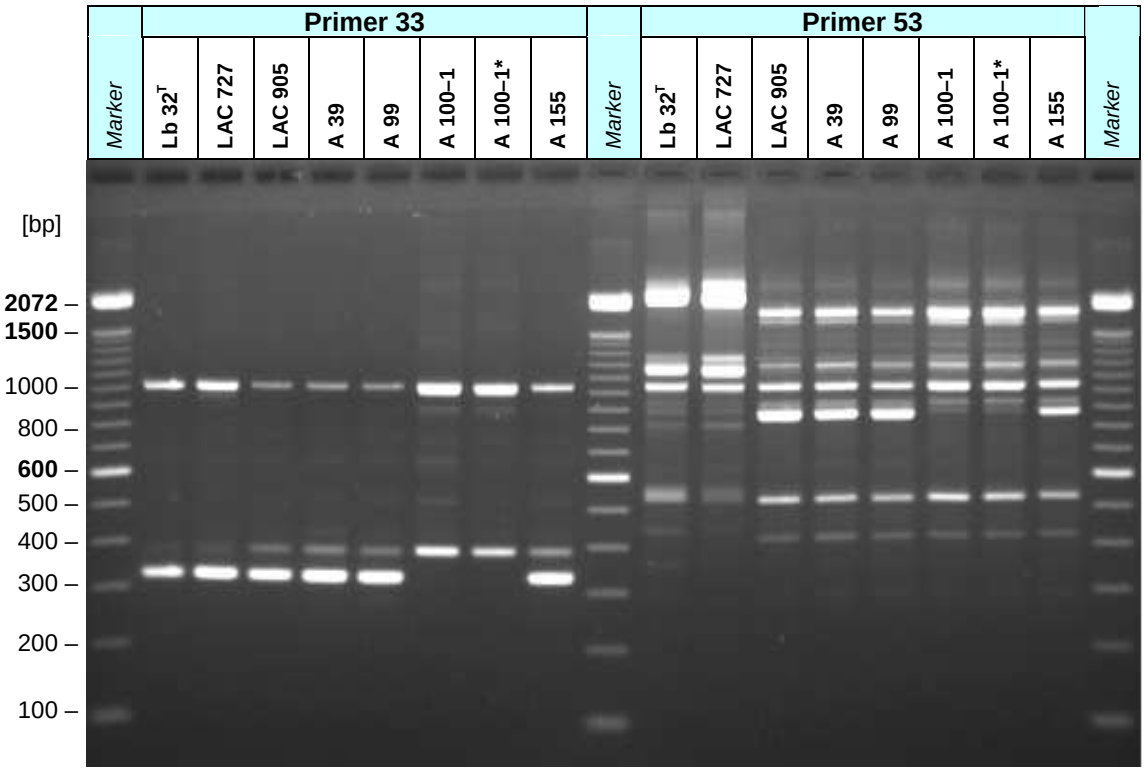


Abb. 4.1.1-1 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 33 und 53.

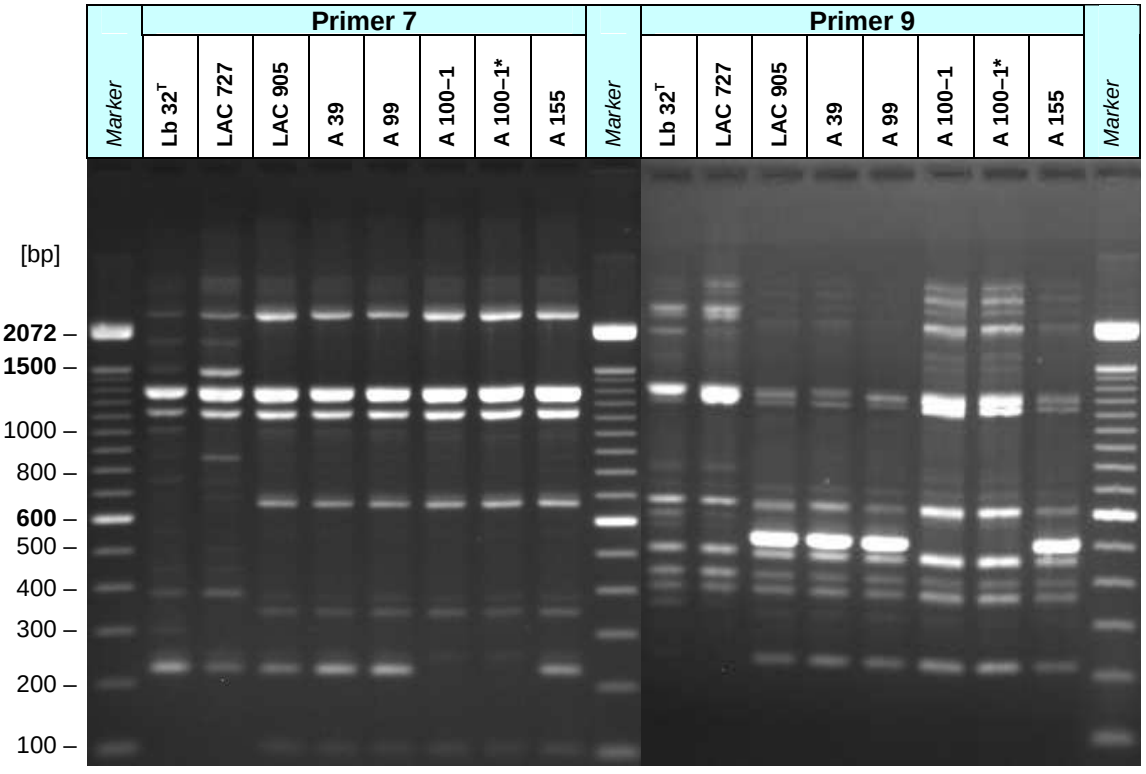


Abb. 4.1.1-2 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 7 und 9.

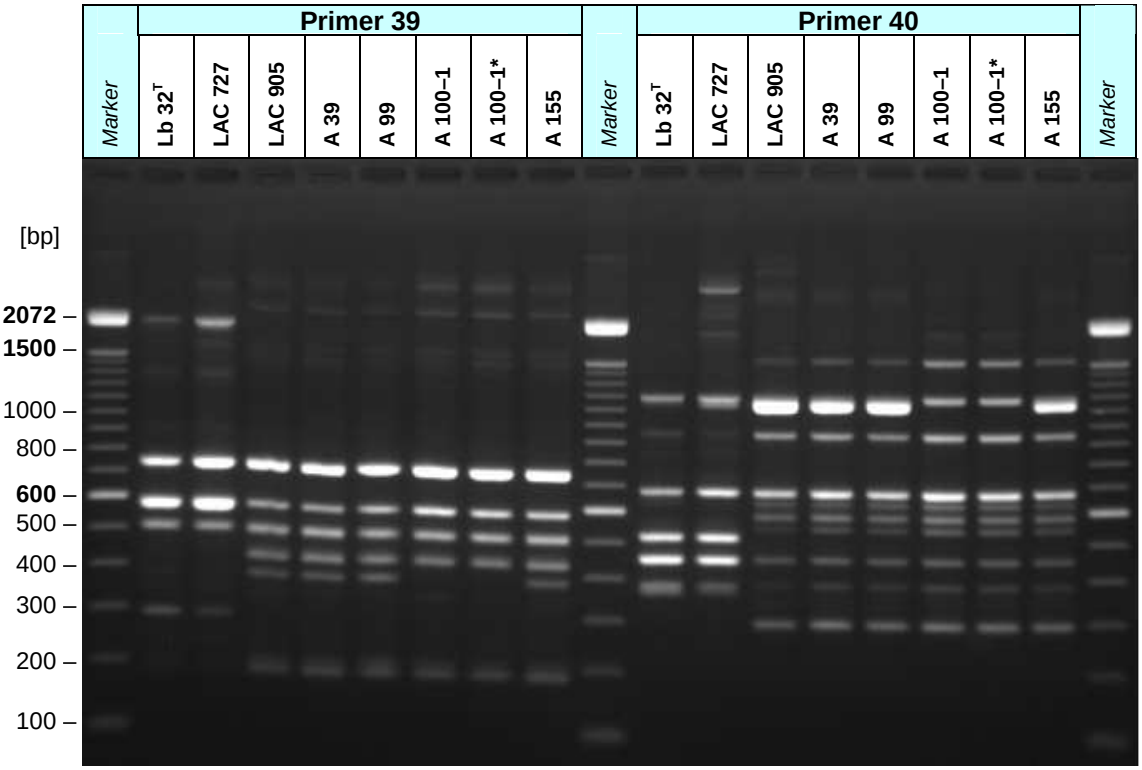


Abb. 4.1.1-3 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 39 und 40.

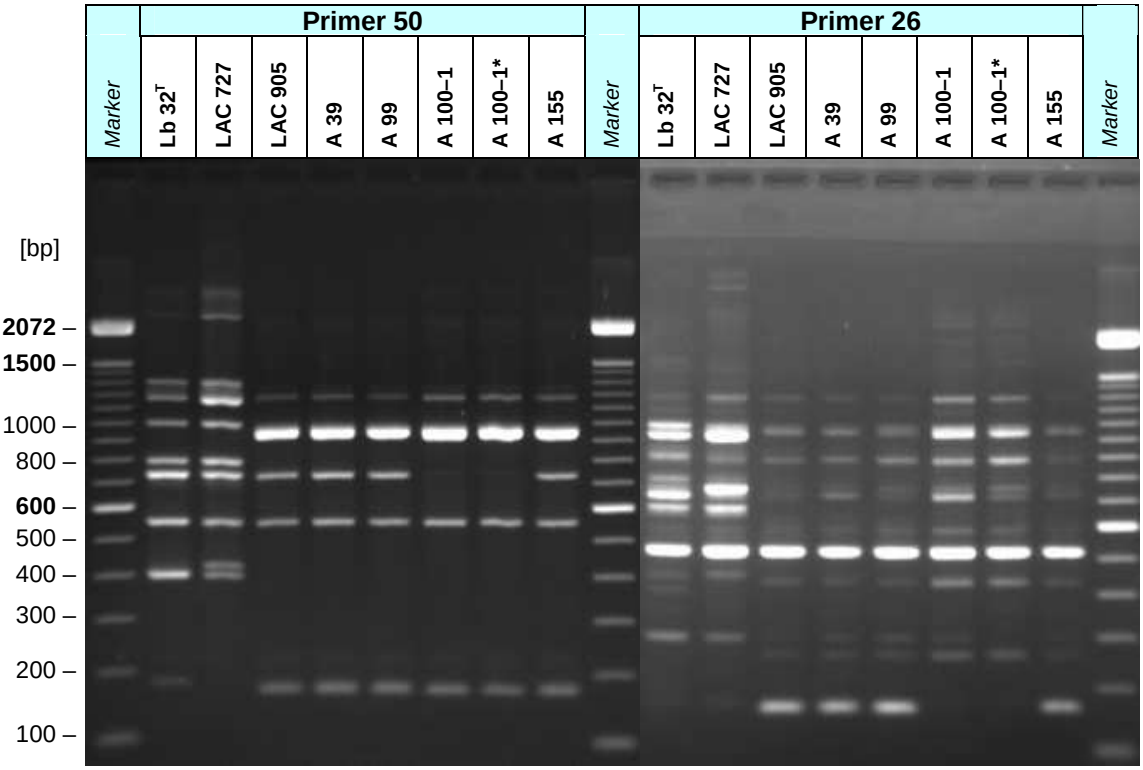


Abb. 4.1.1-4 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 50 und 26.

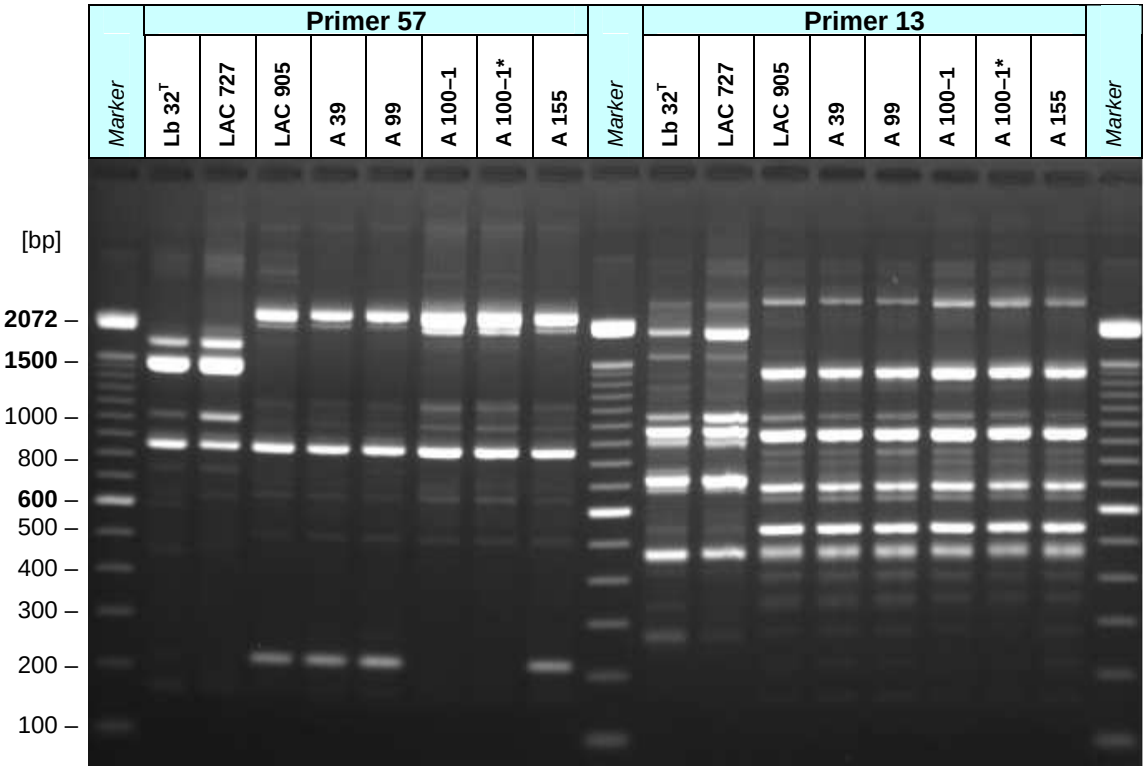


Abb. 4.1.1-5 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 57 und 13.

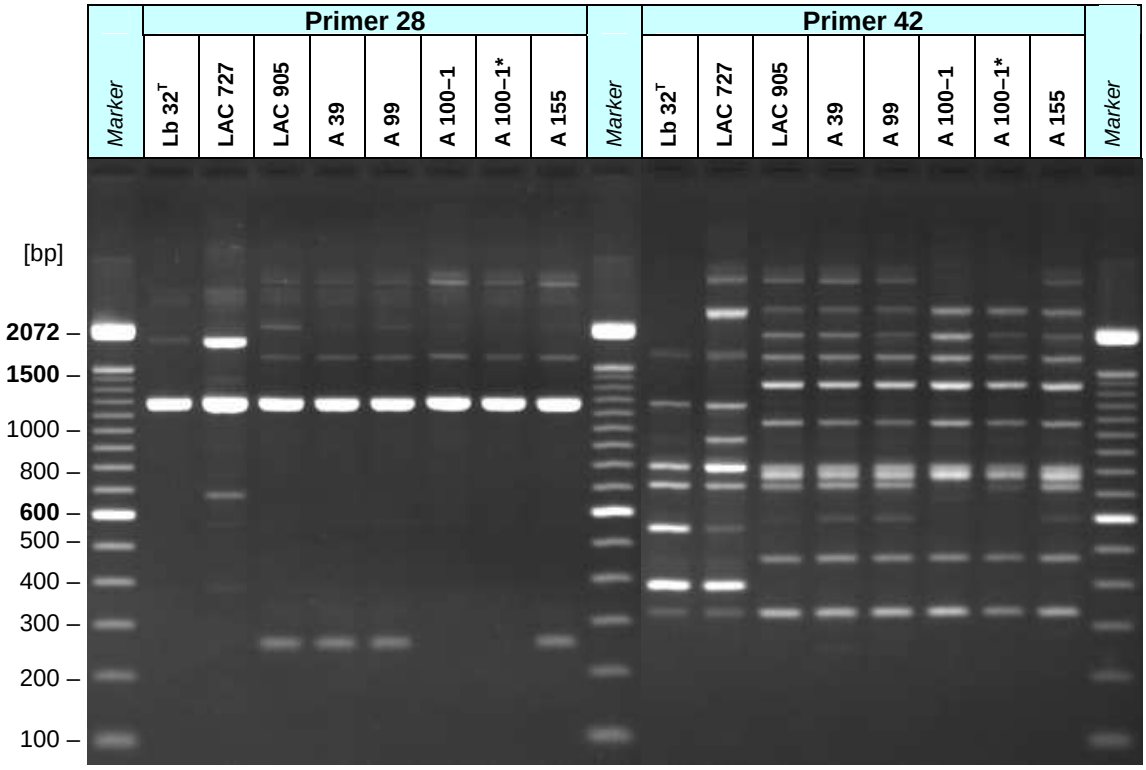


Abb. 4.1.1-6 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 28 und 42.

Unter der Verwendung des RAPD-Primers 33 ist bei allen Isolaten auf einer Höhe von 330 bp eine charakteristische Bande sichtbar, die bei den Stämmen A 100-1 und A 100-1* fehlt, somit erfolgt hier bereits eine erste Differenzierung. Auch bei Primer 53 fehlt bei beiden Stämmen der „100er-Serie“ die markante Bande bei 870 bp, bei Primer 7 fehlt eine für die anderen Isolate typische Bande im niedermolekularen Bereich bei 230 bp. RAPD-Primer 9 ermöglicht eine Unterscheidung der zwei Stämme aufgrund der fehlenden Bande bei 500 bp im Vergleich zu den anderen Probeisolaten; die stärkere Intensität der Banden im Bereich von 600 bis >2072 bp muss vernachlässigt werden, da bei den restlichen Isolaten die selben Banden ebenfalls vorhanden sind, und diese somit nicht für eine Unterscheidung herangezogen werden können. Mit Primer 39 wird der Unterschied der Stämme A 100-1 und A 100-1* durch die fehlende Bande bei 380 bp nachgewiesen, bei dem RAPD-Primer 40 fehlt die charakteristische Bande bei 1150 bp, knapp unter der Bande bei 1200 bp, die jedoch wieder bei allen Isolaten vorhanden ist. Primer 50 demonstriert die Differenz der beiden Stämme von den restlichen Isolaten durch die Abwesenheit der kennzeichnenden Bande bei 730 bp, bei Primer 26 fehlt die Bande bei 170 bp, beim RAPD-Primer 57 bei 220 bp und beim Primer 28 fehlt sie bei 260 bp. Bei Primer 42 fehlen sogar zwei Banden, nämlich eine bei 600 bp und die Zweite im Bereich >2072 bp. Alle Bandenspektren der in den *Abbildungen 4.1.1-1* bis *4.1.1-6* verwendeten elf Zufallsprimer (33, 53, 7, 9, 39, 40, 50, 26, 57, 28 und 42) ermöglichen somit eine eindeutige Unterscheidung der zwei Isolate A-100-1 und A-100-1* von den vier Probeisolaten (LAC 905, A 39, A 99, A 155), wobei sich die beiden Stämme untereinander nicht differenzieren lassen: Ein identer DNA-Fingerprint wird durch alle 55 eingesetzten Primer bestätigt.

Die Mehrzahl der verwendeten Primer (die Primer 30, 32 und 33 beispielsweise sind infolge der marginalen Disparität des Bandenmusters weniger gut zur Interpretation geeignet) gestattet weiters eine eindeutige Abgrenzung der sechs Proben vom Typstamm LAC 727 bzw. Lb 32^T, womit sich dessen Ungleichheit bestätigt.

Teilweise schwach sichtbare Banden sind auf Artefakte zurückzuführen.

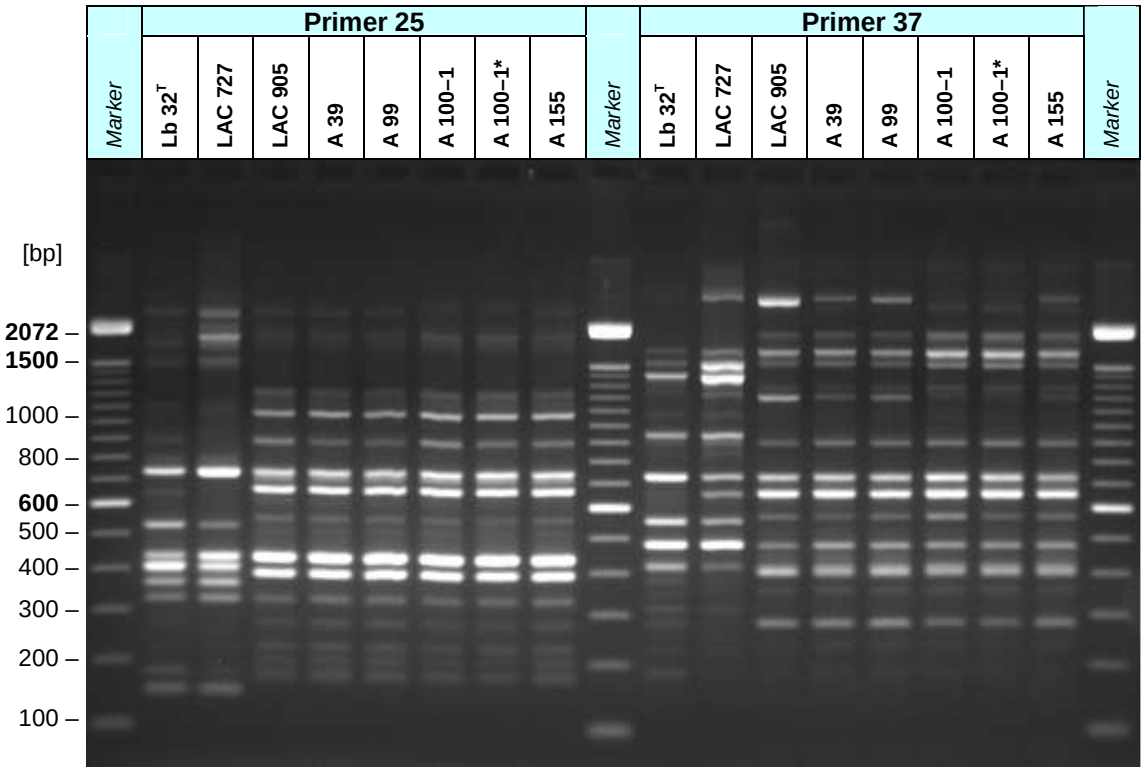


Abb. 4.1.1-7 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 25 und 37.

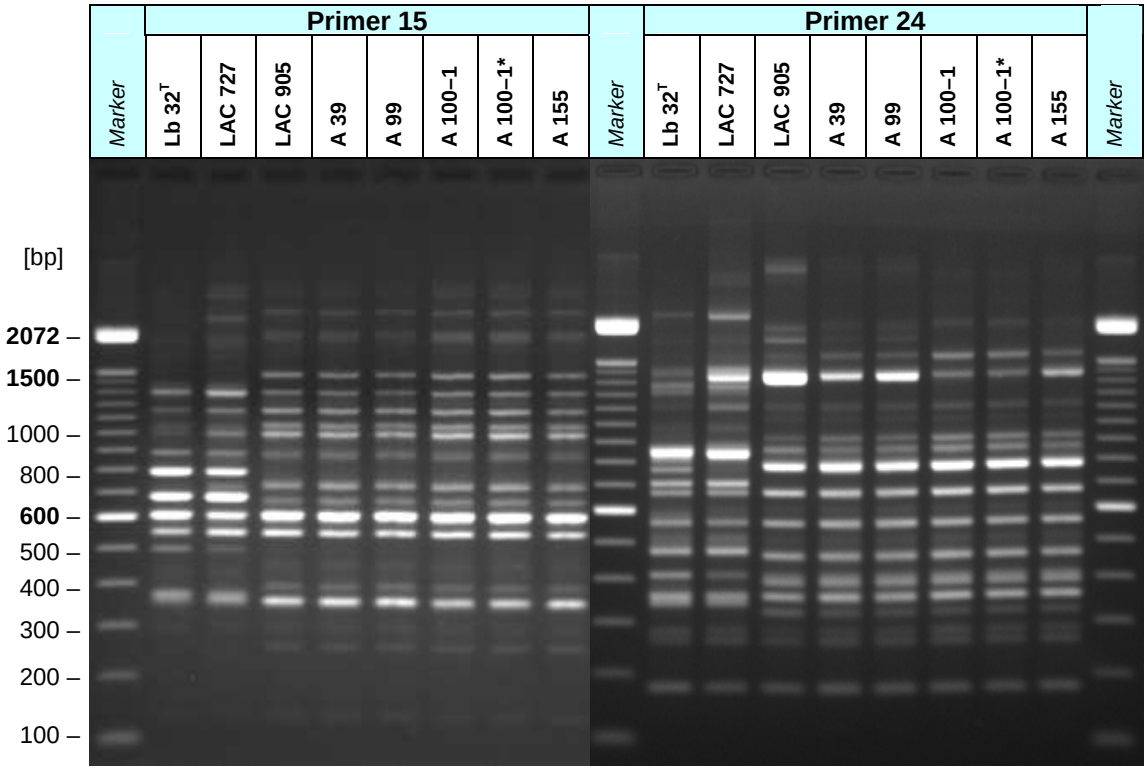


Abb. 4.1.1-8 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 15 und 24.

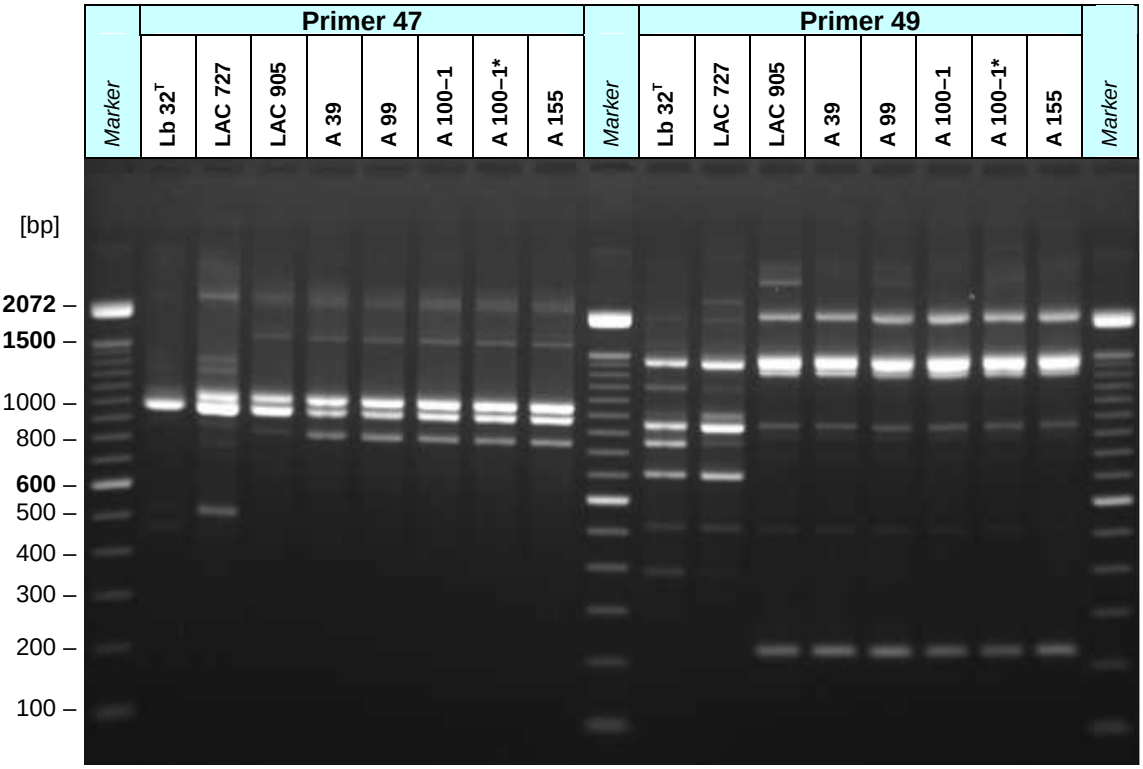


Abb. 4.1.1-9 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 47 und 49.

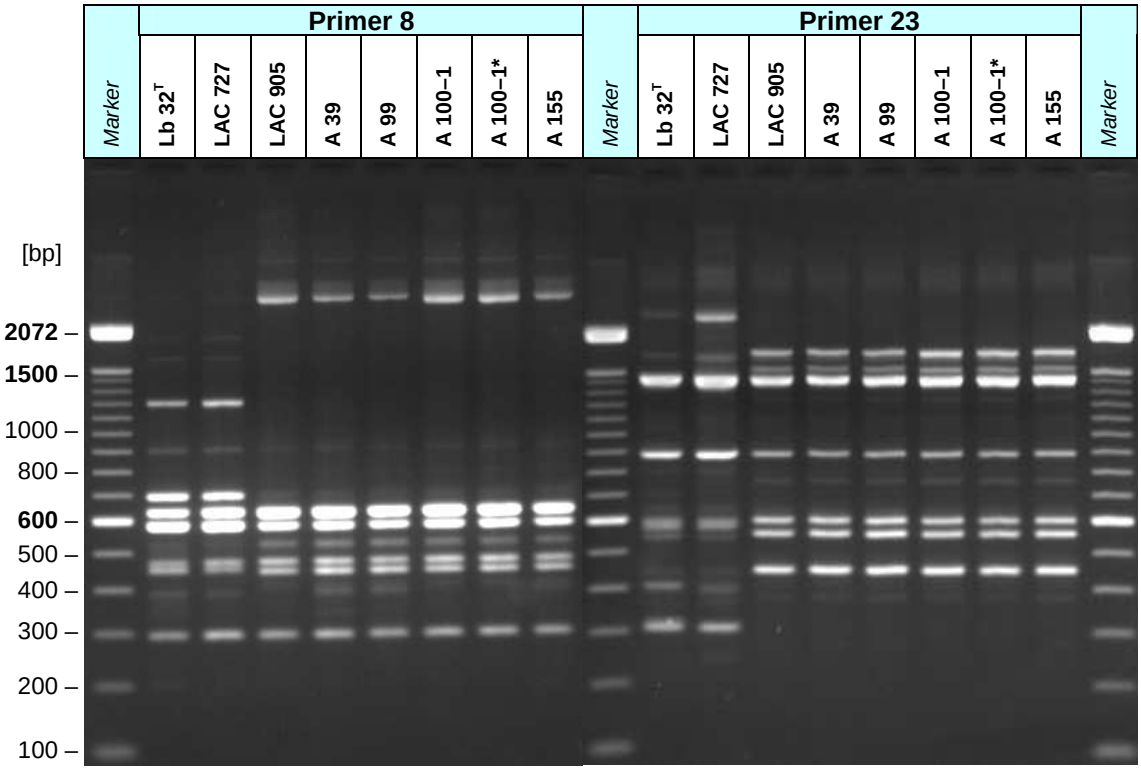


Abb. 4.1.1-10 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 8 und 23.

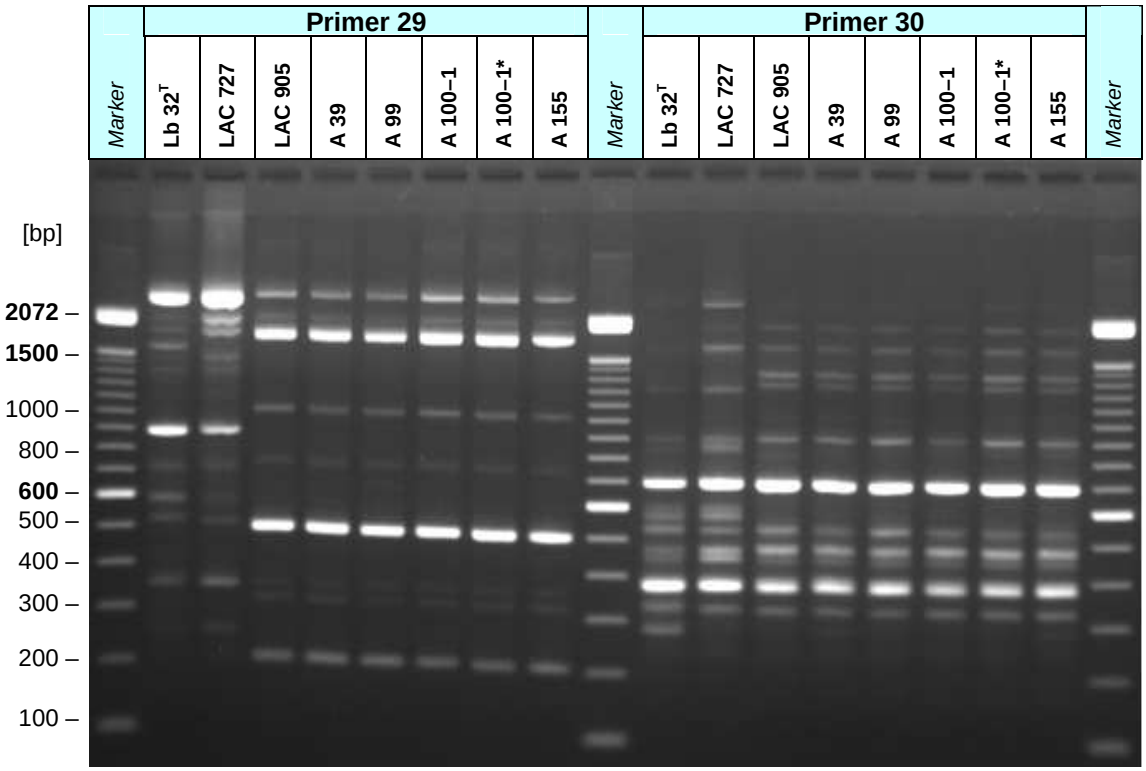


Abb. 4.1.1-11 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 29 und 30.

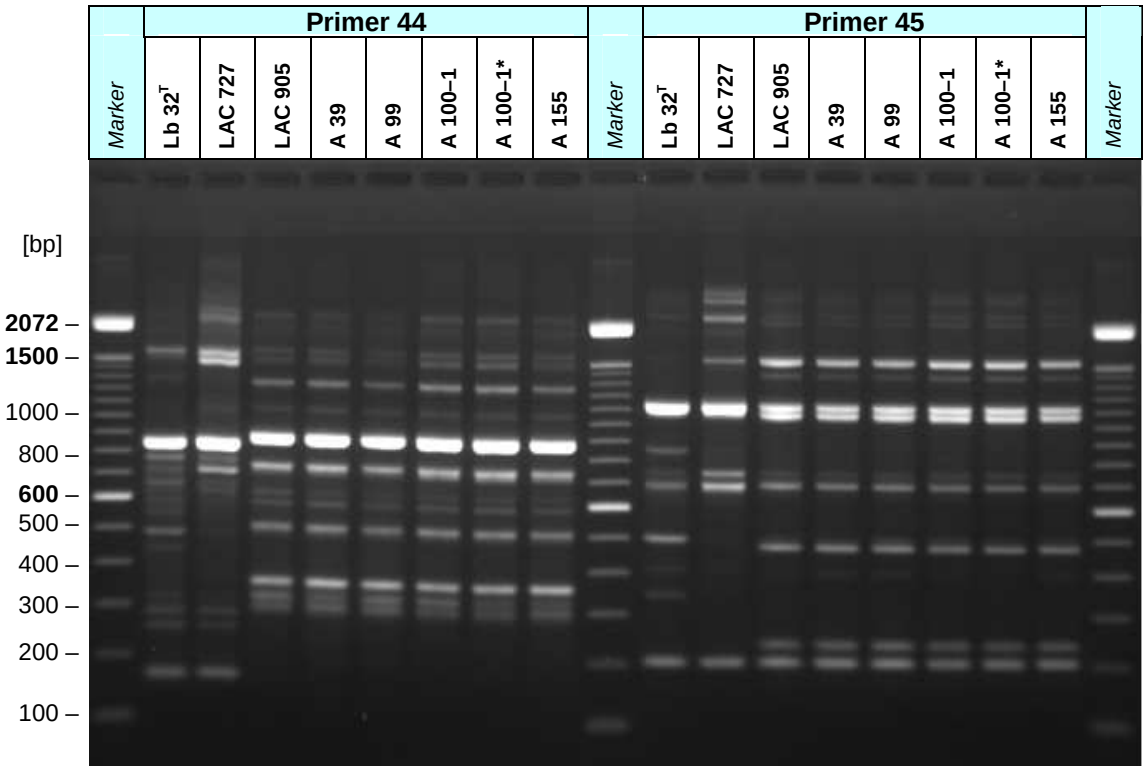


Abb. 4.1.1-12 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 44 und 45.

Im Zuge der Untersuchungen zur Versuchsreihe $1^{(N)}$ war abzuklären, ob sich die „A-Isolate“ vom LAC 905 unterscheiden. Die Primer 37 (*Abb. 4.1.1-7*), 24 (*Abb. 4.1.1-8*), und 49 (*Abb. 4.1.1-9*) weisen beim Stamm LAC 905 eine Bande stärkerer Intensität im hochmolekularen Bereich oberhalb der 2072 bp-Marke auf, wobei diese Bande ebenfalls bei den Stämmen der A-Serie – jedoch mit schwächerer Intensität – sichtbar ist. Unter Anwendung von Primer 47 (*Abb. 4.1.1-9*) ist beim Stamm LAC 905 auf der Höhe von 850 bp eine Bande schwächerer Intensität erkennbar, allerdings ist diese Bande bei allen Isolaten der A-Serie vorhanden, und somit nicht für eine Differenzierung zu gebrauchen.
Da die einzigen Unterschiede in der Bandenintensität liegen, ist der Stamm LAC 905 mit den Isolaten A 39, A 99 und A 155 ident, nicht aber mit A 100-1 bzw. A 100-1* (siehe *Abbildungen 4.1.1-1* bis *4.1.1-6*); dieser Umstand wird auch durch alle anderen verwendeten Primer bestätigt, welche bei den vier Probeisolaten LAC 905, A 39, A 99 und A 155 das gleiche Bandenspektrum liefern.
Primer 13 (*Abbildung 4.1.1-5*), und die Primer der *Abbildungen 4.1.1-7* bis *4.1.1-12* liefern keine zusätzlichen Hinweise zur Differenzierung der sechs Probeisolate, da alle verwendeten Zufallsprimer ein identes Bandenmuster ergeben. Die restlichen, ebenfalls unspezifischen DNA-Fingerprintmuster sind im Anhang dargestellt (*Abbildungen 9.1.1-1* bis 9*.1.1-16*).

4.1.2 Lactobacillus buchneri – Vergleich der Versuchsreihe $1^{(N)}$ mit Versuchsreihe $1^{(A)}$

Ziel dieses Vergleichs war, eventuell vorhandene Differenzen der jeweils gleich benannten Isolate beider Versuchsreihen aufzudecken. Durch die synchrone Amplifizierung der DNA aller Stämme mit den selben Primern und Mastermixen im gleichen Thermocycler, und der anschließend ebenfalls simultanen Auftrennung der PCR-Produkte mit der gleichen Elektrophoreseapparatur im selben Agarosegel, wurden sämtliche Bedingungen zum Stammvergleich so einheitlich wie möglich gestaltet.
Trotz dieser Maßnahmen gibt es im Bereich >1300 bp Unterschiede, die sich allerdings auf die Bandenintensität beschränken.

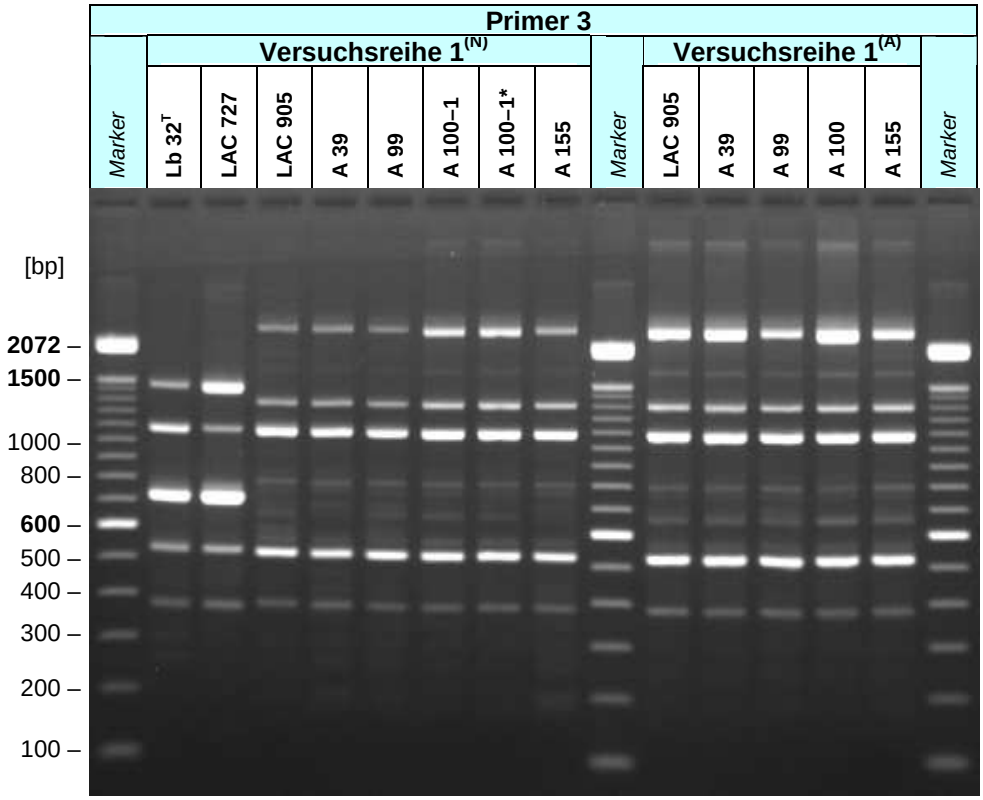


Abb. 4.1.2-1 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 3.

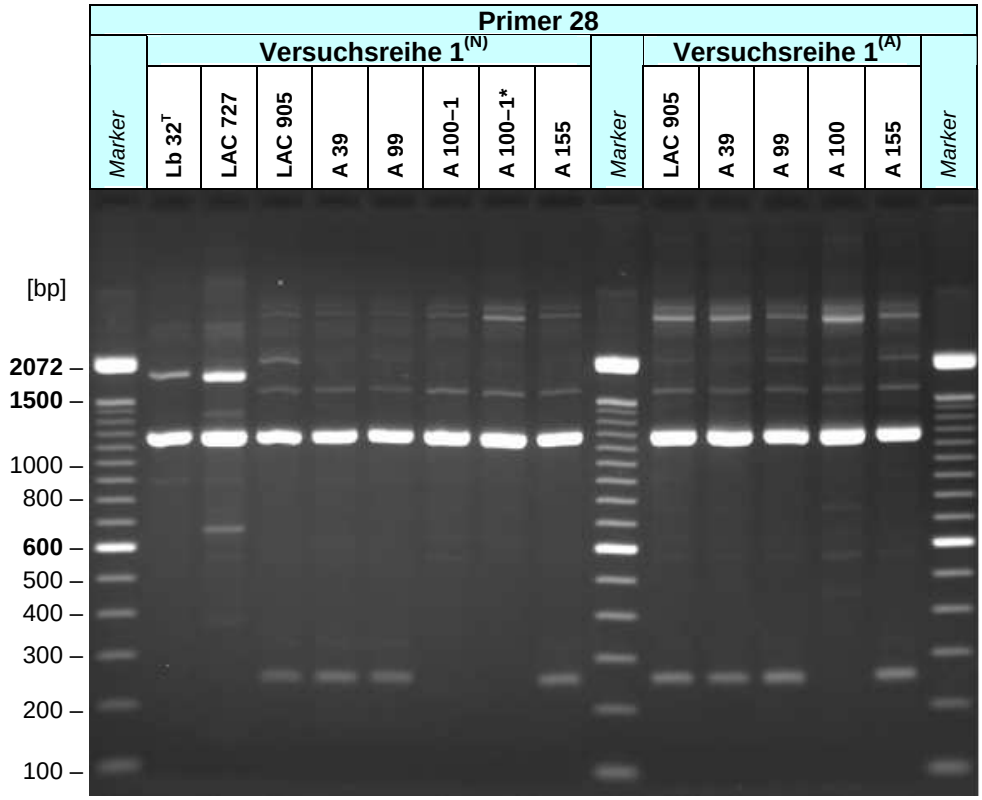


Abb. 4.1.2-2 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 28.

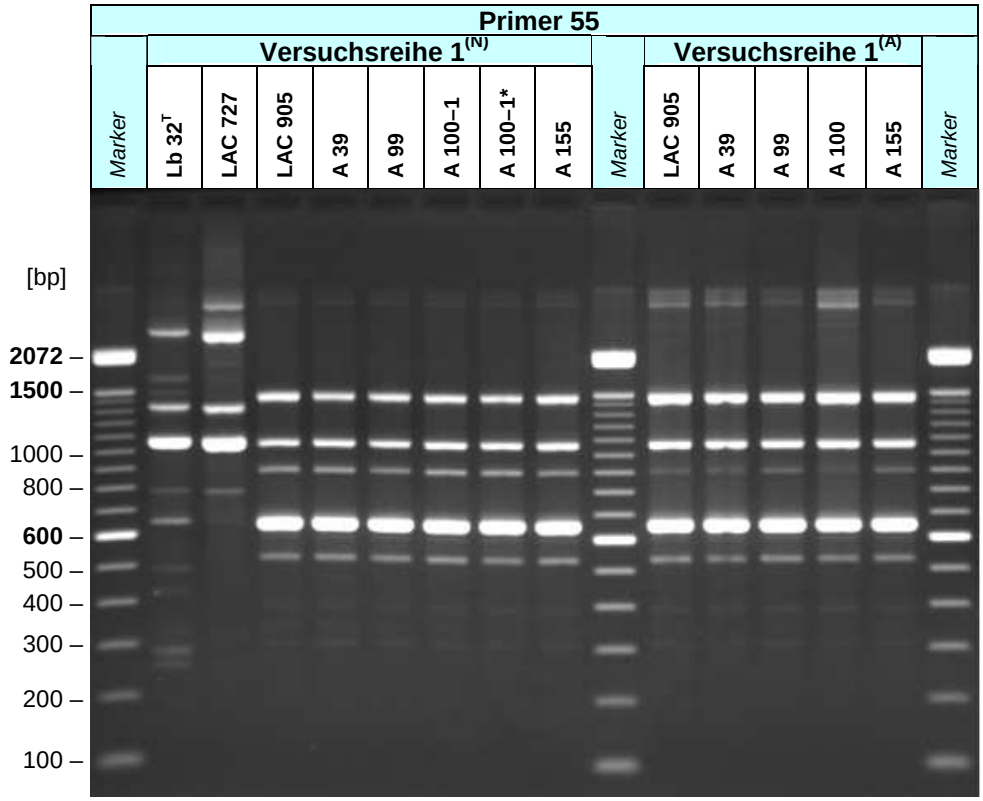


Abb. 4.1.2-3 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 55.

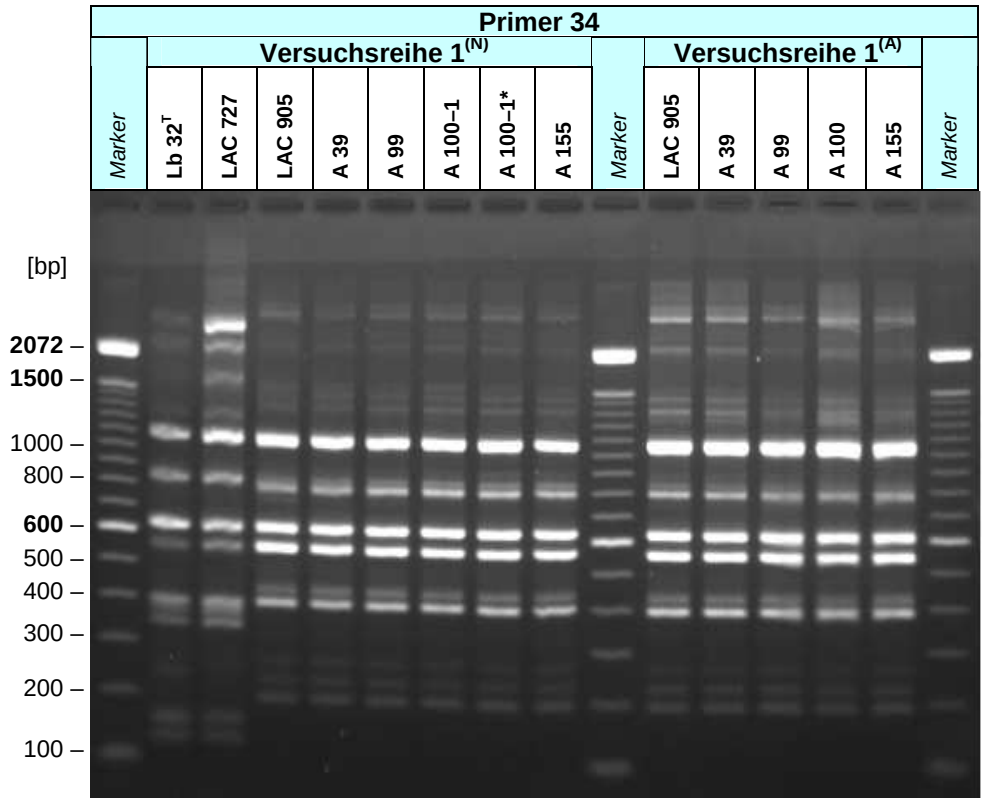


Abb. 4.1.2-4 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 34.

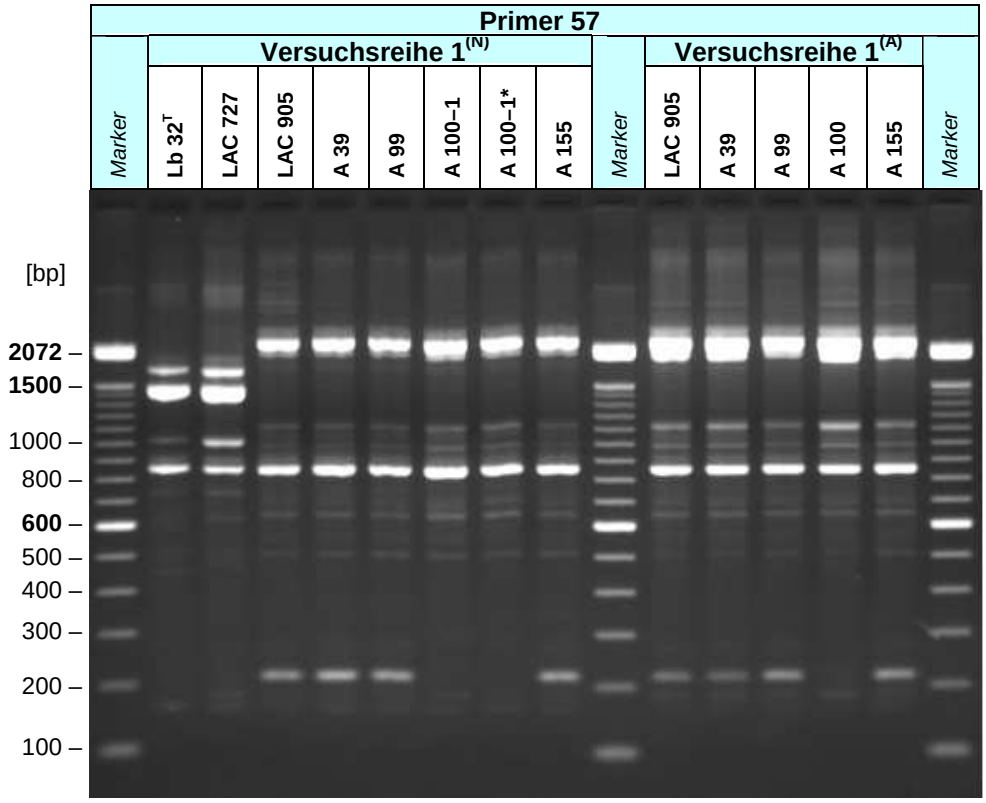


Abb. 4.1.2-5 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 57.

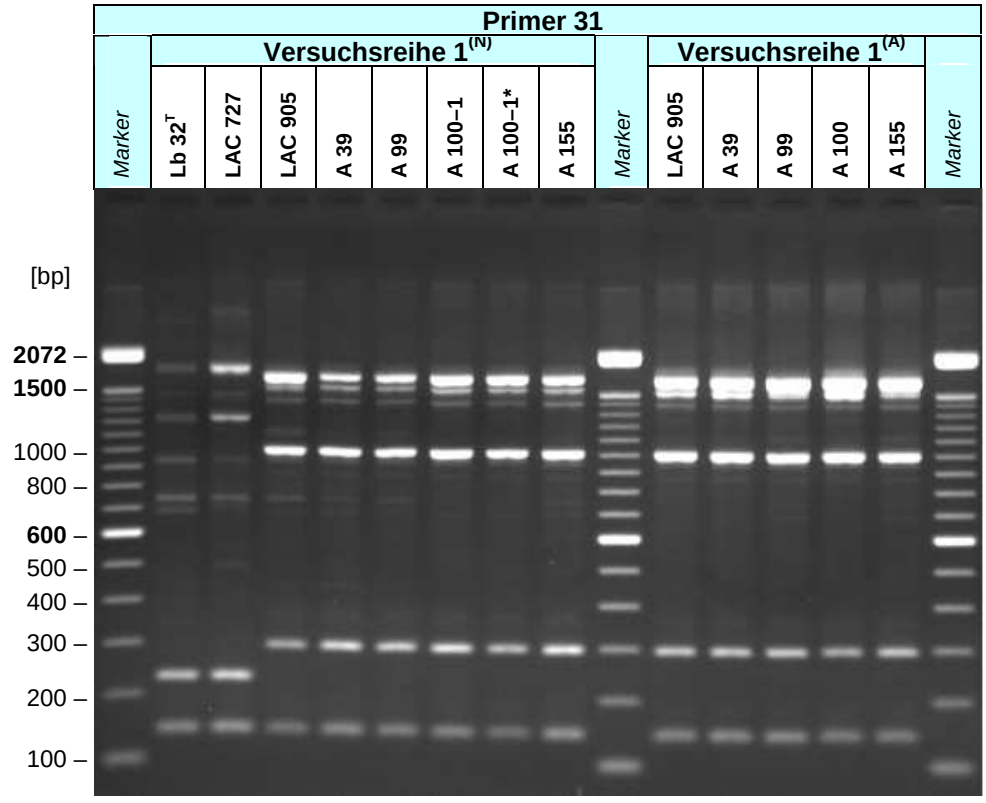


Abb. 4.1.2-6 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 31.

Da die schwächere Intensität der Banden ausschließlich bei Versuchsreihe $1^{(N)}$ und im hochmolekularen Bereich >1300 bp auftritt (besonders unter Verwendung der Primer 3, 16, 17, 21, 22, 31 und 57), lag die Vermutung nahe, dass die abweichende Intensität möglicherweise von einer schadhaften DNA herrührt (teilweise DNA-Fragmentierung, verursacht durch zu heftiges Vortexen oder Pipettieren).
Die DNA wurde im Folgenden – allerdings unter besonderer Rücksichtnahme auf schonende Bearbeitung – neu isoliert, doch diese Maßnahme brachte auch keine Intensivierung der entsprechenden Banden (siehe *Abb. 9.1.2-8*, Anhang).
Der Umstand, dass sich die beiden Versuchsreihen in der Intensität einiger Banden (aber nicht durch ihre Bandenprofile) unterscheiden, ist für die Stammdifferenzierung jedoch nicht weiter von Bedeutung.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass die jeweils gleich bezeichneten Stämme beider Versuchsreihen exakt den selben DNA-Fingerprint besitzen, daher gelten die schon für Versuchsreihe $1^{(N)}$ formulierten Aussagen (*Kapitel 4.1.1*) analog für Versuchsreihe $1^{(A)}$:

Der Stamm A 100 der Versuchsreihe $1^{(A)}$ kann in Übereinstimmung mit Versuchsreihe $1^{(N)}$ durch den Einsatz der RAPD-Primer 28 bzw. 57 eindeutig durch das Fehlen der bei allen anderen Probeisolaten vorhandenen charakteristischen Bande bei 260 bzw. 220 bp von diesen differenziert, bzw. im Vergleich zu den Stämmen A 100-1 und A 100-1* – identifiziert – werden.
Die verwendeten Primer 3, 55, 34 und 31 erlauben keine Abgrenzung der restlichen Isolate vom A 100, obwohl – wie auch schon bei Versuchsreihe $1^{(N)}$ – die fünf Teststämme eindeutig von den zwei Typstämmen Lb 32^{T} und LAC 727 unterschieden werden können.
Teilweise schwach sichtbare Banden sind auf Artefakte zurückzuführen.

Im Anhang (*Kapitel 9.1.2*) befinden sich die Abbildungen der RAPD-Primer 16, 17, 21, 22, 29, 37 und 56, welche ebenfalls keine Differenzierung des Stammes A 100 von den übrigen Probeisolaten ermöglichen.

4.1.3 Lactobacillus sakei – Versuchsreihe 2

Die insgesamt sechs Stämme (fünf *Lb. sakei*-Isolate der Versuchsreihe 2 (siehe *Tab. 3-2*) und der institutseigene Typstamm (Lb 92^T)) wurden mittels RAPD-PCR und zwölf verschiedenen Zufallsprimern (1, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 17, 23, 24 und 42) analysiert. Es sollte geklärt werden, ob sich die Stämme untereinander und vom Typstamm unterscheiden.

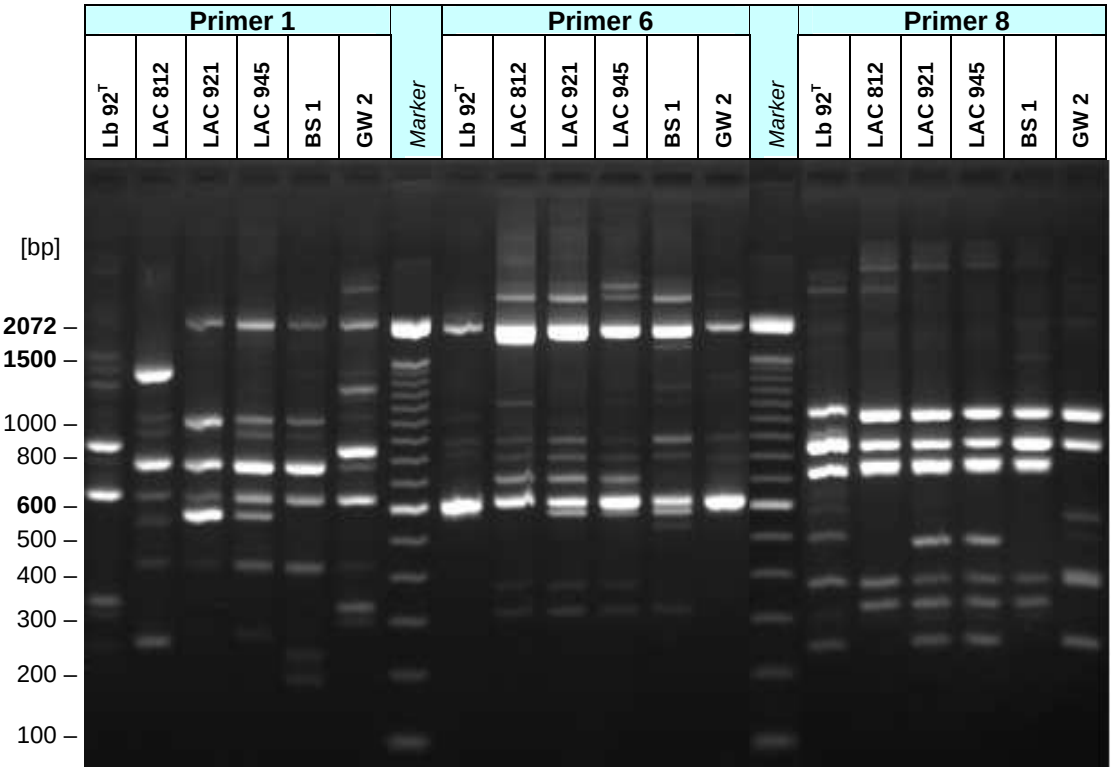


Abb. 4.1.3-1 RAPD-PCR von ***Lb. sakei***-Isolaten und Typstamm mit den Primern 1, 6 und 8.

Unter der Verwendung von RAPD-Primer 1 erkennt man, dass sich nicht alle Stämme sofort differenzieren lassen. Die beiden Hauptbanden des Typstamms Lb 92^T bei 690 bp und 890 bp sind auch bei dem Isolat GW 2 vorhanden, und die vier Banden bei 580 bp, 770 bp, 1000 bp und 2072 bp von LAC 921 sind – wenn auch mit abweichender Intensität – ebenfalls bei LAC 945 nachweisbar. RAPD-Primer 6 erzeugt bei allen untersuchten Stämmen markante Banden bei 600 bp und 2072 bp, Banden zwischen 700 bp und 900 bp sind ebenso bei allen Stämmen mehr oder weniger ausgeprägt gegenwärtig. Das etwas komprimierte Bandenspektrum von Primer 8 liefert sogar drei Hauptbanden (bei 730 bp, 850 bp und 1050 bp), die bei fünf von sechs Stämmen präsent sind.

Beim Stamm GW 2 fehlt jedoch die Bande auf der Höhe von 730 bp, daher eignet sich RAPD-Primer 8 für eine Differenzierung dieses Isolats vom Typstamm, sowie der anderen vier Probeisolate.

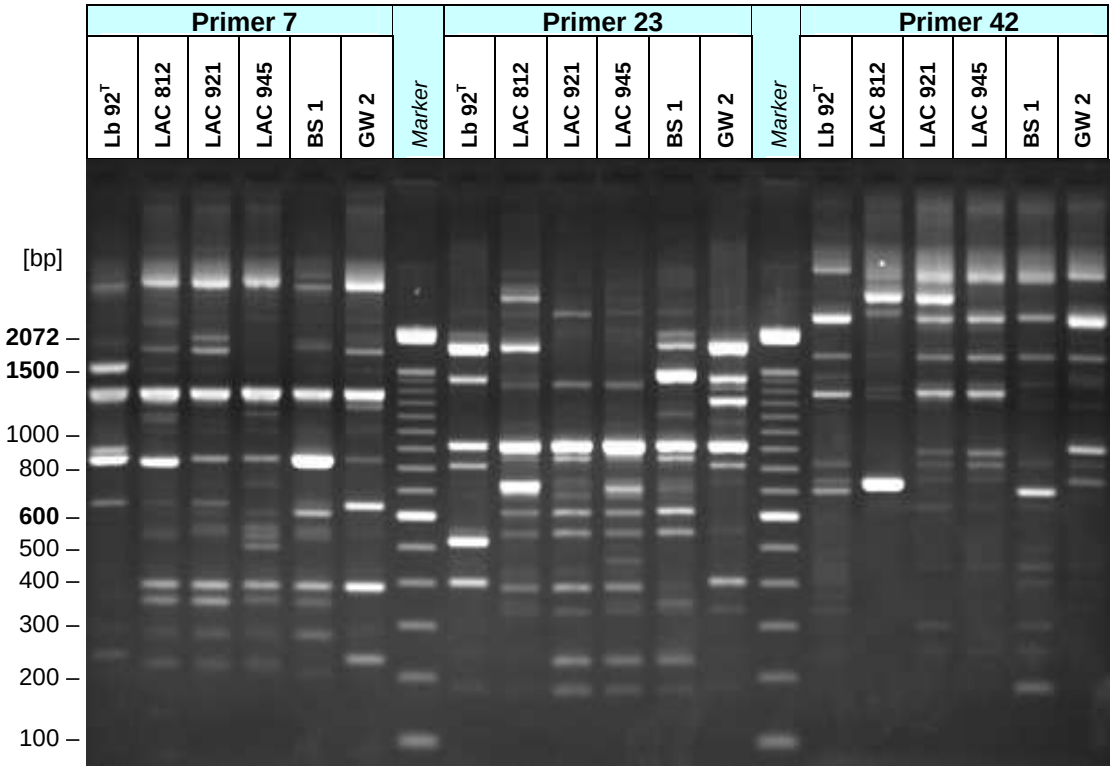


Abb. 4.1.3-2 RAPD-PCR von ***Lb. sakei***-Isolaten und Typstamm mit den Primern 7, 23 und 42.

Mit Primer 7 lassen sich alle fünf Probeisolate durch die Bande knapp unter 400 bp vom Typstamm unterscheiden, dieser Unterschied manifestiert sich beim Lb 92^T auch durch die Bande bei 520 bp mit Hilfe von Primer 23.

Durch Primer 23 wird deutlich, dass der Stamm LAC 812, der eine Bande bei ungefähr 1850 bp aufweist, nicht mit den Stämmen LAC 921 und LAC 945 ident sein kann, da diese Bande bei beiden fehlt. Letztgenannte Stämme besitzen mit Primer 23 zwar ein annähernd gleiches Bandenprofil, doch dass die DNA dieser Stämme nicht die Gleiche ist, wird sowohl unter Verwendung von RAPD-Primer 12 durch die beim Stamm LAC 921 fehlende Bande bei 330 bp, als auch durch die mittels Primer 42 erzeugte, sehr starke Bande im hochmolekularen Bereich >2072 bp, bestätigt.

RAPD-Primer 24 attestiert die schon mittels Anwendung von den Primern 7 und 23 erkannte Differenz des Typstamms von allen Probeisolaten durch eine

Bande bei 230 bp, gleichzeitig ermöglicht dieser Primer die eindeutige Unterscheidung des Stammes LAC 812 von den übrigen Isolaten durch die Bande bei 1050 bp. Auch LAC 945 kann mit Primer 24 durch die Bande knapp unter 1200 bp deutlich von LAC 921, BS 1 und GW 2 unterschieden werden; der Stamm LAC 812, der diese Bande ebenfalls besitzt, wurde schon vorhin durch selbigen Primer und die Bande bei 1050 bp differenziert.

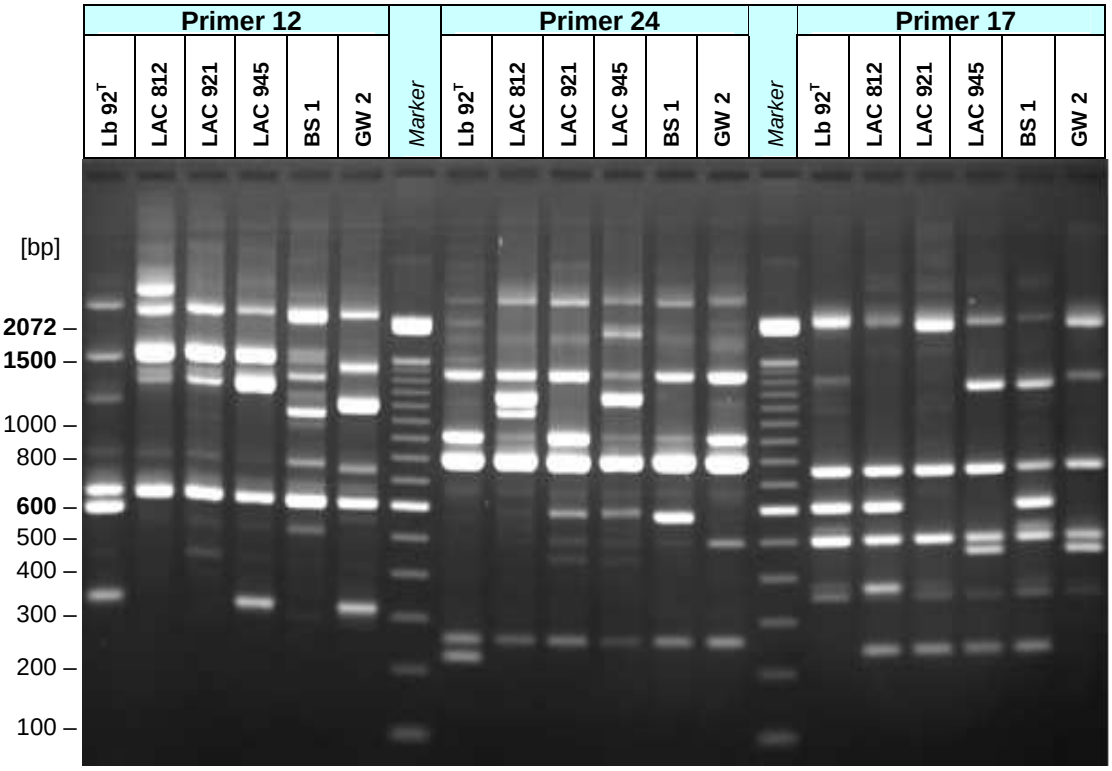


Abb. 4.1.3-3 RAPD-PCR von ***Lb. sakei***-Isolaten und Typstamm mit den Primern 12, 24 und 17.

Anhand von Primer 17 lässt sich der Stamm BS 1 durch die Banden bei 240 bp und 600 bp zweifelsfrei von GW 2 unterscheiden; zieht man nun auch noch die resultierenden Bandenspektren von Primer 4 hinzu, so kann BS 1 durch die nicht vorhandene Bande bei rund 980 bp auch von den Isolaten LAC 812, LAC 921 und LAC 945 differenziert werden.

Durch die Verwendung von Primer 17 kann auch LAC 921 durch die fehlende Bande bei 600 bp von den Stämmen LAC 812 und BS 1 unterschieden werden. Wenn man nun die zwei restlichen Isolate LAC 945 und GW 2 betrachtet, entdeckt man bei beiden eine Bande bei 480 bp, die bei dem Stamm LAC 921 nicht präsent ist.

Infolgedessen lässt sich LAC 921 mit Primer 17 von allen restlichen Isolaten und sogar vom Typstamm (durch dessen Bande bei 600 bp) abgrenzen.

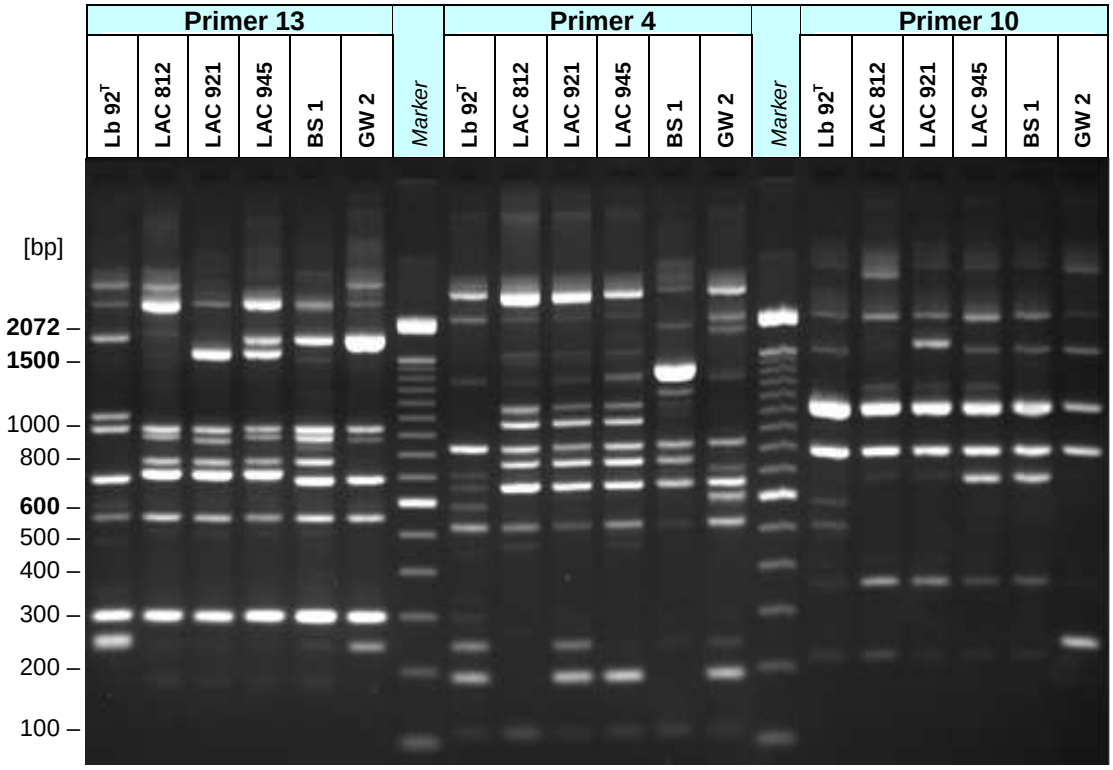


Abb. 4.1.3-4 RAPD-PCR von ***Lb. sakei***-Isolaten und Typstamm mit den Primern 13, 4 und 10.

Eine Unterscheidung des Stammes LAC 921 von allen Probeisolaten samt Typstamm ist auch unter Einsatz von Primer 10 durch die Bande bei etwa 1600 bp möglich.

Somit können durch die Kombination mehrerer Primer alle Probeisolate untereinander, als auch vom Typstamm differenziert werden.

4.1.4 Lactobacillus buchneri – Versuchsreihe 3

Die 21 Isolate des Stammes LAC 905 (LAC 905 1 bis LAC 905 23, siehe *Tab. 3-2*) sollten im Rahmen der Versuchsreihe 3 mittels RAPD-PCR auf ihre Identität geprüft werden. Darüber hinaus sollten alle Isolate mit zwei Vergleichsstämmen (LAC 905 und A 100-1* der Versuchsreihe $1^{(N)}$), sowie dem institutseigenen Typstamm (Lb 32^{T}), verglichen werden.

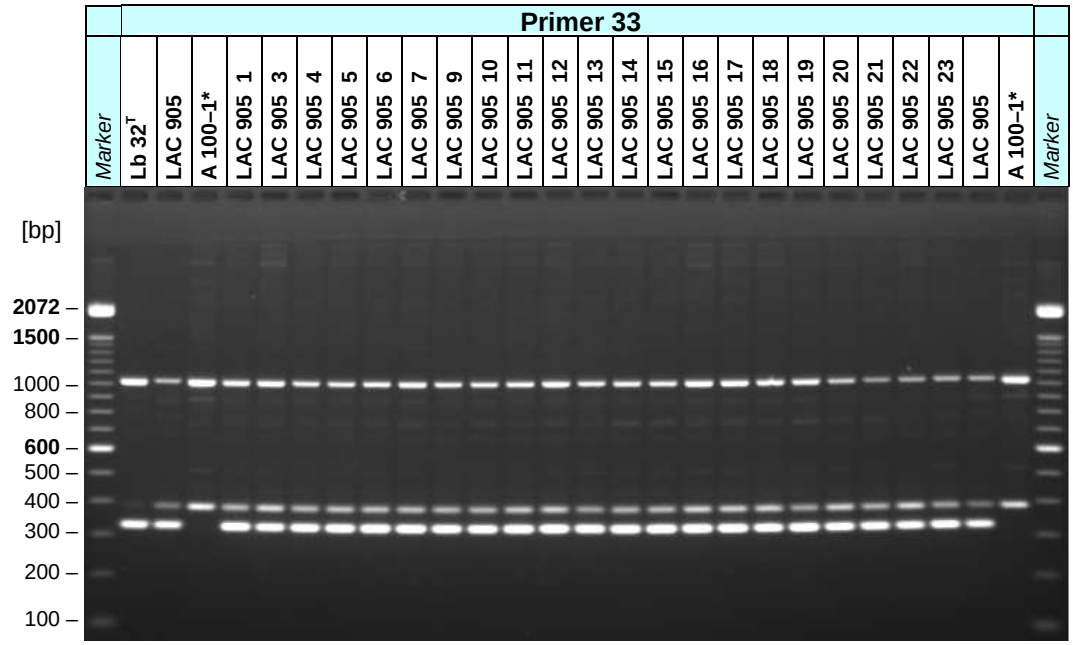


Abb. 4.1.4-1 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 33.

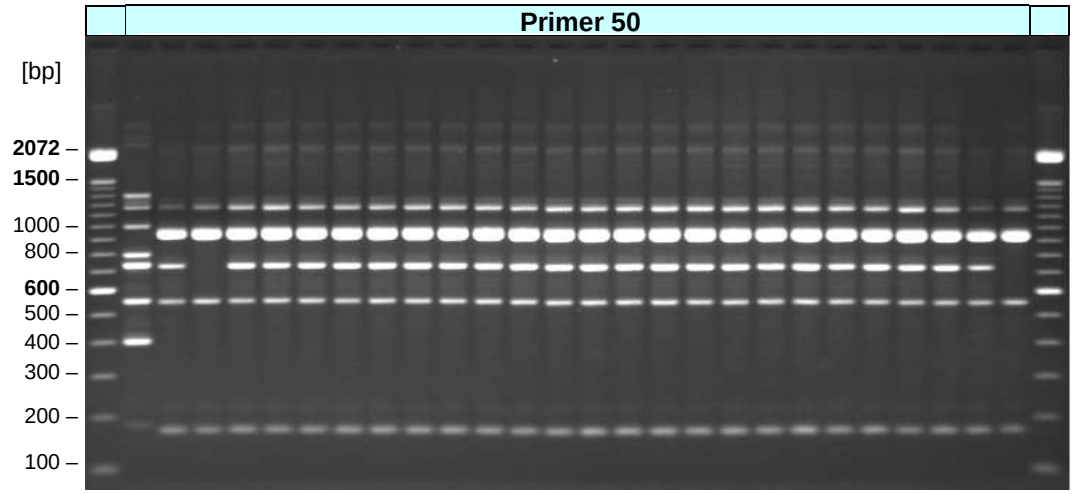


Abb. 4.1.4-2 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 50.

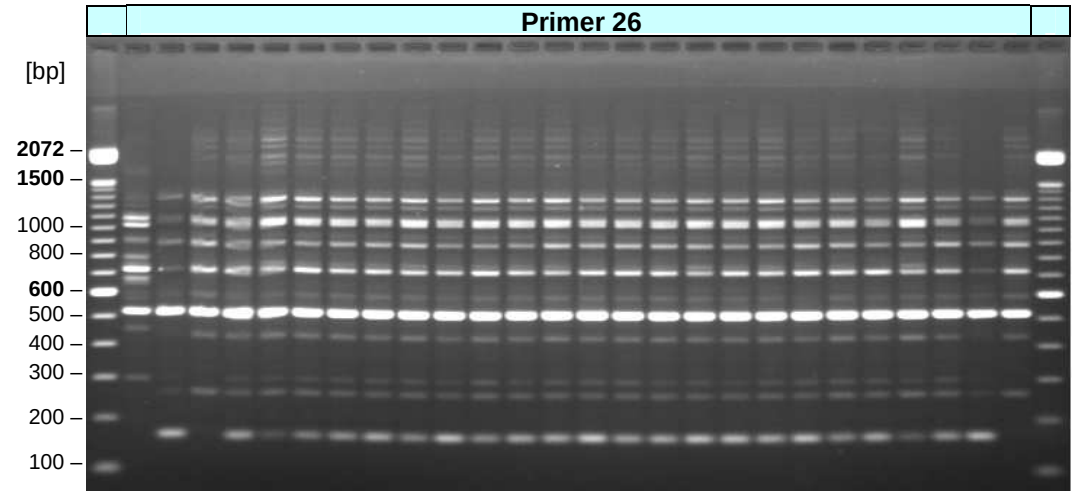


Abb. 4.1.4-3 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 26.

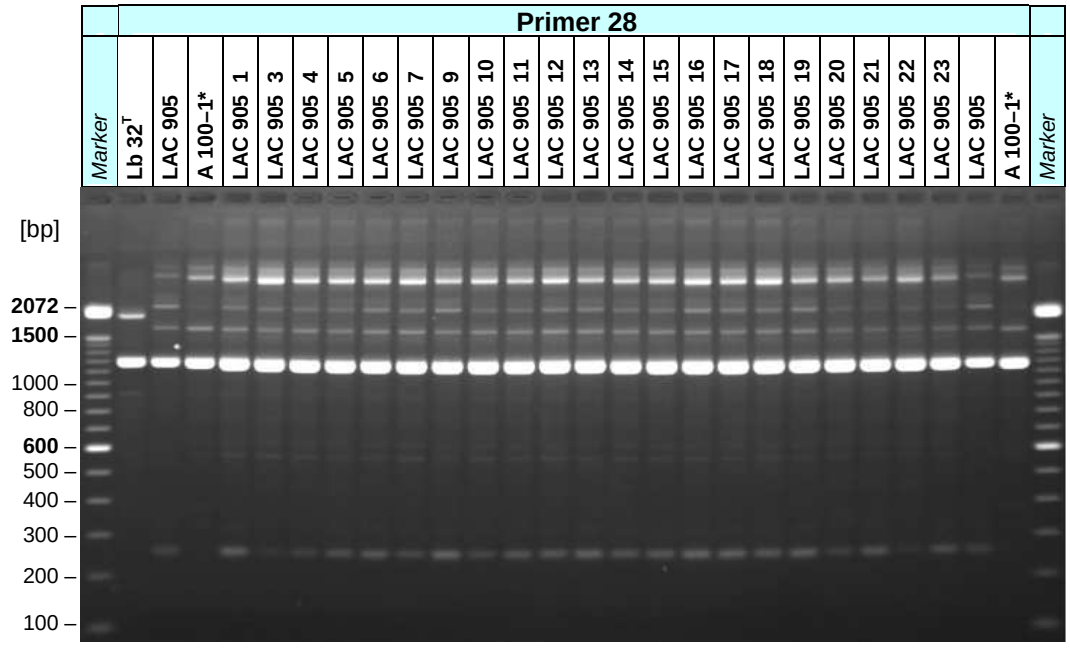


Abb. 4.1.4-4 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 28.

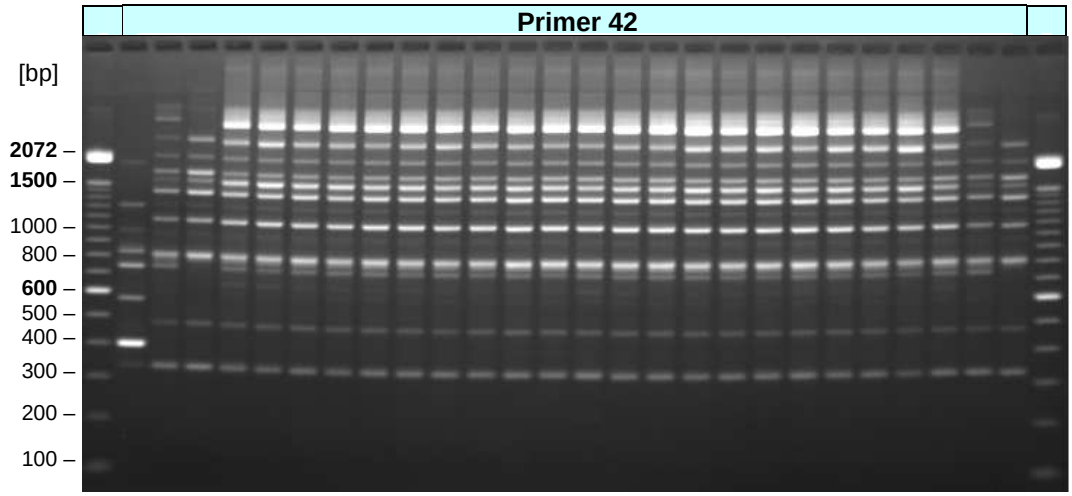


Abb. 4.1.4-5 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 42.

Bei den mittels RAPD-PCR durchgeführten Analysen der Versuchsreihen $1^{(N)}$ und $1^{(A)}$ bestätigte sich schon für die Stämme LAC 905, A 39, A 99 und A 155 ein identer DNA-Fingerprint. Auch die Stämme A 100, A 100-1 und A 100-1* erwiesen ein untereinander völlig gleichartiges Bandenspektrum. Daher mussten die 21 Probeisolate lediglich mit den Stämmen LAC 905 und A 100-1* verglichen werden.

Die *Abbildungen 4.1.4-1* bis *4.1.4-5* stimmen mit den bereits erhaltenen Ergebnissen der Versuchsreihen $1^{(N)}$ und $1^{(A)}$ überein:

RAPD-Primer 33 ermöglicht durch die bei allen LAC 905-Isolaten charakteristische Bande bei 330 bp eine eindeutige Differenzierung vom Stamm A 100-1*. Mit Primer 50 steht ein weiterer Zufallsprimer, der sämtliche Probeisolate durch eine markante Bande bei 730 bp vom A 100-1* zu unterscheiden vermag, zur Verfügung. Unter Einsatz der Primer 26 und 28 wird der Stamm A 100-1* durch die fehlende Bande im niedermolekularen Bereich bei 170 bp bzw. 260 bp von allen 21 LAC 905-Isolaten, sowie vom Vergleichsstamm LAC 905, unterschieden. Durch Verwendung des RAPD-Primers 42 entdeckt man im resultierenden Bandenprofil die für sämtliche LAC 905-Isolate typische, jedoch beim Stamm A 100-1* fehlende, intensive, hochmolekulare Bande im Bereich >2072 bp.

Da sich nur die Intensität einiger Banden, nicht aber das Bandenprofil der 21 LAC 905-Isolate vom Referenzstamm LAC 905 unterscheidet, ist dieser Umstand für die Stammdifferenzierung nicht weiter von Bedeutung.
Teilweise schwach sichtbare Banden sind auf Artefakte zurückzuführen.

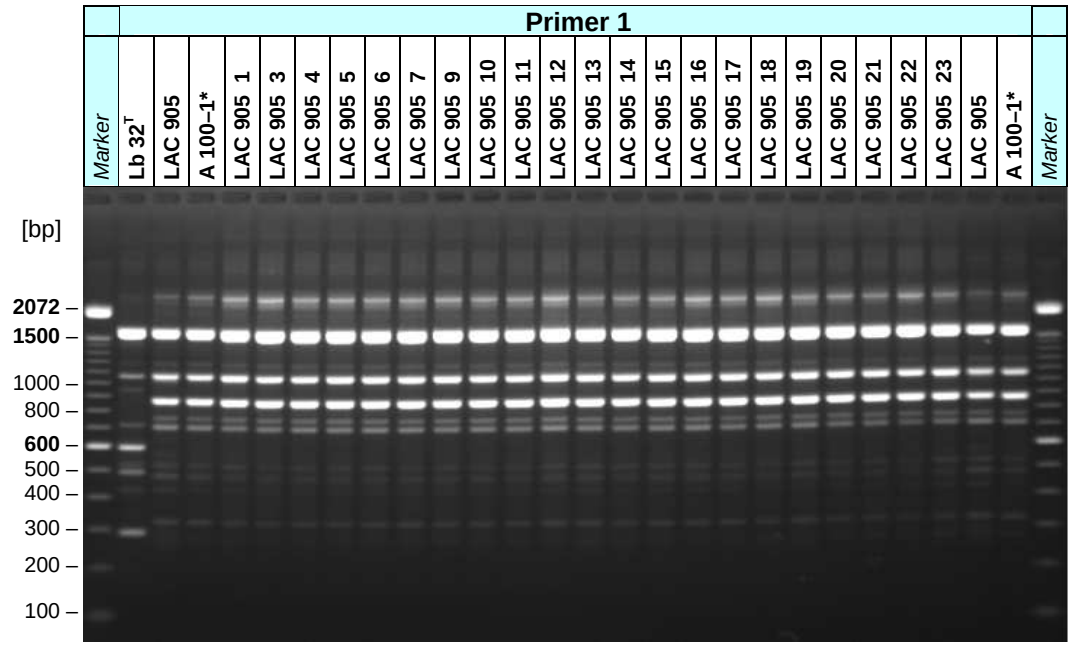


Abb. 4.1.4-6 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 1.

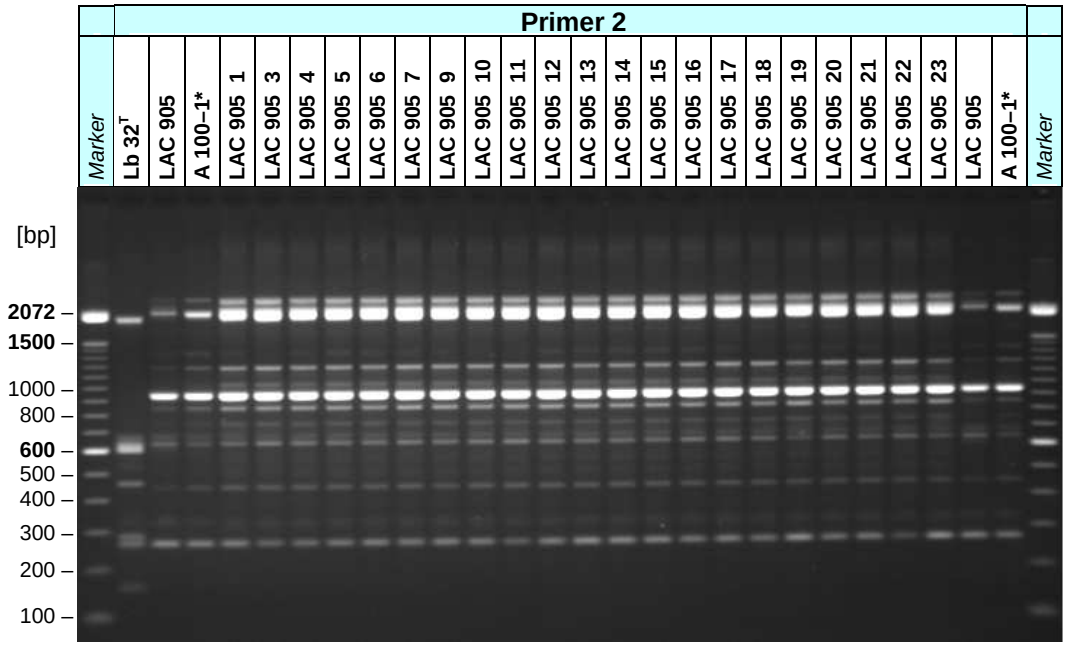


Abb. 4.1.4-7 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 2.

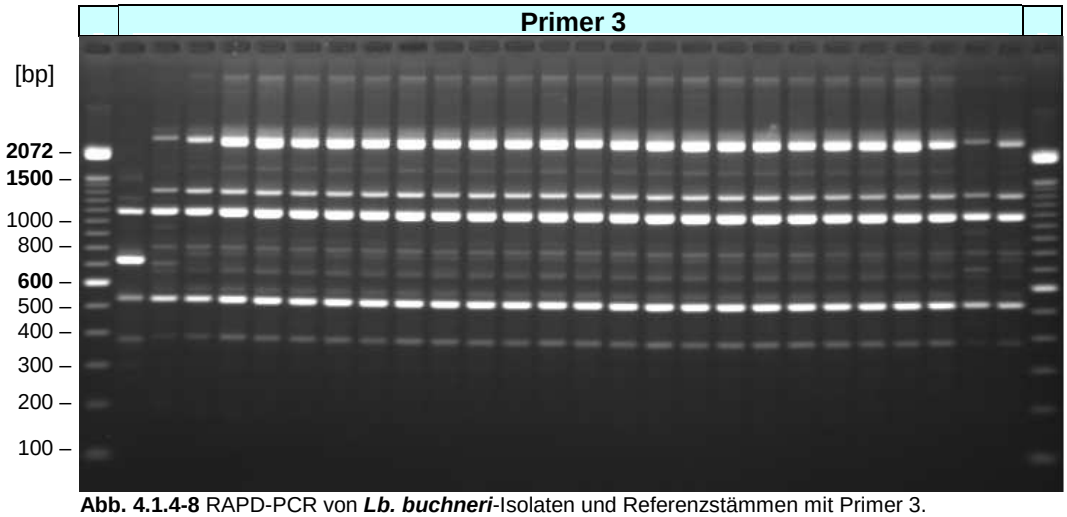


Abb. 4.1.4-8 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 3.

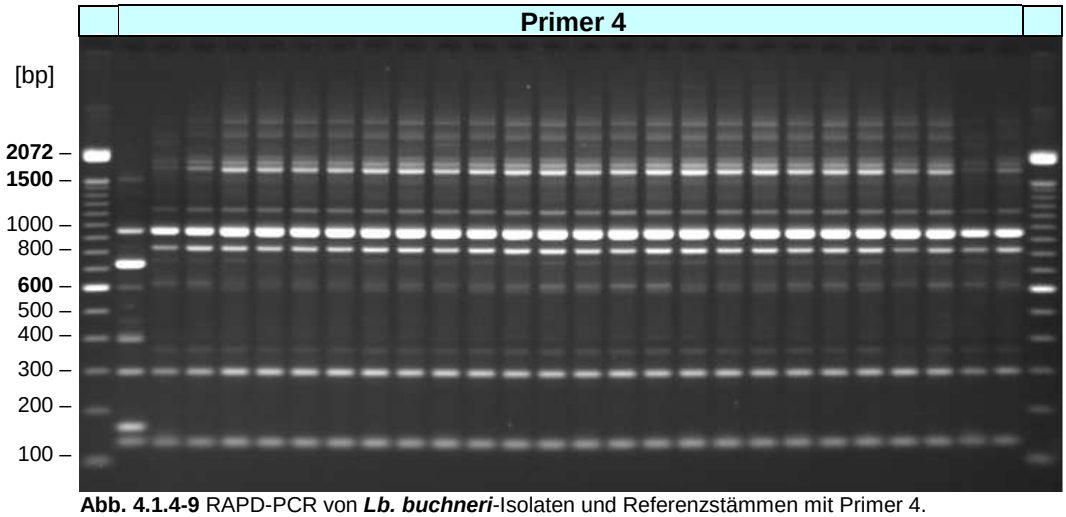


Abb. 4.1.4-9 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 4.

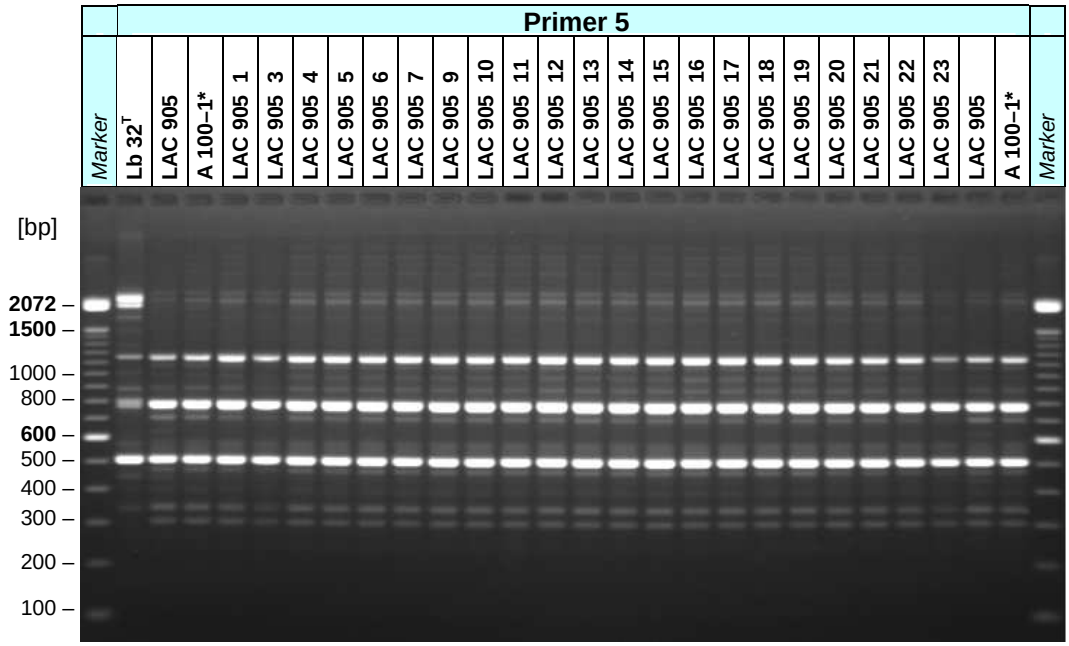


Abb. 4.1.4-10 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 5.

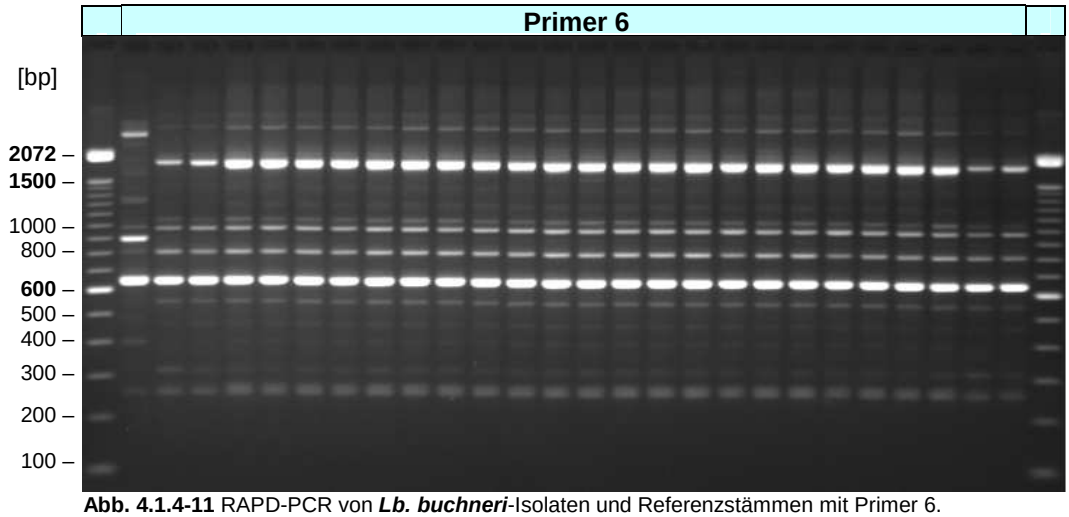


Abb. 4.1.4-11 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 6.

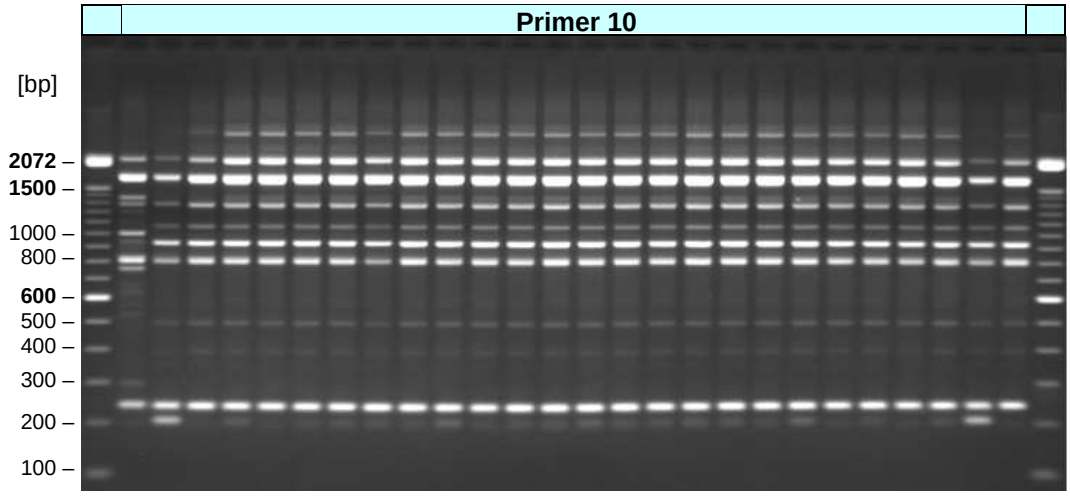


Abb. 4.1.4-12 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 10.

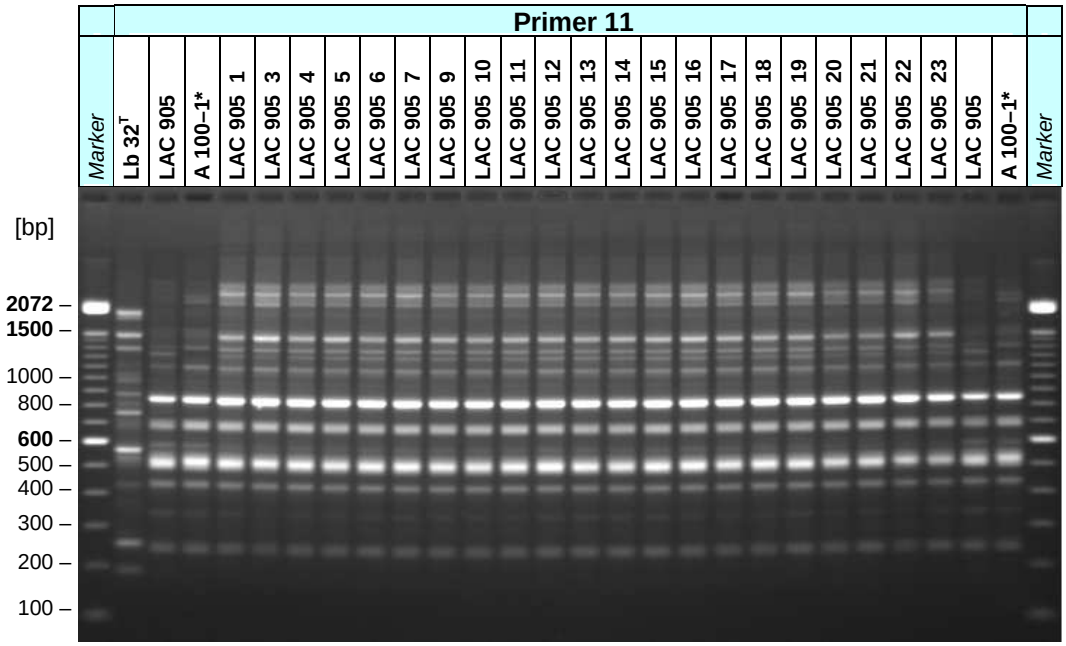


Abb. 4.1.4-13 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 11.

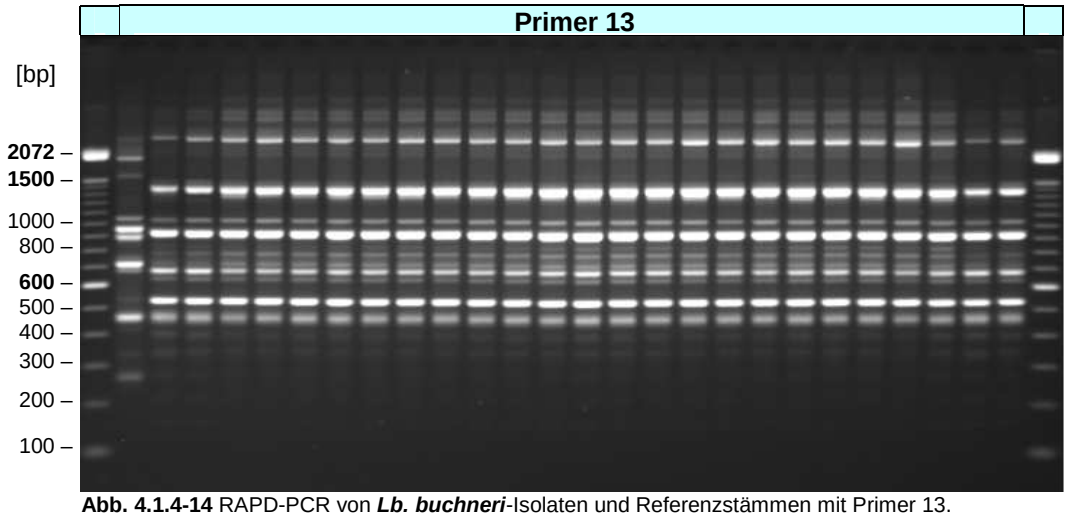


Abb. 4.1.4-14 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 13.

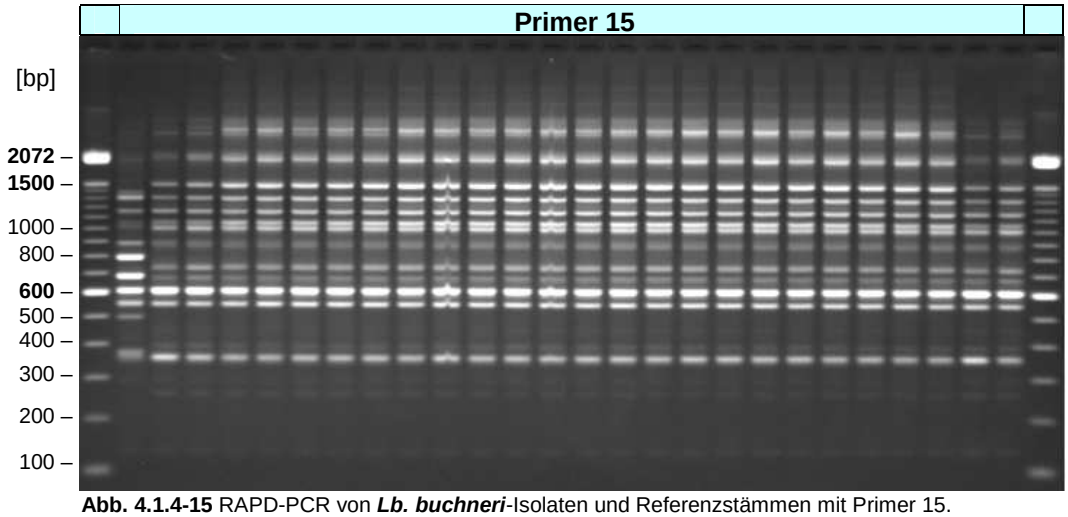


Abb. 4.1.4-15 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 15.

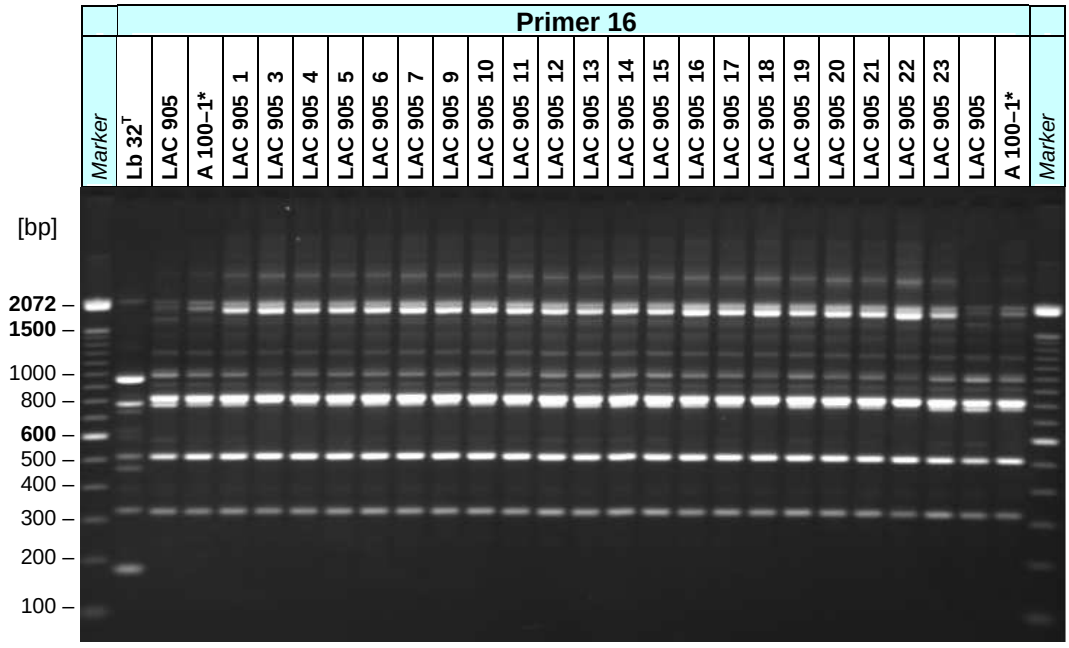


Abb. 4.1.4-16 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 16.

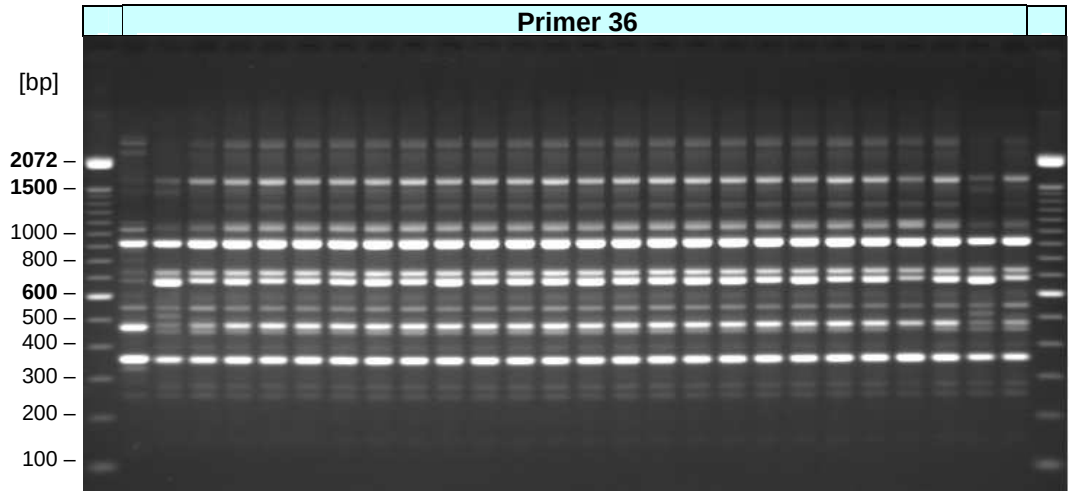


Abb. 4.1.4-17 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 36.

Die RAPD-Primer 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 13, 15, 16 und 36 der *Abbildungen 4.1.4-6* bis *4.1.4-17* ermöglichen – genau wie schon in den Versuchsreihen $1^{(N)}$ und $1^{(A)}$ festgestellt – keine Differenzierung der LAC 905-Isolate vom Stamm A 100-1*.

Die 21 LAC 905-Isolate, sowie der Vergleichsstamm LAC 905, weisen bei allen 28 verwendeten RAPD-Primern denselben Fingerprint auf, allerdings bemerkt man auch eine verhältnismäßig starke Fragmentierung der Referenzstämme A 100-1* – und vor allem LAC 905 – im hochmolekularen Bereich. Diese starke Fragmentierung der zugrundeliegenden Template-DNA bewirkt, dass während

der PCR kaum hochmolekulare Amplikons gebildet werden, was sich in einer herabgesetzten Intensität der hochmolekularen Banden äußert.
Die Zellmassen-DNA der 21 Isolate hingegen lag – wie an den kräftig ausgeprägten, sehr hochmolekularen Banden ersichtlich – ziemlich unbeschadet vor, und wurde daher suffizient amplifiziert. Da sich nur die Intensität einiger Banden, aber nicht das Bandenprofil der 21 LAC 905-Isolate vom Referenzstamm LAC 905 unterscheidet, ist dieser Umstand für die Stammdifferenzierung nicht weiter von Bedeutung. Teilweise schwach sichtbare Banden sind auf Artefakte zurückzuführen.

Zusammenfassend wird für alle 21 LAC 905-Probeisolate, sowie den Vergleichsstamm LAC 905, ein identischer DNA-Fingerprint bestätigt. Im Einklang mit den Versuchsreihen $1^{(N)}$ und $1^{(A)}$ erfolgt daher zwischen den 21 LAC 905-Isolaten (inklusive Referenzstamm LAC 905) und dem Stamm A 100-1* eine abermalige, eindeutige Differenzierung aufgrund des jeweils eigenständigen Bandenspektrums. Analog zu den Versuchsreihen $1^{(N)}$ und $1^{(A)}$ erlauben die meisten verwendeten RAPD-Primer somit auch eine zweifelsfreie Unterscheidung der Probenstämme vom Typstamm Lb 32^{T}.
Die Abbildungen der Primer 7, 9, 14, 24, 37, 39, 40, 47, 49, 53 und 57 sind im Anhang (*Kapitel 9.1.4*) angeführt.

4.2 PFGE

Die *unmittelbare* Analyse der isolierten Nucleinsäuren ist, durch deren Vorliegen als kompakte bzw. hochmolekulare Struktur, in den seltensten Fällen möglich. Daher wird die DNA mittels Restriktionsenzymen in kleinere Fragmente genau definierter Länge zerlegt, die durch die Fähigkeit der Enzyme doppelsträngige DNA-Moleküle an spezifischen Erkennungsstellen zu binden und zu spalten, entstehen.
Auf diese Weise entstandene Restriktionsfragmente können nun durch die Wechselfeld-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt werden: Die Restriktionsfragmente des geschnittenen DNA-Moleküls erzeugen durch die

Wahl der geeigneten Pulszeit und Feldstärke ein charakteristisches Bandenspektrum im optimalen Auftrennungsbereich, und mit Hilfe zeitgleich aufgetrennter Größenstandards erfolgt die ungefähre Größenzuordnung der Fragmente in Basenpaaren (bp) [LOTTSPEICH und ENGELS, 2006].
Alle verwendeten Restriktionsenzyme sind in *Kapitel 3.7.2.2* aufgelistet.
Die Zellmassenanzucht und –ernte erfolgte wie in *Kapitel 3.2* beschrieben, die Abläufe der Proben- und Gelvorbereitung, sowie der Elektrophorese sind in den *Kapiteln 3.7.2* bis *3.7.4* angeführt.

4.2.1 Vorversuch

Einer der wichtigsten und zugleich schwierigsten Faktoren der Probenvorbereitung ist, die richtige Konzentration der in die Agarosematrix eingebetteten Zellen zu erhalten. Eine zu geringe, bzw. zu große Zellanzahl pro Insert führt dementsprechend zur Unter- bzw. Überladung des Agaroseblöckchens mit DNA-Probenmenge [BIO-RAD, 1995].
Für die Erzielung der bestmöglichen Zellkonzentration pro Insert, wie auch in weiterer Folge zur Erforschung der geeigneten Insert*größe* für eine optimal resultierende Bandenintensität, und darüber hinaus zur Ermittlung der Stammdifferenzierungstauglichkeit des eingesetzten Enzyms samt Pulszeit, wurde ein Vorversuch angestellt (*Abbildung 4.2.1-1*).

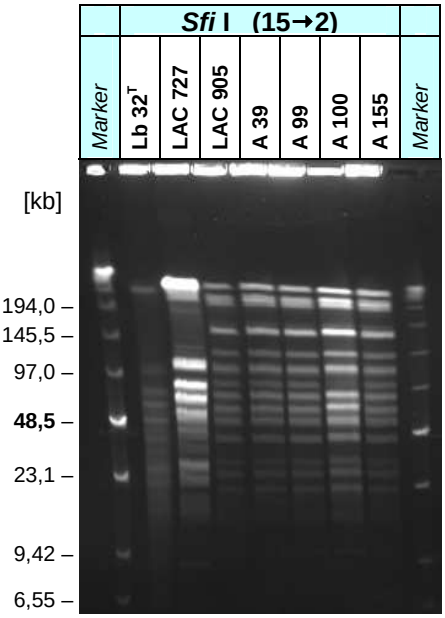


Abb. 4.2.1-1 PFGE von ***Lb. buchneri***-Stämmen nach Restriktion mit *Sfi* I.

Abbildung 4.2.1-1 zeigt, dass sowohl das verwendete Enzym, als auch die gewählte Pulszeit für die Auftrennung der *Lb. buchneri*-Stämme geeignet sind. Die Bandenintensitäten der Stämme A 100 und vor allem LAC 727 können durch eine entsprechende Reduktion der Insertgröße vermindert, und die Inserts daher weiterverwendet, werden. Für die schwächer sichtbaren Stämme LAC 905, A 39, A 99, A 155 und den Typstamm Lb 32^T wurden neue Inserts mit mehr Zellmasse hergestellt, da sich die verwendete Insertgröße (und damit Bandenintensität) durch das vorgegebene Ausmaß der Agarosegeltaschen nicht mehr steigern ließ.

4.2.2 Lactobacillus buchneri – Vergleich der Versuchsreihe $1^{(N)}$ mit Versuchsreihe $1^{(A)}$

Die in *Abb. 4.2.1-1* dargestellten Bandenspektren entstammen der Versuchsreihe $1^{(A)}$. Für die Stämme beider Versuchsreihen wurden gleiche Mengen Zellmasse zur Herstellung der Inserts verwendet, und Stämme, die im Vorversuch schwächer sichtbar waren, wurden entsprechend angepasst.
Beim Vergleich der Versuchsreihe $1^{(N)}$ mit der Versuchsreihe $1^{(A)}$ mittels RAPD-PCR (*Kapitel 4.1.2*) stellte sich heraus, dass die jeweils gleich bezeichneten Stämme beider Versuchsreihen exakt den selben DNA-Fingerprint aufwiesen.
Ziel des neuerlichen Vergleichs beider Versuchsreihen mit Hilfe der sensitiven PFGE war eine Aufdeckung eventuell doch vorhandener, aber mit der RAPD-PCR nicht erkannter Unterschiede der gleich bezeichneten Stämme beider Versuchsreihen. Ebenso sollten allfällige Differenzen der als bis dato gleich identifizierten Stämme LAC 905, A 39, A 99 und A 155 *innerhalb der einzelnen* Versuchsreihen ausfindig gemacht werden.

Abbildung 4.2.2-1 präsentiert das Bandenmuster der PFGE der *Lb. buchneri*-Stämme nach der Restriktion mit *Sfi* I bei einer Pulszeit von 15→2 sec. Obwohl das Bandenspektrum im niedermolekularen Bereich eher verschmiert, und auch durch die schwache Intensität für eine Beurteilung praktisch ungeeignet ist, zeigen die Banden im hochmolekularen Bereich oberhalb der 48,5 kb-Marke ein relativ scharfes, gut aufgetrenntes Restriktionsmuster.

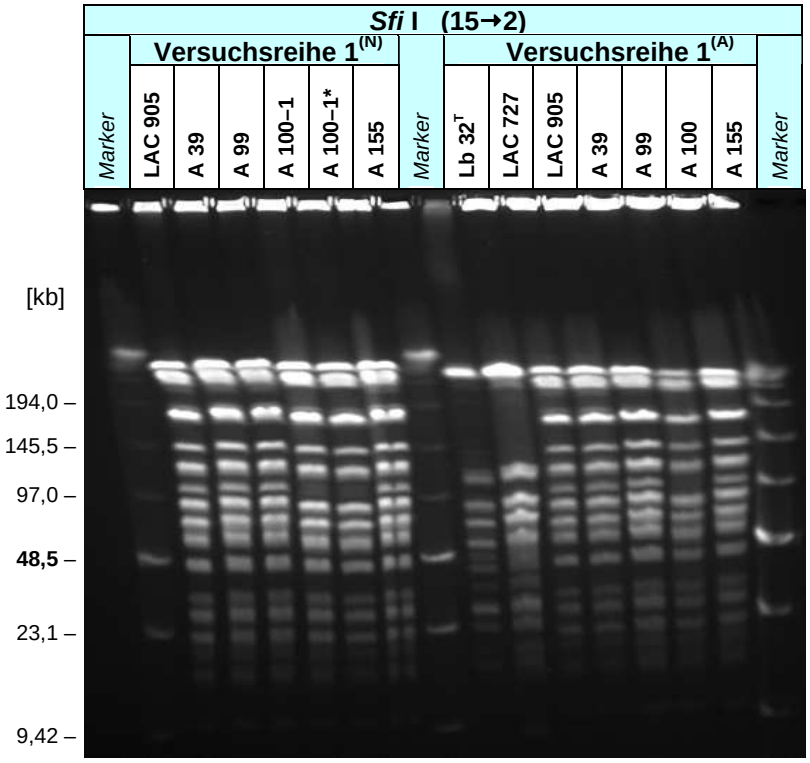


Abb. 4.2.2-1 PFGE von ***Lb. buchneri***-Stämmen nach Restriktion mit *Sfi* I.

Die Stämme A 100-1, A 100-1* und A 100 beider Versuchsreihen zeigen dieselben Bandenmuster, und lassen sich anhand der fehlenden Bande knapp oberhalb der 97,0 kb-Marke eindeutig von den restlichen Teststämmen unterscheiden. Auch eine zweifelsfreie Differenzierung aller Probenstämme von den zwei Typstämmen ist mit Hilfe der starken Bande bei etwa 180 kb möglich. Wie auch schon mit Hilfe der RAPD-PCR in *Kapitel 4.1.2* festgestellt, lassen sich die Stämme LAC 905, A 39, A 99 und A 155 nicht voneinander unterscheiden, da alle den gleichen DNA-Fingerprint aufweisen.

In der *Abbildung 4.2.2-2* wurde die PFGE nach der Restriktion mit dem Enzym *Sal* I mit der Pulszeit 15→2 sec. durchgeführt. Fehlende Banden bei den Stämmen A 100-1, A 100-1* und A 100 beider Versuchsreihen auf einer Höhe von etwa 65 kb, sowie Intensitätsunterschiede oberhalb des Bereichs der 23,1 kb-Bande lassen zwar Unterschiede zu den übrigen Teststämmen vermuten, da die Banden jedoch durchwegs verschmiert und unscharf sind, kann hier keine genaue Differenzierung getroffen werden. Außerdem ist unvollständig geschnittene chromosomale DNA im hochmolekularen Bereich zu erkennen.

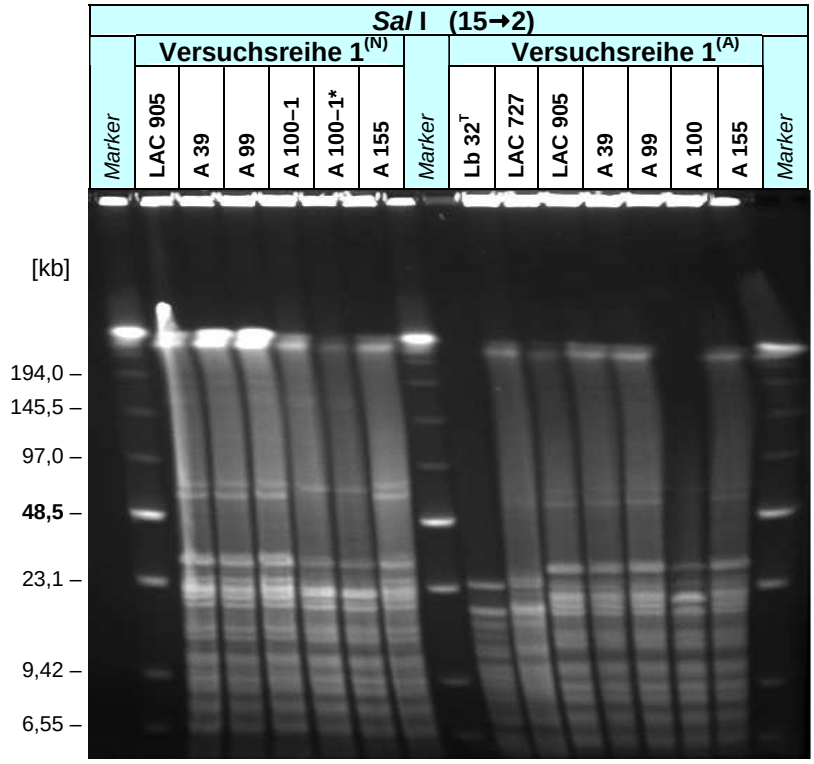


Abb. 4.2.2-2 PFGE von ***Lb. buchneri***-Stämmen nach Restriktion mit *Sal* I.

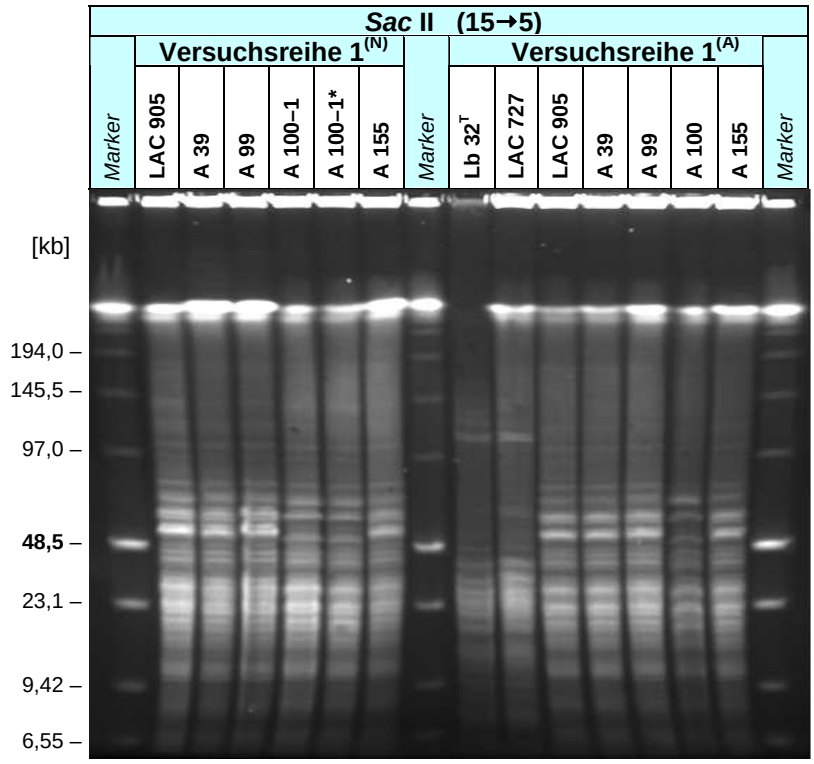


Abb. 4.2.2-3 PFGE von ***Lb. buchneri***-Stämmen nach Restriktion mit *Sac* II.

Das Bandenspektrum der PFGE nach der Restriktion mit dem Enzym *Sac* II bei einer Pulszeit von 15→5 sec. ist in *Abbildung 4.2.2-3* dargestellt. Ähnlich dem Restriktionsmuster der *Abbildung 4.2.2-2* lassen auch hier fehlende Banden auf einer Höhe von ca. 55 kb bei den Stämmen A 100-1, A 100-1* und A 100 beider Versuchsreihen Unterschiede zu den übrigen Teststämmen erahnen. Auch liegt die Vermutung nahe, dass sich die DNA der beiden Typstämme Lb 32^T und LAC 727 durch die Abwesenheit der zwei Banden im Bereich bei etwa 60 kb von den restlichen Probestämmen unterscheidet, doch da das Bandenmuster durchwegs verschmiert und unscharf ist, kann hier ebenfalls keine genaue Differenzierung getroffen werden.
Wie in *Abbildung 4.2.2-2* ist zudem im hochmolekularen Bereich bei allen Stämmen (bis auf Lb 32^T) unvollständig geschnittene chromosomale DNA sichtbar.
Das Restriktionsmuster des Enzyms *Xba* I mit der Pulszeit 15→2 sec. befindet sich im Anhang (*Abbildung 9.2.1-1*).

4.2.3 Lactobacillus buchneri – Versuchsreihe 3

Die PFGE-Bandenspektren der 21 LAC 905-Probeisolate entstanden unter Einsatz der fünf verschiedenen Restriktionsenzyme *Apa* I, *Not* I, *Sac* II, *Sal* I und *Sfi* I bei unterschiedlichen Pulszeiten und sind in den *Abbildungen 4.2.3-1* bis *4.2.3-8* dargestellt. Da die verwendeten Agarosegele nur 23 Geltaschen besaßen, allerdings pro Enzym 21 Isolate, zwei Referenzstämme, der Typstamm und mindestens ein Marker aufgetrennt werden sollten, mussten die Stämme auf zwei Gele (*a* und *b*) aufgeteilt werden.

Abbildung 4.2.3-1a/b zeigt das Ergebnis der PFGE mit einer Pulszeit von 5→25 sec., bei der *Sfi* I als Restriktionsenzym eingesetzt wurde. Oberhalb der 48,5 kb-Marke zeigen alle Stämme ein gut aufgetrenntes Restriktionsmuster, das für den Vergleichsstamm LAC 905, sowie 20 LAC 905-Isolate, einheitlich ist. Nur das Isolat LAC 905 10 hat bei genauerer Betrachtung eine zusätzliche, schwache Bande bei etwa 130 kb – ob es sich dabei um einen Artefakt, oder eine Möglichkeit zur Differenzierung von den anderen 20 Isolaten handelt, sollte

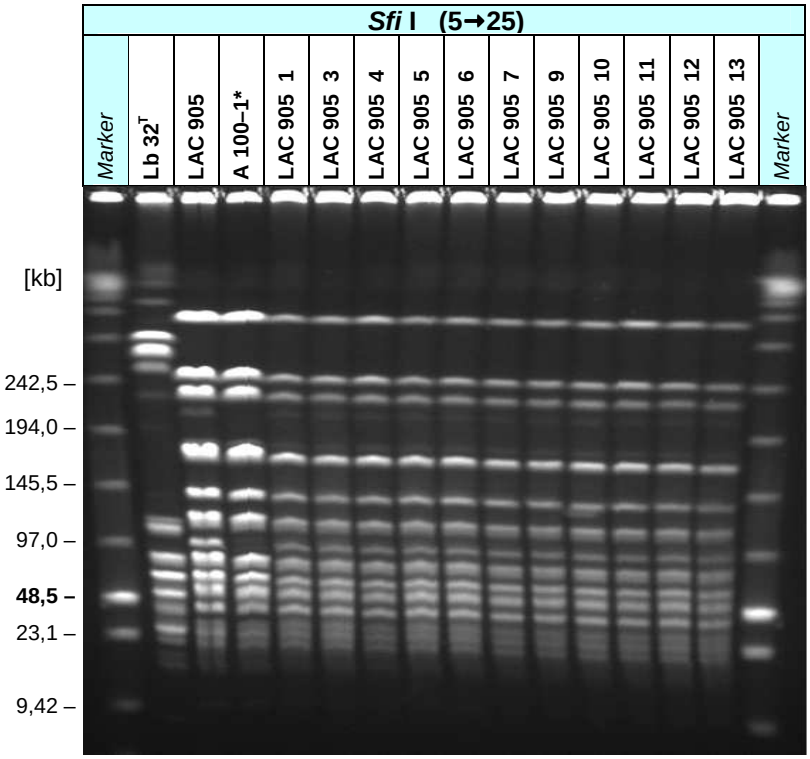


Abb. 4.2.3-1a PFGE von ***Lb. buchneri*** **LAC 905**-Isolaten nach Restriktion mit *Sfi* I.

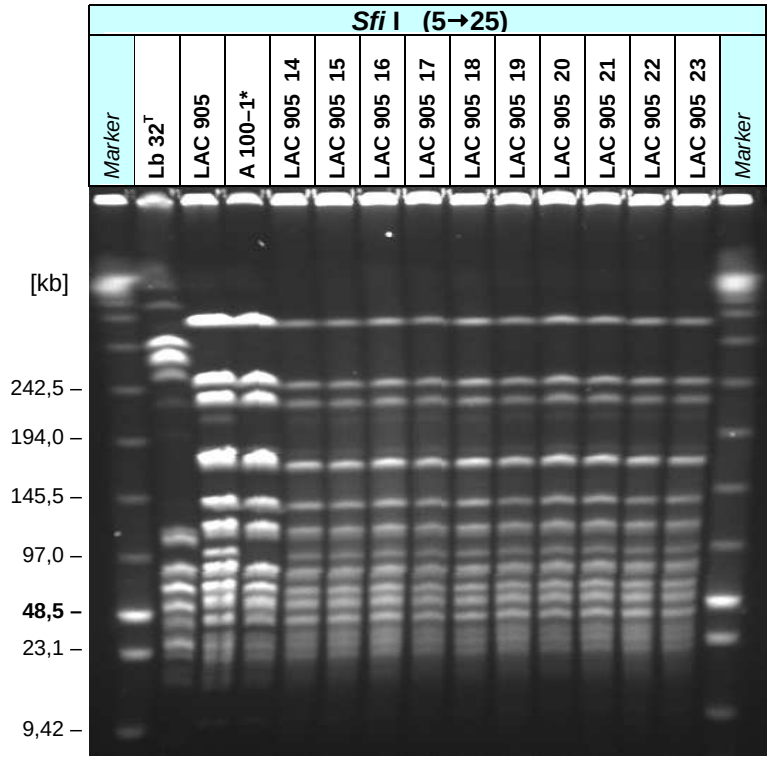


Abb. 4.2.3-1b PFGE von ***Lb. buchneri*** **LAC 905**-Isolaten nach Restriktion mit *Sfi* I.

die Verwendung der restlichen vier sequenzspezifischen Doppelstrang-Restriktionsendonucleasen klären. Letztgenannte Bande ist übrigens in *Abbildung 9.2.2-1a*, welche ebenfalls das PFGE-Bandenmuster des Restriktionsenzyms *Sfi* I, jedoch bei einer Pulszeit von 15→2 sec. repräsentiert, nicht ersichtlich.
Wie schon in *Kapitel 4.2.2* bemerkt, lassen sich die Stämme Lb 32^T und A 100-1* auch hier wieder eindeutig von den übrigen Teststämmen abgrenzen.

Durch das Schneiden der DNA mit dem Restriktionsenzym *Not* I und anschließender PFGE bei einer Pulszeit von 5→25 sec. entsteht das Bandenspektrum in *Abbildung 4.2.3-2a/b*. Das Fingerprint-Muster ist auch hier oberhalb der 48,5 kb-Bande gut aufgetrennt, und durch die zusätzliche Bande des Isolats

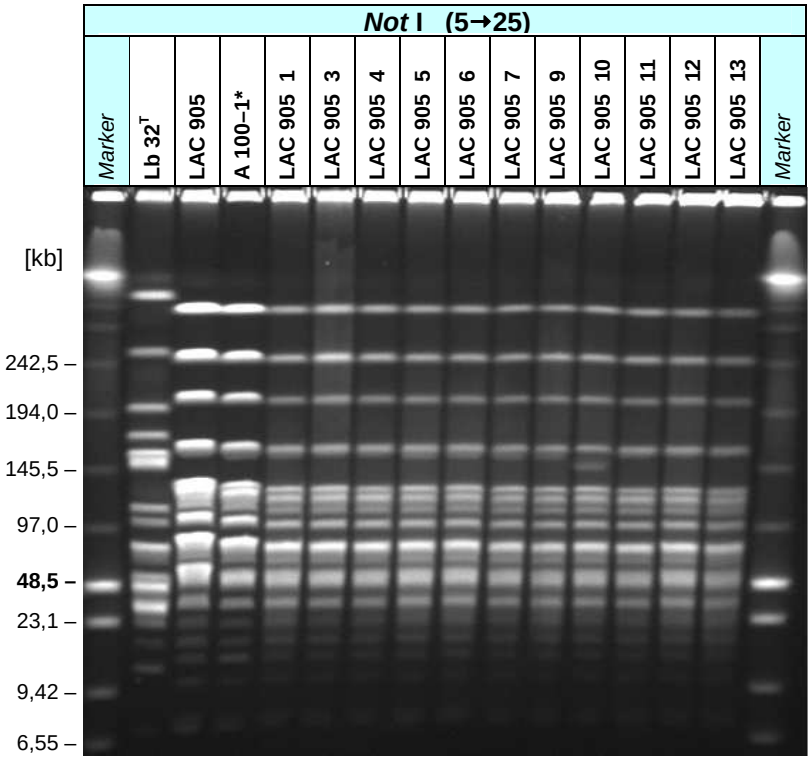


Abb. 4.2.3-2a PFGE von ***Lb. buchneri*** **LAC 905**-Isolaten nach Restriktion mit *Not* I.

LAC 905 10 auf der Höhe von ca. 145,5 kb verdichten sich die Hinweise auf eine Unterscheidbarkeit von den restlichen 20 Probeisolaten, welche wieder ein übereinstimmendes Bandenmuster aufweisen. Der Typstamm Lb 32^T lässt sich anhand seines eigenständigen DNA-Fingerprint-Musters zweifelsfrei von den anderen Stämmen differenzieren, die Referenzstämme LAC 905 und A 100-1*

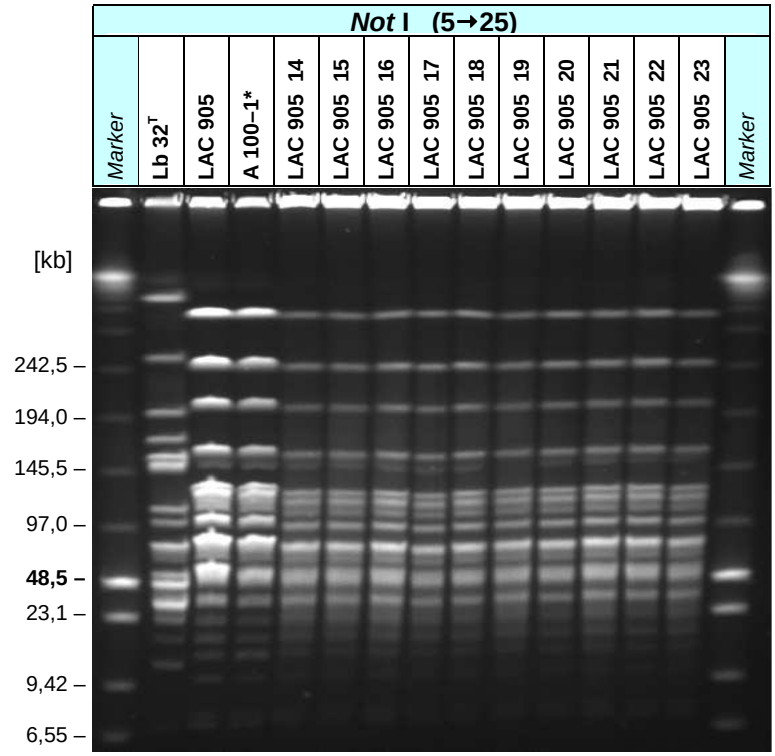


Abb. 4.2.3-2b PFGE von ***Lb. buchneri*** **LAC 905**-Isolaten nach Restriktion mit *Not* I.

weisen unter Anwendung des Enzyms *Not* I ein sehr ähnliches, beinahe identes Restriktionsmuster auf, das sich mit der verwendeten Pulszeit von 5→25 sec. nicht für eine eindeutige Unterscheidung eignet.

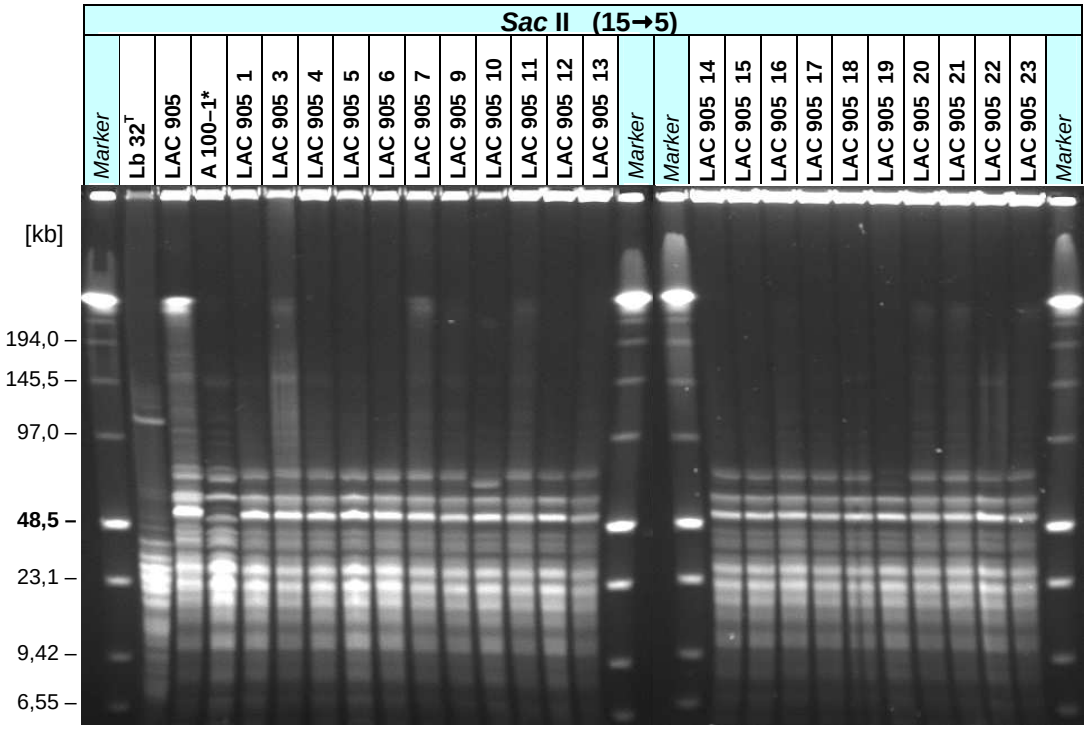


Abb. 4.2.3-3 PFGE von ***Lb. buchneri*** **LAC 905**-Isolaten nach Restriktion mit *Sac* II.

Nach der Restriktion mit dem Enzym *Sac* II wurde eine PFGE mit der Pulszeit 15→5 sec. durchgeführt (*Abbildung 4.2.3-3*). Obwohl beim Stamm LAC 905 im hochmolekularen Bereich unvollständig geschnittene chromosomale DNA sichtbar ist, und das Bandenspektrum eine große Ähnlichkeit zum zweiten Referenzstamm A 100-1* aufweist, lassen sich beide Vergleichsstämme durch die stark ausgeprägte (und beim Stamm A 100-1* fehlende) Bande bei etwa 60 kb unterscheiden. Auch eine eindeutige Abgrenzung vom Typstamm ist möglich.
Die Vermutung, dass sich das Isolat LAC 905 10 von den übrigen Testisolaten unterscheidet, wird durch die zusätzliche Bande bei ca. 75 kb verstärkt, doch auch für LAC 905 19 zeichnet sich durch die fehlende Bande bei etwa 80 kb eine erste Möglichkeit zur Unterscheidung von den restlichen Probeisolaten ab.

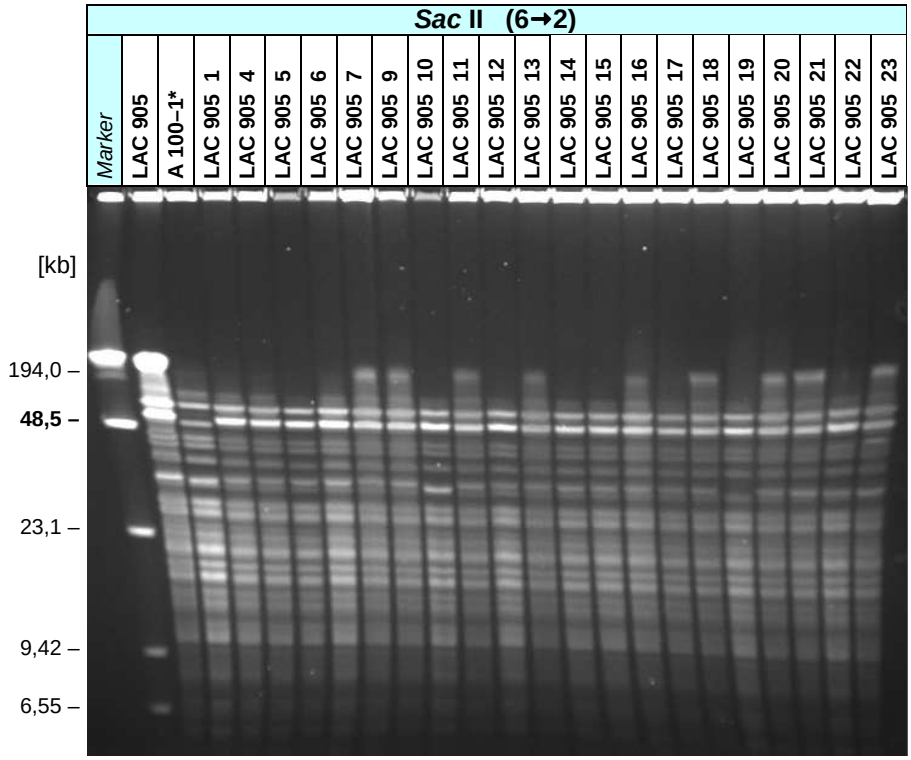


Abb. 4.2.3-4 PFGE von ***Lb. buchneri*** **LAC 905**-Isolaten nach Restriktion mit *Sac* II.

Abbildung 4.2.3-4 zeigt ebenfalls ein PFGE-Bandenmuster nach Restriktion mit *Sac* II, diesmal allerdings mit einer Pulszeit von 6→2 sec.
Aus *Abbildung 4.2.3-3* ist ersichtlich, dass durch Restriktion mit *Sac* II eher niedermolekulare DNA-Fragmente entstehen, daher erschien es sinnvoll, dicht beieinander liegende Banden unterhalb der 48,5 kb-Marke mit der Pulszeit von

6→2 sec. genauer aufzulösen. Dieses Gel sollte lediglich dem Screening des niedermolekularen Spektrums dienen, und da das Agarosegel nur 23 Probetaschen aufwies, wurden der Typstamm, sowie das Isolat LAC 905 3, aus Platzgründen nicht mitaufgetrennt. Die beiden Isolate LAC 905 10 bzw. LAC 905 19 können durch eine zusätzliche bzw. fehlende Bande auf der Höhe von etwa 36 kb abermals von den übrigen Probeisolaten differenziert werden.

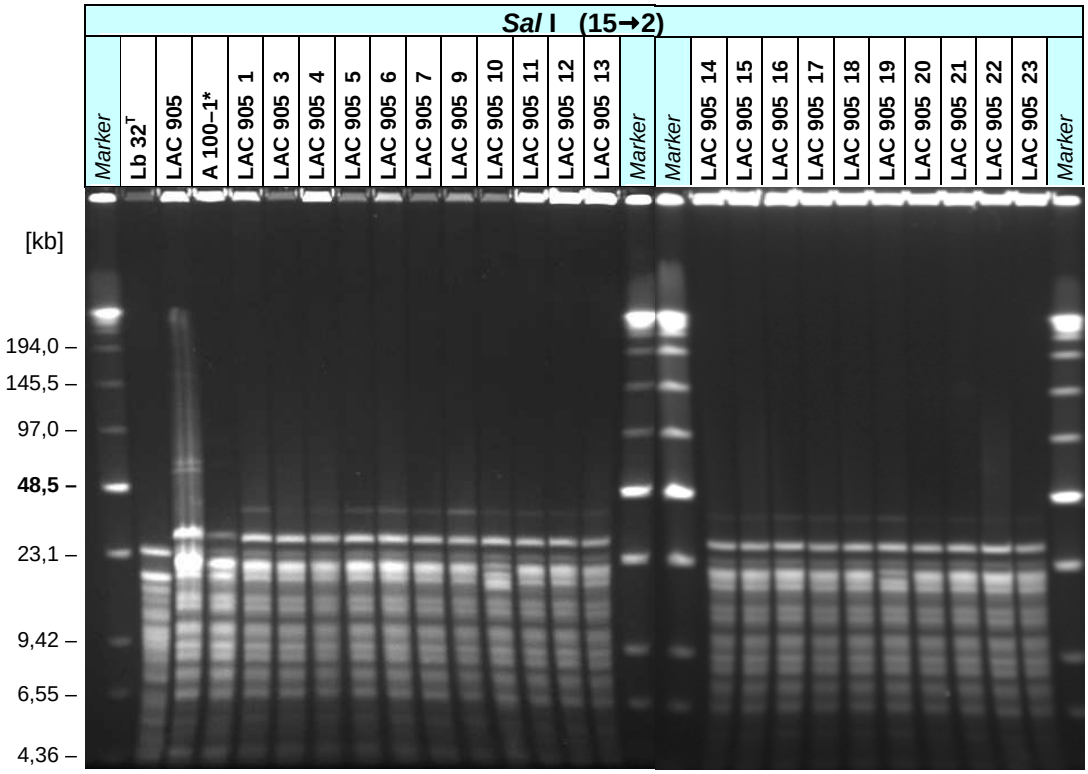


Abb. 4.2.3-5 PFGE von ***Lb. buchneri*** **LAC 905**-Isolaten nach Restriktion mit *Sal* I.

Abbildung 4.2.3-5 präsentiert das PFGE-Bandenspektrum der vierten Restriktionsendonuclease, *Sal* I, mit einer Pulszeit von 15→2 sec. Das Schneiden der DNA mit Hilfe dieses Enzyms ergibt ein eher niedermolekulares Restriktionsmuster, durch das sich die beiden Referenzstämme, die übrigens ein sehr ähnliches Muster aufweisen, eindeutig vom Typstamm unterscheiden lassen. Sowohl das Isolat LAC 905 10, als auch LAC 905 19 weisen unter dem verwendeten Enzym ein individuelles Bandenmuster auf, das sich durch eine angepasste Pulszeit (siehe *Abbildung 4.2.3*-6) noch genauer analysieren lässt. Die restlichen 19 LAC 905-Isolate zeigen einen einheitlichen DNA-Fingerprint, und können folglich nicht voneinander differenziert werden.

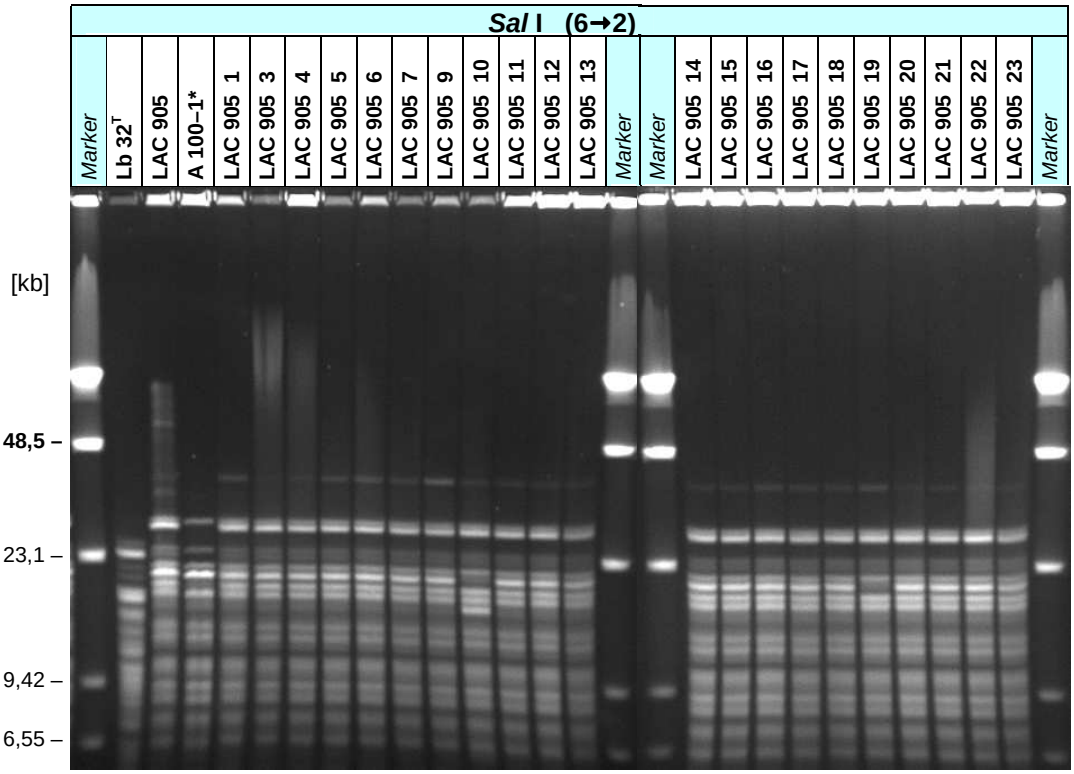


Abb. 4.2.3-6 PFGE von ***Lb. buchneri*** **LAC 905**-Isolaten nach Restriktion mit *Sal* I.

Die in *Abbildung 4.2.3-5* angewandte Pulszeit von 15→2 sec. erzeugt eine möglichst weite Auftrennung der Banden (Auflösung oberhalb- und unterhalb der 48,5 kb-Marke) des durch Schneiden der DNA resultierenden Restriktionsmusters, um so ein erstes Screening des eingesetzten Enzyms zu ermöglichen.

Das Bandenspektrum der *Abbildung 4.2.3-6* entstand ebenfalls durch Restriktion des Enzyms *Sal* I und der anschließenden PFGE, jedoch mit der schon erwähnten adaptierten Pulszeit, die diesmal 6→2 sec. betrug, und damit zu einer besseren Auftrennung der Banden unterhalb der 48,5 kb-Marke führte.
Unter Zuhilfenahme von *Sal* I bei vorhandener Pulszeit lassen sich nun die beiden Isolate LAC 905 10 und LAC 905 19 eindeutig anhand des jeweils eigenständigen Bandenmusters voneinander, aber auch von den restlichen 19 LAC 905-Isolaten, die einen identen DNA-Fingerprint zeigen, differenzieren. Obwohl die zwei Vergleichsstämme LAC 905 und A 100-1* ein relativ ähnliches Bandenspektrum aufweisen, können sie mit der verwendeten Pulszeit zweifelsfrei untereinander – und auch vom Typstamm Lb 32^T – differenziert werden.

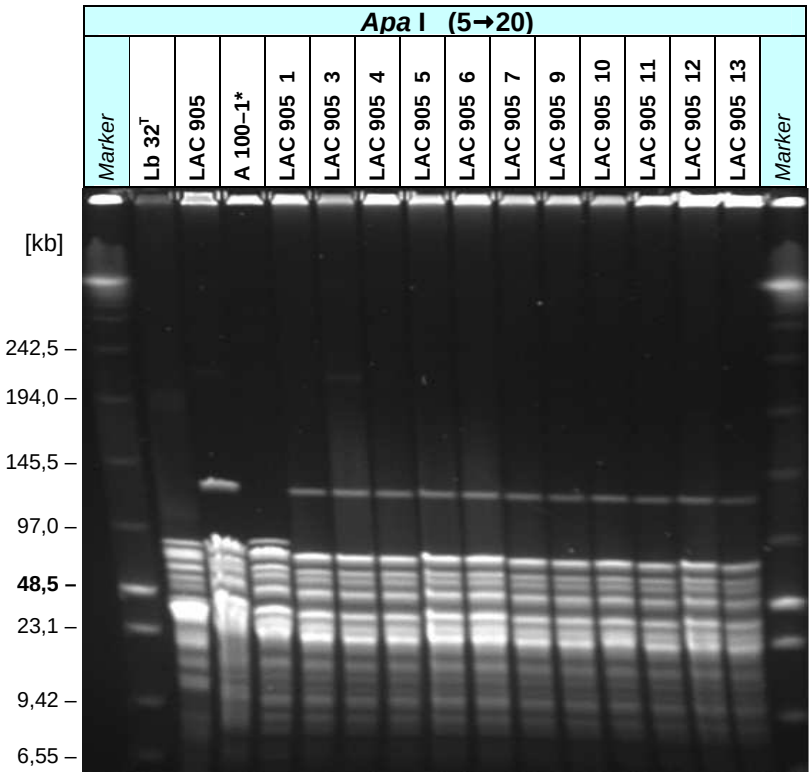


Abb. 4.2.3-7 PFGE von ***Lb. buchneri*** **LAC 905**-Isolaten nach Restriktion mit *Apa* I.

Abbildung 4.2.3-7 stellt das Fingerprintmuster der PFGE bei einer Pulszeit von 5→20 sec. nach dem Schneiden der DNA mit dem fünften und letzten Restriktionsenzym, *Apa* I, dar.

Da das vorliegende PFGE-Bandenspektrum im Bereich unterhalb der 97,0 kb-Bande relativ komprimiert ist, und aufgrund der Tatsache, dass die DNA-Fingerprint-Muster der Stämme unter Verwendung dieser Pulszeit ziemlich ähnlich erscheinen, erfolgte eine weitere PFGE mit dem Ziel, die dicht beieinander liegenden Banden besser aufzutrennen.

Abbildung 4.2.3-8 zeigt ebenfalls das Restriktionsmuster des Enzyms *Apa* I nach erfolgter PFGE, in diesem Fall allerdings mit der Pulszeit von 6→2 sec. Beide Referenzstämme können nun – trotz starker Ähnlichkeit ihres Bandenmusters – eindeutig untereinander, aber auch vom Typstamm, differenziert werden. Das Isolat LAC 905 10 weist, gegenüber den restlichen Probeisolaten, jetzt eine zusätzliche Bande auf der Höhe von etwa 23,1 kb auf, durch die das Isolat zweifelsfrei unterschieden werden kann.

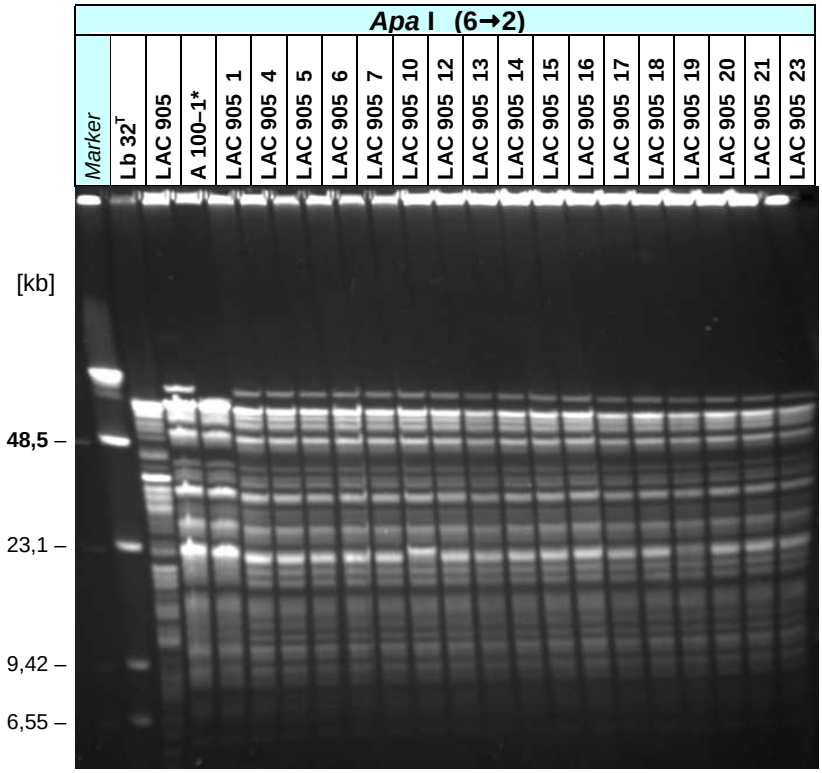


Abb. 4.2.3-8 PFGE von ***Lb. buchneri*** **LAC 905**-Isolaten nach Restriktion mit *Apa* I.

Beim Isolat LAC 905 19 ergibt sich lediglich ein Intensitätsunterschied auf Höhe der Bande bei ca. 23,1 kb, welcher sich jedoch aufgrund des sonst identen Bandenprofils nicht zu einer Unterscheidung von den restlichen Testisolaten eignet.

5. Schlussbetrachtung

5.1 RAPD-PCR

Als Vorteile der häufig zur intraspezifischen Differenzierung von Bakterienstämmen eingesetzten RAPD-PCR sind sowohl die einfache, kostengünstige und schnelle Durchführung dieser genotypischen Methode zu nennen, als auch, dass die genomische Basensequenz des zu untersuchenden Stammes nicht bekannt sein muss [PACK, 1997].
Demgegenüber stehend verwendet diese Technik nur einen bestimmten Teil des Genoms (der durch den willkürlich gewählten RAPD-Primer festgelegt wird), und nicht – wie beispielsweise unter Anwendung der PFGE – die gesamte genomische DNA, welche in die Analyse einbezogen wird.

Die Untersuchungen sollten von Anfang an mit mehreren Zufallsprimern durchgeführt werden, da ein übereinstimmendes Amplifikatspektrum zweier Stämme nicht zwangsläufig die Identität der beiden bestätigt. Jede Aussage muss durch den Einsatz mehrerer, verschiedener Primer verifiziert werden:
Erst wenn das Bandenmuster zweier Stämme beim Einsatz mehrerer, unterschiedlicher Primer stets gleich ist, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer Identität – oder zumindest von enger Verwandschaft der Stämme – ausgegangen werden.
Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass beide Stämme unter Verwendung eines ersten Primers ein übereinstimmendes Muster zeigen, welches jedoch durch Einsatz eines weiteren Primers nicht mehr ident ist. Dabei replizierte der erste Primer durch Zufall eine bei beiden Stämmen gleiche genomische Sequenz, während der folgende Primer mit seiner Basensequenz auf voneinander abweichende DNA-Sequenzen beider Stämme traf [PIEHL, 1995].

Da der Einsatz neuer Zufallsprimer zu einer immer weiteren Stammdifferenzierung führen kann, ist mit dieser Methode keine abschließende Aussage zur Stammidentität – wie im Bericht „Health and Nutritional Properties of Probiotics

in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria“ der Experten-konferenz der FAO/WHO (2001) und im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 429/2008 von der KOMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN (2008) gefordert – möglich.

Die sechs Probestämme der Versuchsreihe $1^{(N)}$, welche der Spezies *Lacto-bacillus buchneri* angehören, ließen sich mit dem RAPD-PCR-Verfahren ein-deutig von den Typstämmen Lb 32^{T} und LAC 727 differenzieren. Dabei wiesen die vier Stämme LAC 905, A 39, A 99 und A 155 einen identen DNA-Fingerprint auf, und konnten somit nicht voneinander unterschieden werden. Lediglich bei vier von insgesamt 55 eingesetzten Primern waren Unterschiede in der Intensität einiger Banden beim Vergleich des Stammes LAC 905 mit den drei Isolaten A 39, A 99 und A 155 ersichtlich. Da das Profil des Fingerprint-Musters jedoch nicht abwich, konnte (zumindest unter Verwendung der 55 Primer) von einer Identität der vier Teststämme ausgegangen werden.
Die beiden Isolate A 100-1 und A 100-1* zeigten unter Anwendung einiger Primer ein individuelles – allerdings bei allen 55 Primern untereinander gleiches – Fingerprint-Muster, womit sich die zwei Isolate zwar von den übrigen vier Probestämmen abgrenzen ließen; eine Unterscheidung zwischen A 100-1 und A 100-1* konnte allerdings, aufgrund des identen Amplifikatspektrums, nicht getroffen werden.

Der Vergleich der Versuchsreihe $1^{(N)}$ mit der Versuchsreihe $1^{(A)}$ ergab, dass die jeweils gleich bezeichneten Stämme beider Versuchsreihen exakt den selben DNA-Fingerprint besitzen (A 100 entspricht daher A 100-1 bzw. A 100-1*), und deshalb gelten die schon für Versuchsreihe $1^{(N)}$ formulierten Aussagen analog für Versuchsreihe $1^{(A)}$.

Die fünf Teststämme LAC 812, LAC 921, LAC 945, BS 1 und GW 2 der Ver-suchsreihe 2, welche der Spezies *Lactobacillus sakei* zugerechnet werden, konnten durch den Einsatz von zwölf verschiedenen Zufallsprimern nicht nur

zweifelsfrei untereinander, sondern auch vom Typstamm Lb 92^T, unterschieden werden.

Den 21 Probeisolaten der Spezies L*actobacillus buchneri*, welche der dritten und letzten Versuchsreihe angehören, sowie dem Vergleichsstamm LAC 905, wurde unter Verwendung von 28 verschiedenen RAPD-Primern ein identischer DNA-Fingerprint attestiert. Auch der zweite Vergleichsstamm A 100-1* konnte aufgrund seines individuellen Bandenmusters eindeutig von den 21 LAC 905-Isolaten (inklusive Referenzstamm LAC 905) differenziert werden. Fast alle eingesetzten Zufallsprimer ermöglichten überdies eine deutliche Abgrenzung des Typstamms Lb 32^T von den restlichen Teststämmen.

Zusätzlich gibt es noch einige Faktoren, welche die Zuverlässigkeit der Methode, und somit die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, beeinflussen:

- Hohe *Anfälligkeit gegenüber mikrobieller Kontamination*, dem durch besonders gewissenhaftes, steriles Arbeiten Sorge getragen werden muss
- *Typ des verwendeten Thermocyclers*:
  Um die Reproduzierbarkeit, und damit einen zuverlässigen Vergleich der DNA-Fingerprintmuster untereinander zu ermöglichen, sollten die eingesetzten Thermocyclertypen ident sein
- *Parameter des PCR-Programms*:
  Besonders Annealing- Zeit, -Temperatur und Zyklusanzahl manipulieren Intensität und Anzahl der Amplikons
- *Bestandteile des Amplifikationsansatzes*:
  Die Qualität der DNA (welche als Ausgangsmaterial für die RAPD-PCR dient, muss durch ein geeignetes DNA-Extraktions-Protokoll sichergestellt werden), aber auch uneinheitliche Enzym- und DNA-Konzentrationen, sowie die Reinheit der Primer, beeinflussen das RAPD-Bandenspektrum

Daraus ergibt sich die Tatsache, dass die Reproduktion der DNA-Fingerprint-Muster zur Erzielung wiederholbarer Ergebnisse nur bei einer Konstanz der

Amplifikationsbedingungen, mit entsprechend standardisierten PCR-Reagenzien und -Arbeitsabläufen, gegeben ist [MICHELI et al., 1997; PIEHL, 1995].
Die Reproduzierbarkeit der RAPD-PCR-Technik ist auch aufgrund der prinzipiellen Wahllosigkeit der *low-strigency*-Bindung der Primer nicht so einfach zu erreichen, und erfordert daher genaue Konzeption, um bei verschiedenen Experimenten ähnliche Primerbindungen – und damit vergleichbare Bandenspektren – zu erreichen [NICHOLL, 2002].

5.2 PFGE

Das DNA-Fingerprinting mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese hat gegenüber der RAPD-PCR-Methode den Vorteil, dass die gesamte genomische Information zur Verfügung steht, was sie damit sowohl zur Speziesidentifizierung, als auch zur intraspezifischen Differenzierung, befähigt. Durch die hohe Sensitivität dieser Methode können auch Stämme, die sich nur sehr geringfügig voneinander unterscheiden, differenziert werden. Auch SAULNIER et al. (1993) erreichten bei der Typisierung von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen unter Verwendung der PFGE eine feinere Differenzierung der Stämme, als mit dem RAPD-PCR-Verfahren.
Allerdings sind die Kosten dieser arbeitsintensiven Methode, in Abhängigkeit vom verwendeten Restriktionsenzym und durch den hohen Zeitaufwand bedingt, als verhältnismäßig hoch einzustufen [PIEHL, 1995].

Der erste Untersuchungsteil, der im Rahmen der PFGE durchgeführt wurde, befasste sich mit dem Vergleich der zwei Versuchsreihen $1^{(N)}$ und $1^{(A)}$, zur Identifizierung eventuell vorhandener, aber mit der RAPD-PCR nicht entdeckter Differenzen gleich bezeichneter Probenstämme beider Versuchsreihen. Auch innerhalb der einzelnen Versuchsreihen sollten mögliche Unterschiede der als bis dahin gleich geltenden Stämme LAC 905, A 39, A 99 und A 155 erkannt werden.
Die vier eingesetzten Restriktionsendonucleasen (*Sac* II, *Sal* I, *Sfi* I und *Xba* I) ergaben jedoch keinen Hinweis auf eine Unterscheidbarkeit der vier letztge-

nannten Teststämme, wodurch sich die schon mittels RAPD-PCR erhaltenen Ergebnisse für die Versuchsreihen $1^{(N)}$ und $1^{(A)}$ bestätigten (siehe *Kapitel 5.1*).
Da die fünf Teststämme der zweiten Versuchsreihe, welche der Spezies *Lactobacillus sakei* angehören, schon mittels RAPD-PCR-Technik erfolgreich differenziert werden konnten, war der Einsatz weiterer genotypischer Methoden (PFGE) nicht notwendig.

Beim zweiten Teil der Untersuchungen mittels PFGE wurden die 21 LAC 905-Probeisolate der Versuchsreihe 3 unter Einsatz von fünf verschiedenen Restriktionsenzymen *Apa* I, *Not* I, *Sac* II, *Sal* I und *Sfi* I bei unterschiedlichen Pulszeiten auf ihre Identität geprüft. Zudem sollten alle Isolate mit den zwei Vergleichsstämmen LAC 905 und A 100-1* der Versuchsreihe $1^{(N)}$, sowie dem institutseigenen Typstamm (Lb 32^T), verglichen werden.
Der Einsatz der RAPD-PCR wies schon mehrmals eine Unterscheidbarkeit der 21 LAC 905-Isolate (inklusive Referenzstamm LAC 905) und des Stammes A 100-1* aufgrund des jeweils eigenständigen Bandenspektrums nach; auch eine eindeutige Abgrenzung der Teststämme zum Typstamm Lb 32^T konnte durch diese Methode aufgezeigt werden.
Diese Unterschiede ließen sich ebenfalls zweifelsfrei durch schneiden der DNA mit den vier Restriktionsenzymen *Apa* I, *Sac* II, *Sal* I, *Sfi* I und anschließender PFGE nachweisen.
Wurden jedoch noch unter Anwendung der RAPD-PCR für alle 21 LAC 905-Probeisolate, sowie den Vergleichsstamm LAC 905, ein identischer DNA-Fingerprint bescheinigt, so zeigten sich bei der sensitiven PFGE als genotypische Methode zur *intra-species*-Differenzierung die Vorteile gegenüber der RAPD-PCR:
Die beiden Isolate LAC 905 10 und LAC 905 19 konnten mit Hilfe einiger Restriktionsenzyme, doch insbesondere durch Restriktion des Enzyms *Sal* I (mit anschließender PFGE bei einer Pulszeit von 6→2 sec.), durch ein jeweils individuelles Fingerprint-Muster nicht nur eindeutig untereinander – sondern auch von den restlichen Probeisolaten – differenziert werden.

Somit stellt die PFGE in der vorliegenden Arbeit, als anspruchsvolle, überaus empfindliche DNA-Fingerprint-Methode, eine sinnvolle Ergänzung der RAPD-PCR dar, da die Identität eines Mikroorganismus – im Sinne des so genannten Mehrphasenansatzes (engl.: „*polyphasic approach*“) – nicht nur möglichst exakt bestimmt, sondern die Ergebnisse auch durch kollektive Anwendung verschiedener molekularbiologischer Methoden abgesichert werden sollten [KNEIFEL und DOMIG, 2009; PACK, 1997].

Oft führt jedoch auch erst die Kombination von genotypischen- und phänotypischen Methoden zu eindeutigen Ergebnissen, was sowohl die taxonomische Stellung, als auch die Bestimmung der Identität von Bakterienstämmen betrifft. Ein unumstößlicher Nachweis der Identität wäre allerdings nur durch die vollständige Erfassung der Basensequenz möglich [PACK, 1997; BERNARDEAU et al., 2008; PRAKASH et al., 2007].

6. Zusammenfassung

Laktobazillen finden als Starterkulturen bei der Produktion zahlreicher fermentierter tierischer- und pflanzlicher Lebensmittel, sowie bei der Konservierung von Viehfutter (Silage) mittels Milchsäuregärung Anwendung. Zudem existiert eine Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten, welche spezifischen, klinisch getesteten Milchsäurebakterienstämmen, die als Probiotika in der Human- bzw. Tierernährung zum Einsatz kommen, gesundheitsfördernde- bzw. leistungs- und wachstumsfördernde Wirkungen bestätigen. Da die gesundheitsrelevanten Effekte der unterschiedlichen Milchsäurebakterien allerdings stammabhängig stark variieren, und um allfällige gesundheitliche Risiken auszuschließen, ist die zuverlässige, exakte Identifizierung dieser Mikroorganismen auf Stammebene von besonderer Signifikanz.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollten verschiedene Stämme der Spezies *Lactobacillus buchneri* und *Lactobacillus sakei* sowohl innerhalb der Spezies differenziert, als auch auf Stammebene identifiziert werden. Zur molekularbiologischen Identifizierung und Differenzierung der *Lactobacillus*-Isolate wurden zwei DNA-Fingerprinting-Methoden, die Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR, sowie die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), eingesetzt.
Alle sechs Probestämme der Versuchsreihe $1^{(N)}$, welche der Spezies *Lb. buchneri* angehörten, ließen sich mittels RAPD-PCR eindeutig von den Typstämmen differenzieren. Vier der Teststämme konnten jedoch aufgrund des identen DNA-Fingerprints nicht voneinander unterschieden werden. Die beiden Isolate A 100-1 und A 100-1* zeigten unter Anwendung einiger Primer ein individuelles – allerdings bei allen 55 Primern untereinander gleiches – Fingerprint-Muster, womit sich die zwei Isolate zwar von den übrigen vier Probestämmen abgrenzen ließen, eine Unterscheidung zwischen A 100-1 und A 100-1* allerdings nicht getroffen werden konnte. Der Vergleich der Versuchsreihe $1^{(N)}$ mit $1^{(A)}$ ergab unter Anwendung der RAPD-PCR, dass die jeweils gleich benannten Stämme beider Versuchsreihen exakt den selben DNA-Fingerprint besaßen. Diese Ergebnisse wurden durch Einsatz der PFGE nach

Schneiden der DNA mit den vier Restriktionenzymen *Sac* II, *Sal* I, *Sfi* I und *Xba* I bestätigt. Die fünf Teststämme der Versuchsreihe 2, welche der Spezies *Lb. sakei* zugerechnet wurden, konnten durch Einsatz von zwölf verschiedenen Zufallsprimern nicht nur zweifelsfrei untereinander, sondern auch vom Typstamm Lb 92^T, unterschieden werden. Mittels RAPD-PCR konnten 21 LAC 905-Probeisolate der Spezies *Lb. buchneri* (inklusive Referenzstamm LAC 905) vom Stamm A 100-1* und vom Typstamm Lb 32^T unterschieden werden. Wurde jedoch noch unter Anwendung von 28 verschiedenen RAPD-Primern für alle 21 Isolate, sowie den Vergleichsstamm LAC 905, ein identischer DNA-Fingerprint bescheinigt, so zeigten sich bei der sensitiven PFGE die Vorteile gegenüber der RAPD-PCR: Die beiden Isolate LAC 905 10 und LAC 905 19 konnten mit Hilfe einiger Restriktionsenzyme, doch besonders durch Restriktion des Enzyms *Sal* I (mit anschließender PFGE bei einer Pulszeit von 6→2 sec.), durch ein jeweils individuelles Fingerprint-Muster nicht nur eindeutig untereinander – sondern auch von den restlichen Probeisolaten – differenziert werden.

Die anspruchsvolle, arbeits- und kostenintensive, jedoch äußerst sensitive PFGE, welche als „Gold-Standard“ der DNA-Fingerprint-Verfahren angesehen wird, und eine exzellente Trennschärfe auf Stammebene besitzt, ergänzt die schnell durchführbare, kostengünstige, allerdings mäßig reproduzierbare, und weniger empfindliche RAPD-PCR-Technik, um nicht nur die Identität eines Mikroorganismus möglichst präzise zu bestimmen, sondern die Ergebnisse auch im Sinne eines sogenannten Mehrphasenansatzes, bei dem die Resultate mehrerer Methoden mit unterschiedlicher Aussagekraft und differenziertem, diskriminativen Potential kombiniert werden, abzusichern.

7. Abstract

Lactobacilli are widely used as starter cultures in the production of numerous fermented animal and vegetable foods, and also for the preservation of cattle fodder (silage) by lactic acid fermentation. Moreover, there exists a multitude of papers dealing with specific clinically tested lactic acid bacteria strains, used as probiotics in human and animal nutrition, which confirm health-promoting, performance- and growth-enhancing effects. However, since the health effects of different lactic acid bacteria are greatly strain dependent, and for the avoidance of possible health hazards, reliable and accurate identification of these microorganisms at strain level is of particular significance.

Within the scope of this diploma thesis, different strains of the species *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus sakei* should be differentiated both within the species and identified at strain level. For molecular biological identification and differentiation of the *Lactobacillus* isolates, two DNA-fingerprinting-methods, the Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR, and also the Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) were used.
All six test strains of the test series $1^{(N)}$ which belonged to the species *Lb. buchneri* could be clearly discriminated from the type strains applying RAPD-PCR. Four of the test strains could not be distinguished from each other due to their identical DNA-fingerprints. With the use of several primers, the two isolates A 100-1 and A 100-1* showed an individual DNA-fingerprint whereby this two isolates could be distinguished from the remaining four test strains; however, using all 55 primers, fingerprint-patterns among this two strains were equal, so they could not be differentiated from each other. Using RAPD-PCR, equally termed strains of the test series $1^{(N)}$ and $1^{(A)}$ showed exactly the same DNA-fingerprint. These results were confirmed by the application of PFGE after cutting the DNA with four restriction enzymes *Sac* II, *Sal* I, *Sfi* I and *Xba* I. By the use of twelve variant RAPD-primers, all five strains of the test series 2 which pertained to the species *Lb. sakei* could not only be discriminated doubtlessly among themselves but also from the type strain Lb 92^{T}. Using RAPD-PCR, 21

LAC 905-test isolates (and the reference strain LAC 905) which belonged to the species *Lb. buchneri* could be differentiated from the strain A 100-1*, and from the type strain Lb 32^T. By the use of 28 different RAPD-primers an identical DNA-fingerprint was confirmed for all 21 isolates and also for the reference strain LAC 905, but application of the more sensitive PFGE showed the advantages of this method in comparison to the RAPD-PCR: With the aid of several restriction enzymes (particularly cutting the DNA with restriction enzyme *Sal* I, followed by application of PFGE using 6→2 sec. as a suitable pulse time), the two isolates LAC 905 10 and LAC 905 19 could not only be discriminated clearly among each other, but also distinguished from the remaining isolates through a distinct fingerprint-pattern.

The demanding, work- and cost-intensive, but highly sensitive PFGE exhibits excellent discriminatory power at strain level, and is considered to be the “gold standard” among the DNA-fingerprinting methods. It complements the expeditious, inexpensive, but moderate reproducible and less sensitive RAPD-PCR-technique not only to determine the identity of a microorganism as accurate as possible, but also to ensure the results within the meaning of a so-called polyphasic approach, whereby the findings of different methods featuring different significance and differing discriminative potential are combined.

8. Literaturverzeichnis

ANUKAM K.C., OSAZUWA E.O., OSADOLOR H.B., BRUCE A.W., REID G. (2008): Yogurt containing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. reuteri* RC-14 helps resolve moderate diarrhea and increases CD4 count in HIV/AIDS patients. Journal of Clinical Gastroenterology; 42 (3): 239 – 243.

AXELSSON L. (2004): Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: Salminen S., Von Wright A., Ouwehand A. (2004): Lactic acid bacteria – microbiological and functional aspects. 3rd Edition, Marcel Dekker, Inc., New York; 1 – 66.

BARTEL B., MALCZAN M. (2003): Milchwirtschaftliche Mikrobiologie. 2. Auflage, (Riemelt I., Hrsg). B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg

BERG J.M., TYMOCZKO J.L., STRYER L. (2007): Erforschung der Gene und Genome. In: Stryer Biochemie. 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH, München; 148 – 181.

BERNARDEAU M., VERNOUX J.P., HENRI-DUBERNET S., GUÉGUEN M. (2008): Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. International Journal of Food Microbiology; 126: 278 – 285.

BESSELINK M.G.H., VAN SANTVOORT H.C., BUSKENS E. et al. (2008): Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. The Lancet; 371 (9613): 651 – 659.

BIBILONI R., LAY C., TANNOCK G.W. (2008): Probiotics: Lessons learned from nucleic acid-based analysis of bowel communities. In: Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods. (Cocolin L. und Ercolini D., Hrsg). Springer Science + Business Media, LCC, New York; 225 – 244.

BILLOO A.G., MEMON M.A., KHASKHELI S.A., MURTAZA G., IQBAL K., SHEKHANI M.S., SIDDIQI A.Q. (2006): Role of a probiotic (*Saccharomyces boulardii*) in management and prevention of diarrhoea. World Journal of Gastroenterology; 12 (28): 4557 – 4560.

BIO-RAD (1995): CHEF-DR® III Pulsed field electrophoresis systems. Instruction manual and applications guide. 2nd Revision, Bio-Rad Laboratories, California

BIRREN B., LAI E. (1993): Pulsed Field Gel Electrophoresis: A pracical guide. Academic Press, Inc., San Diego

BLASCHEK W., HÄNSEL R., KELLER K., REICHLING J., RIMPLER H., SCHNEIDER G. (1998): Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. 3. Folgeband. 5. Auflage, Springer-Verlag, Berlin

BROWN T.A. (2006): Gene Cloning & DNA Analysis. 5th Edition, Blackwell Publishing Ltd, Oxford

BROWN T.A. (2007): Die Untersuchung von DNA. In: Genome und Gene. Lehrbuch der molekularen Genetik. 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin; 33 – 67.

BUCKENHÜSKES H.J. (2007): Fermentierte pflanzliche Lebensmittel. In: Mikrobiologie der Lebensmittel. Lebensmittel pflanzlicher Herkunft. 2. Auflage (Holzapfel W., Hrsg). B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg; 503; 567; 519.

CHRISTEN P., JAUSSI R. (2005): Biochemie. Einführung mit 40 Lehreinheiten. 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin

COEURET V., DUBERNET S., BERNARDEAU M., GUEGUEN M., VERNOUX J.P. (2003): Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. Lait; 83 (4): 269 – 306.

COEURET V., GUEGUEN M., VERNOUX J.P. (2004) : Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. International Journal of Food Microbiology; 97 (2): 147 – 156.

COLLADO M.C., ISOLAURI E., SALMINEN S., SANZ Y. (2009): The impact of probiotic on gut health. Current Drug Metabolism; 10 (1): 68 – 78.

COLLINS M.D., RODRIGUES U.M., ASH C., AGUIRRE M., FARROW J.A.E., MARTINEZ-MURCIA A., PHILLIPS B.A., WILLIAMS A.M., WALLBANKS S. (1991): Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of the 16S rRNA. FEMS Microbiology Letters; 77: 5 – 12.

COPPOLA S., BLAIOTTA G., ERCOLINI D. (2008): Dairy products. In: Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods. (Cocolin L. und Ercolini D., Hrsg). Springer Science + Business Media, LCC, New York; 31 – 90.

DAESCHEL M.A., ANDERSSON R.E., FLEMING H.P. (1987): Microbial ecology of fermenting plant materials. FEMS Microbiology Reviews 46: 359.

DE VRESE M., SCHREZENMEIR J. (2009): Präventive Bedeutung von probiotischen Joghurts. In: Probiotika, Präbiotika und Synbiotika (Bischoff S.C., Hrsg). Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart; 174 – 185.

DITTRICH H.H., BACK W., SPONHOLZ W.R. (2008): Mikroorganismen in Getränken. In: Mikrobiologie der Lebensmittel. Getränke. 3. Auflage (Back W., Hrsg). B. Behr’s Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg; 14 – 18.

DOMIG K.J. (1998): Protein-Fingerprinting und molekularbiologische Differenzierung von Lactobacillen mit probiotischer Relevanz. Diplomarbeit, Universität für Bodenkultur, Wien

DONOHUE D.C. (2004): Safety of novel probiotic bacteria. In: Salminen S., Von Wright A., Ouwehand A. (2004): Lactic acid bacteria – microbiological and functional aspects. 3rd Edition, Marcel Dekker, Inc., New York; 531 – 546.

DOTAN I., RACHMILEWITZ D. (2005): Probiotics in inflammatory bowel disease: Possible mechanisms of action. Current Opinion in Gastroenterology; 21 (4): 426 – 430.

DUGHERA L., ELIA C., NAVINO M. et al. (2007): Effects of symbiotic preparations on constipated irritable bowel syndrome symptoms. Acta Bio Medica; 78: 111 – 116.

ENGBERINK M.F., SCHOUTEN E.G., KOK F.J., VAN MIERLO L.A.J., BROUWER I.A., GELEIJNSE J.M. (2008): Lactotripeptides show no effect on human blood pressure. Results from a double-blind randomized controlled trial. Hypertension; 51: 399 – 405.

FABIAN E., ELMADFA I. (2007): Joghurt als positiver Einflussfaktor auf das Lipidprofil normocholesterolämischer Frauen. ERNÄHRUNG/NUTRITION; Vol. 31 (5): 211 – 217.

FANARO S., MARTEN B., BAGNA R. et al. (2009): Galacto-oligosaccharides are bifidogenic and safe at weaning: A double-blind randomized multicenter study. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition; 48 (1): 82 – 88.

FELIS G.E., DELLAGLIO F. (2007): Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. Current Issues in Intestinal Microbiology; 8 (2): 44 – 61.

FINNEY M. (1998): Pulsed-Field Gel Electrophoresis. In: Ausubel F.M, Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K.: Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York; Kap. 2.5.14 – 2.5.16

FOROUHANDEH H., ZUNUNI VAHED S., HEJAZI M.S., NAHAEI M.R., DIBAVAR M.A. (2010): Isolation and phenotypic characterization of *Lacto-bacillus* species from various dairy products. Current Research in Bacteriology; 3(2): 84 – 88.

FRANK J.F. (2007): Microbial spoilage and public health concerns. Milk and dairy products. In: Food microbiology. Fundamentals and frontiers. 3rd Edition, (Doyle M.P. und Beuchat L.R., Hrsg). ASM Press, Washington, DC; 148 – 149.

FUJIMORI S., TATSUGUCHI A., GUDIS K. et al. (2007): High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. Journal of Gastroenterology and Hepatology; 22 (8): 1199 – 1204.

FUJIMORI S., GUDIS K., MITSUI K., SEO T., YONEZAWA M., TANAKA S., TATSUGUCHI A., SAKAMOTO C. (2009): A randomized controlled trial on the efficacy of synbiotic versus probiotic or prebiotic treatment to improve the quality of life in patients with ulcerative colitis. Nutrition; 25 (5): 520 – 525.

FULLER R. (1989): Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology; 66: 365 – 378.

FURRIE E., MACFARLANE S., KENNEDY A., CUMMINGS J.H., WALSH S.V., O'NEIL D.A., MACFARLANE G.T. (2005): Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: A randomised controlled pilot trial. Gut; 54 (2): 242 – 249.

GÄNZLE M.G. (2008): Starterkulturen für fermentierte Fleischerzeugnisse. In: Mikrobiologie der Lebensmittel. Fleisch – Fisch – Feinkost. 2. Auflage (Weber H., Hrsg). B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg; 367.

GÄNZLE M.G., THIELE C., VERMEULEN N., VOGEL R.F. (2005): Stoffwechsel von Laktobazillen und ihr Einfluss auf das Brotaroma. Getreidetechnologie; 59: 148 – 153.

GE HEALTHCARE (2006): Gene navigator system. User manual. General Electric Company, Uppsala

GIBSON G.R., ROBERFROID M.B. (1995): Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. The Journal of Nutrition; 125 (6): 1401 – 1412.

GIRAFFA G., CARMINATI D. (2008): Molecular techniques in food fermentation: Principles and applications. In: Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods. (Cocolin L. und Ercolini D., Hrsg). Springer Science + Business Media, LCC, New York; 1 – 30.

GOLDBERG M. (2002): Entwicklung und Einsatz von 16S rRNA Gensonden zur Identifizierung biotechnologisch genutzter Laktobazillen-Stämme der *L. acidophilus*- und der *L.casei*-Gruppe. Inaugural-Dissertation, Institut für Fleischhygiene und -technologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität, Berlin

GORLIER P. (2002): Pulsfeldgelelektrophorese. Vorlesung – Bioanalytik, Technische Universität Dresden, Fakultät Chemie – Analytisches Institut, Dresden

GREANY K.A., NETTLETON J.A., WANGEN K.E., THOMAS W., KURZER M.S. (2004): Probiotic consumption does not enhance the cholesterol-lowering

effect of soy in postmenopausal women. The Journal of Nutrition; 134: 3277 – 3283.

GUPTA V., GARG R. (2009): Probiotics. Indian Journal of Medical Microbiology; 27 (3): 202 – 209.

HAMILTON-MILLER J.M.T., GIBSON G.R., BRUCK W. (2003): Some insights into the derivation and early uses of the word ‘probiotic’. British Journal of Nutrition; 90 (4): 845.

HAMMES W.P. (1998): Bewertung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Milchsäurebakterien und Probiotika. Monatsschrift Kinderheilkunde; 146 (Suppl.1): 31 – 38.

HAMMES W.P., HERTEL C. (2006): The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin M. (Editor-in-Chief). The Prokaryotes. 3rd Edition, Vol. 4. Springer Verlag, New York; 320 – 403.

HAMMES W.P., VOGEL R.F. (2007): Sauerteig. In: Mikrobiologie der Lebensmittel. Lebensmittel pflanzlicher Herkunft. 2. Auflage (Holzapfel W., Hrsg). B. Behr’s Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg; 297 – 309.

HASKEY N., DAHL W.J. (2009): Synbiotic therapy improves quality of life and reduces symptoms in pediatric ulcerative colitis. Infant, Child, & Adolescent Nutrition; 1 (2): 88 – 93.

HEIDER J. (2007): Mikrobielle Gärungen. In: Allgemeine Mikrobiologie. 8. Auflage (Fuchs G., Hrsg; begründet von Schlegel H.G.). Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 353 – 359.

HELLER K.J. (2009): “Pharmakokinetik” und Sicherheit von Probiotika. In: Probiotika, Präbiotika und Synbiotika (Bischoff S.C., Hrsg). Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart; 88 – 94.

HICKSON M., D’SOUZA A.L., MUTHU N., ROGERS T.R., WANT S., RAJKUMAR C., BULPITT C.J. (2007): Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: Randomised double blind placebo controlled trial. British Medical Journal; 335 (7610): 80.

HOELZEL A.R., GREEN A. (1998): PCR-based DNA fingerprinting. In: Molecular genetic analysis of populations - a practical approach. 2. Auflage, Oxford University Press, New York; 229 – 232.

HOLZAPFEL W.H., HABERER P., GEISEN R., BJÖRKROTH J., SCHILLINGER U. (2001): Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. The American Journal of Clinical Nutrition; 73: S365 – S373.

HOLZAPFEL W., MÜLLER G. (2007): Kaffee. In: Mikrobiologie der Lebensmittel. Lebensmittel pflanzlicher Herkunft. 2. Auflage (Holzapfel W., Hrsg). B. Behr’s Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg; 461.

JANSOHN M. (2007): Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 4. Auflage, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, München

JAUHIAINEN T., RÖNNBACK M., VAPAATALO H., WUOLLE K., KAUTIAINEN H., GROOP P.H., KORPELA R. (2010): Long-term intervention with *Lactobacillus helveticus* fermented milk reduces augmentation index in hypertensive subjects. European Journal of Clinical Nutrition; 64: 424 – 431.

KALLIOMÄKI M., SALMINEN S., ARVILOMMI H., KERO P., KOSKINEN P., ISOLAURI E. (2001): Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomised placebo-controlled trial. Lancet; 357: 1076 – 1079.

KALLIOMÄKI M., SALMINEN S., POUSSA T., ARVILOMMI H., ISOLAURI E. (2003): Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. Lancet; 361: 1869 – 1871.

KANAMORI Y., SUGIYAMA M., HASHIZUME K., YUKI N., MOROTOMI M., TANAKA R. (2004): Experience of long-term synbiotic therapy in seven short bowel patients with refractory enterocolitis. Journal of Pediatric Surgery; 39 (11): 1686 – 1692.

KANDLER O., WEISS N. (1986): Genus *Lactobacillus*. In: Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. (Eds.), Bergey's manual of systematics bacteriology, Vol.2. Williams and Wilkins, Baltimore M.D., USA. 1209 – 1234.

KLAENHAMMER T.R. (2007): Probiotics and prebiotics. In: Food microbiology. Fundamentals and frontiers. 3rd Edition, (Doyle M.P. und Beuchat L.R., Hrsg). ASM Press, Washington, DC; 891 – 907.

KNEIFEL W., DOMIG K.J. (2009): Taxonomie von Milchsäurebakterien mit probiotischer Kapazität. In: Probiotika, Präbiotika und Synbiotika (Bischoff S.C., Hrsg). Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart; 103 – 117.

KNIPPERS R. (2006): Genomik: Gene auf Chromosomen. In: Molekulare Genetik. 9. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 479 – 530.

KOPP M.V., HENNEMUTH I., HEINZMANN A., URBANEK R. (2008): Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of probiotics for primary prevention: No clinical effects of *Lactobacillus* GG supplementation. PEDIATRICS; 121 (4): e850 – e856.

KORAKLI M., GÄNZLE M., VOGEL R.F. (2005): Die Bildung von Oligo- und Exopolysacchariden durch Sauerteig-Laktobazillen. Getreidetechnologie; 59: 91 – 94.

KOSTINEK M., FRANZ C. (2007): Kakao. In: Mikrobiologie der Lebensmittel. Lebensmittel pflanzlicher Herkunft. 2. Auflage (Holzapfel W., Hrsg). B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg; 474.

KOTOWSKA M., ALBRECHT P., SZAJEWSKA H. (2005): *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: A randomized double-blind placebo-controlled trial. Alimentary Pharmacology & Therapeutics; 21 (5): 583 – 590.

KOTZAMPASSI K., GIAMARELLOS-BOURBOULIS E.J., VOUDOURIS A., KAZAMIAS P., ELEFTHERIADIS E. (2006): Benefits of a synbiotic formula (Synbiotic 2000Forte®) in critically ill trauma patients: Early results of a randomized controlled trial. World Journal of Surgery; 30 (10): 1848 – 1855.

KRÄMER J. (2007): Lebensmittel-Mikrobiologie. 5. Auflage, Verlag Eugen Ulmer KG, Stuttgart

LAND M.H., ROUSTER-STEVENS K., WOODS C.R., CANNON M.L., CNOTA J., SHETTY A.K. (2005): *Lactobacillus* sepsis associated with probiotic therapy. Pedriatrics; 115: 178 – 181.

LOTTSPEICH F., ENGELS J.W. (2006): Bioanalytik. 2. Auflage, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, München

MACFARLANE G.T., STEED H., MACFARLANE S. (2008): Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. Journal of Applied Microbiology; 104: 305 – 344.

MADIGAN M.T., MARTINKO J.M., PARKER J. (2003): Brock Mikrobiologie. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin

MADSEN K. (2008): Probiotics in critically ill patients. Journal of Clinical Gastroenterology; 42 Suppl.3 (1): S116 – S118.

MANZANARES W., HARDY G. (2008): The role of prebiotics and synbiotics in critically ill patients. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care; 11 (6): 782 – 789.

MAYER H.K., AMTMANN E., PHILIPPI E., STEINEGGER G., MAYRHOFER S., KNEIFEL W. (2007): Molecular discrimination of new isolates of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* from reference strains and commercial probiotic strains. International Dairy Journal; 17 (5): 565 – 573.

McFARLAND L.V. (2007): Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. Travel Medicine and Infectious Disease; 5: 97 – 105.

MEIER R. (2009): Medizinische Bedeutung von Präbiotika und Synbiotika. In: Probiotika, Präbiotika und Synbiotika (Bischoff S.C., Hrsg). Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart; 186 – 193.

MICHELI M.R., BOVA R., D'AMBROSIO E. (1997): Random Amplified Polymorphic DNA assay. In: Fingerprinting methods based on Arbitrarily Primed PCR. Springer-Verlag, Berlin

MOHANIA D., NAGPAL R., KUMAR M., BHARDWAJ A., YADAV M., JAIN S., MAROTTA F., SINGH V., PARKASH O., YADAV H. (2008): Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. Journal of Digestive Diseases; 9 (4): 190 – 198.

MONTVILLE T.J., CHIKINDAS M.L. (2007): Biopreservation of foods. In: Food microbiology. Fundamentals and frontiers. 3rd Edition, (Doyle M.P. und Beuchat L.R., Hrsg). ASM Press, Washington, DC; 756 – 757.

MUÑOZ P., BOUZA E., CUENCA-ESTRELLA M. et al. (2005): *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: An emerging infectious disease. Clinical Infectious Diseases; 40: 1625 – 1634.

MÜLLER G., TRIERWEILER B. (2007): Obsterzeugnisse. In: Mikrobiologie der Lebensmittel. Lebensmittel pflanzlicher Herkunft. 2. Auflage (Holzapfel W., Hrsg). B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg; 173.

MÜLHARDT C. (2009): Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

NEWTON C.R., GRAHAM A. (1994): PCR. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg

NICHOLL D.S.T. (2002): An introduction to genetic engineering. 2nd Edition, Cambridge University Press, Cambridge

NINESS K.R. (1999): Inulin and oligofructose: What are they?. The Journal of Nutrition; 129 (7 Suppl): 1402 – 1406.

NYCHAS G.J.E., MARSHALL D.L., SOFOS J.N (2007): Microbial spoilage and public health concerns. Meat, poultry and seafood. In: Food microbiology. Fundamentals and frontiers. 3rd Edition, (Doyle M.P. und Beuchat L.R., Hrsg). ASM Press, Washington, DC; 106 – 126.

OGAWA T., HASHIKAWA S., ASAI Y., SAKAMOTO H., YASUDA K., MAKIMURA Y. (2006): A new synbiotic, *Lactobacillus casei* subsp. c*asei*

together with dextran, reduces murine and human allergic reaction. FEMS Immunology and Medical Microbiology; 46 (3): 400 – 409.

OUWEHAND A.C., SALMINEN S., ISOLAURI E. (2002): Probiotics: An overview of beneficial effects. Antonie van Leeuwenhoek; 82: 279 – 289.

ÖLSCHLÄGER T.A., HACKER J. (2009): Definition und Wirkmechanismen der Probiotika, Präbiotika und Synbiotika. In: Probiotika, Präbiotika und Synbiotika (Bischoff S.C., Hrsg). Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart; 76 – 87.

PACK A. (1997): Protein-Fingerprinting zur Abgrenzung von Spezies und Stämmen aus der „*Lactobacillus acidophilus*-Gruppe“. Inaugural-Dissertation, Institut für Fleischhygiene und -technologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität, Berlin

PIEHL I. (1995): Molekularbiologische Feindifferenzierung biotechnologisch genutzter Laktobazillenstämme und ihre Abgrenzung von klinischen Isolaten mit der Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction-Methode (AP-PCR). Inaugural-Dissertation, Institut für Fleischhygiene und -technologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität, Berlin

PRAKASH O., VERMA M., SHARMA P., KUMAR M., KUMARI K., SINGH A., KUMARI H., JIT S., GUPTA S.K., KHANNA M., LAL R. (2007): Polyphasic approach of bacterial classification – an overview of recent advances. Indian Journal of Microbiology; 47 (2): 98 – 108.

RAFTER J., BENNETT M., CADERNI G. et al. (2007): Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. The American Journal of Clinical Nutrition; 85 (2): 488 – 496.

RAYES N., SEEHOFER D., THERUVATH T., SCHILLER R.A., LANGREHR J.M., JONAS S., BENGMARK S., NEUHAUS P. (2005): Supply of pre- and

probiotics reduces bacterial infection rates after liver transplantation – a randomized, double-blind trial. American Journal of Transplantation; 5 (1): 125 – 130.

RAYES N., SEEHOFER D., NEUHAUS P. (2009): Prebiotics, probiotics, synbiotics in surgery – are they only trendy, truly effective or even dangerous? Langenbeck's Archives of Surgery; 394 (3): 547 – 555.

REUTER, G. (2009): Der historische Hintergrund des prophylaktischen und therapeutischen Einsatzes von Bakterienkulturen und dessen Weiterentwicklung zum Probiotikaprinzip mit Präbiotika und Synbiotika. In: Probiotika, Präbiotika und Synbiotika (Bischoff S.C., Hrsg). Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart; 95 – 102.

RICHTER G. (2003): Praktische Biochemie – Grundlagen und Techniken. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

RIORDAN S.M., SKINNER N.A., McIVER C.J., LIU Q., BENGMARK S., BIHARI D., VISVANATHAN K. (2007): Synbiotic-associated improvement in liver function in cirrhotic patients: Relation to changes in circulating cytokine messenger RNA and protein levels. Microbial Ecology in Health and Disease; 19 (1): 7 – 16.

ROBERFROID M. (2007): Prebiotics: The concept revisited. The Journal of Nutrition; 137: 830S – 837S.

SADRZADEH-YEGANEH H. (2009): The effects of probiotic and conventional yoghurt on lipid profile and parameters of oxidative stress in healthy women. Dissertation, Department of Nutrition Sciences, University of Vienna

SALMINEN M.K., TYNKKYNEN S., RAUTELIN H., POUSSA T., SAXELIN M., RISTOLA M., VALTONEN V., JÄRVINEN A. (2004): The efficacy and safety of

probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG on prolonged, noninfectious diarrhea in HIV patients on antiretroviral therapy: A randomized, placebo-controlled, crossover study. HIV Clinical Trials; 5 (4): 183 – 191.

SALMINEN S., VON WRIGHT A., OUWEHAND A. (2004): Lactic acid bacteria – microbiological and functional aspects. 3rd Edition, Marcel Dekker, Inc., New York

SANDERS M.E. (2000): Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. The Journal of Nutrition; 130: 384S – 390S.

SAULNIER P., BOURNEIX C., PREVOST G., ANDREMONT A. (1993) : Random Amplified Polymorphic DNA assay is less discriminant than Pulsed-Field Gel Electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* Journal of Clinical Microbiology; 31: 982 – 985

SÄEMANN M.D., BÖHMIG G.A., ÖSTERREICHER C.H., BURTSCHER H., PAROLINI O., DIAKOS C., STÖCKL J., HÖRL W.H., ZLABINGER G.J. (2000): Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: Potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. The FASEB Journal.

SCHLEIFER K.H. (2009): Classification of *Bacteria* and *Archaea*: Past, present and future. Systematic and Applied Microbiology; 32 (8): 533 – 542.

SCHMID R.D. (2006): Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik. 2.Auflage, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; 228.

SCHREZENMEIR J., DE VRESE M. (2001): Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. The American Journal of Clinical Nutrition; 73 (2): 361S – 364S.

SHIMIZU K., OGURA H., GOTO M. et al. (2009): Synbiotics decrease the incidence of septic complications in patients with severe SIRS: A preliminary report. Digestive Diseases and Sciences; 54 (5): 1071 – 1078.

SPINDLER-VESEL A., BENGMARK S., VOVK I., CEROVIC O., KOMPAN L. (2007): Synbiotics, prebiotics, glutamine, or peptide in early enteral nutrition: A randomized study in trauma patients. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition; 31 (2): 119 – 126.

ST-ONGE M.P., FARNWORTH E.R., SAVARD T., CHABOT D., MAFU A., JONES P.J.H. (2002): Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: A randomized controlled trial. BMC Complementary and Alternative Medicine; 2:1.

SZYMAŃSKI H., PEJCZ J., JAWIEŃ M., CHMIELARCZYK A., STRUS M., HECZKO P.B. (2006): Treatment of acute infectious diarrhoea in infants and children with a mixture of three *Lactobacillus rhamnosus* strains –a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Alimentary Pharmacology & Therapeutics; 23 (2): 247 – 253.

TEMMERMAN R., HUYS G., SWINGS J. (2004): Identification of lactic acid bacteria: Culture-dependent and culture-independent methods. Trends in Food Science & Technology; 15 (7-8): 348 – 359.

TERAN C.G., TERAN-ESCALERA C.N., VILLARROEL P. (2009): Nitazoxanide vs. probiotics for the treatment of acute rotavirus diarrhea in children: A randomized, single-blind, controlled trial in Bolivian children. International Journal of Infectious Diseases; 13 (4): 518 – 523.

TERNES W., TÄUFEL A., TUNGER L., ZOBEL M. (2007): Lexikon der Lebensmittel und der Lebensmittelchemie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

TRAPPITSCH B.M. (2009): Molekularbiologische Untersuchungen zur Wiederfindung eines probiotischen *Enterococcus faecium*-Stammes aus Isolaten einer Tierstudie. Diplomarbeit, Universität für Bodenkultur, Wien

UCHIDA K., TAKAHASHI T., INOUE M., MOROTOMI M., OTAKE K., NAKAZAWA M., TSUKAMOTO Y., MIKI C., KUSUNOKI M. (2007): Immunonutritional effects during synbiotics therapy in pediatric patients with short bowel syndrome. Pediatric Surgery International; 23 (3): 243 – 248.

QIAGEN (2006): DNeasy® Blood & Tissue Kit for purification of total DNA from bacteria, DNeasy® Blood & Tissue Handbook, 07/2006; 9 – 46

WEBER H. (2008): Mikrobiologie der Rohwurst. In: Mikrobiologie der Lebensmittel. Fleisch – Fisch – Feinkost. 2. Auflage (Weber H., Hrsg). B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg; 330 – 332; 362 – 363.

WESTERMEIER, R. (1990): Elektrophorese-Praktikum. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

WICHELHAUS T.A., SCHÄFER V., BRADE V. (2000): Typisierungsverfahren in der Infektionsepidemiologie. Chemotherapie Journal; 9 (2): 93 – 98.

8.1 Normen, Rechtsvorschriften, Standards

DAS EUROPÄISCHE PARLAMENT UND DER RAT DER EUROPÄISCHEN UNION (1997): Verordnung (EG) Nr. 258/1997 des europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Januar 1997 über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, 004.001-1 – 003.001-10, 07.08.2009

DAS EUROPÄISCHE PARLAMENT UND DER RAT DER EUROPÄISCHEN UNION (2002): Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, L 31/1 – 31/24, 01.02.2002

DAS EUROPÄISCHE PARLAMENT UND DER RAT DER EUROPÄISCHEN UNION (2003): Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe und Verwendung in der Tierernährung. Amtsblatt der Europäischen Union, 003.001-1 – 003.001-27, 07.08.2009

DAS EUROPÄISCHE PARLAMENT UND DER RAT DER EUROPÄISCHEN UNION (2006): Verordnung (EG) Nr. 1924/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 20. Dezember 2006 über nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben über Lebensmittel. Amtsblatt der Europäischen Union, L 12/3 – L 12/18, 18.01.2007

DIE KOMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN (2005):
Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. Amtsblatt der Europäischen Union, Nr. L 338/1–26, 22.12.2005

DIE KOMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN (2008):
Verordnung (EG) Nr. 429/2008 der Kommission vom 25. April 2008 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Erstellung und Vorlage von Anträgen sowie der Bewertung und Zulassung von Futtermittelzusatzstoffen. Amtsblatt der Europäischen Union, Nr. L 133/15, 22.5.2008

FAO/WHO (2001):
Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria., October 2001

9. Anhang

9.1 RAPD-PCR

9.1.1 Lactobacillus buchneri – Versuchsreihe 1(N)

Im *Kapitel 4.1.1* (Ergebnisse und Diskussion) wurden schon alle diskussionsrelevanten Bandenspektren des Stammes *Lactobacillus buchneri* der Versuchsreihe 1(N) dargestellt; die restlichen unspezifischen Bandenmuster, deren Auswertung keine weiteren Hinweise liefert, sollen in diesem Kapitel angeführt werden. Eine molekularbiologische Differenzierung (*„strain typing“*) der sechs *Lb. buchneri*-Isolate untereinander ist mit den folgenden Abbildungen nicht möglich, da die verwendeten Primer für alle sechs Isolate einen (nahezu) identen DNA-Fingerprint zeigen. Die sechs Teststämme können allerdings eindeutig von den beiden Typstämmen unterschieden werden (z.B. mit Primer 1, 2, 3, 4, 5, 6, 18), obwohl auch einige Bandenspektren eine große Ähnlichkeit untereinander besitzen (z.B. unter der Verwendung von Primer 12, 14, 19, 22, 32).

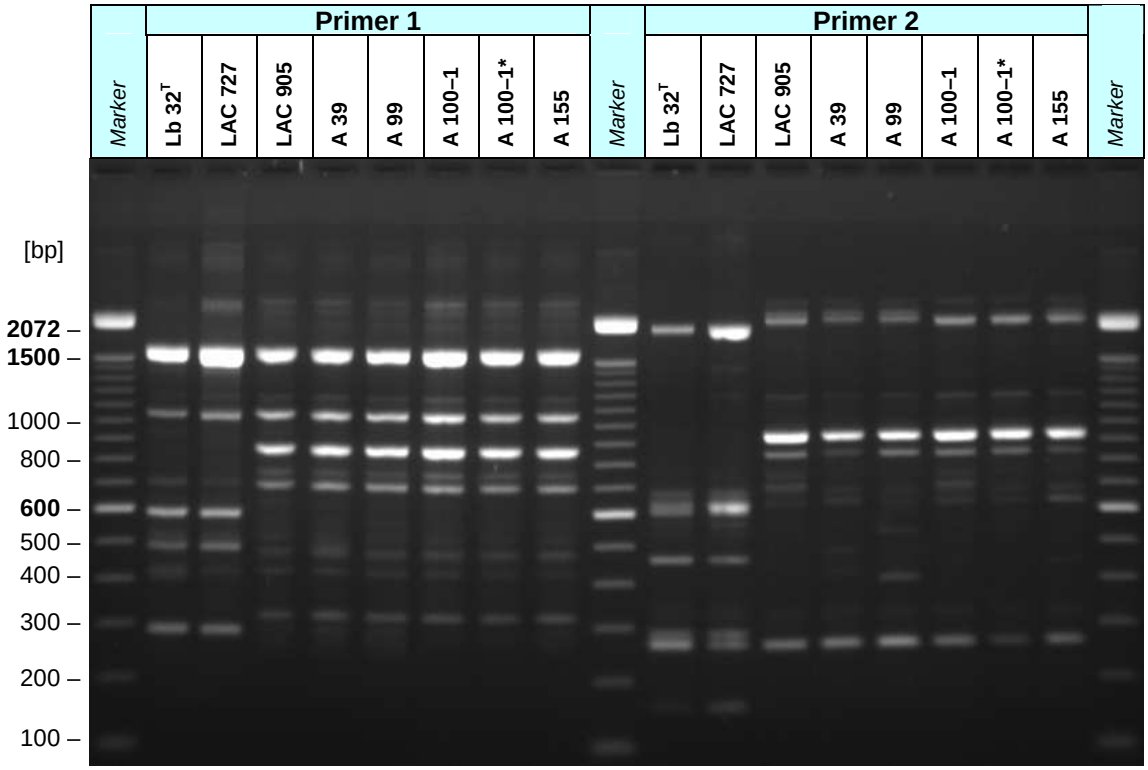


Abb. 9.1.1-1 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 1 und 2.

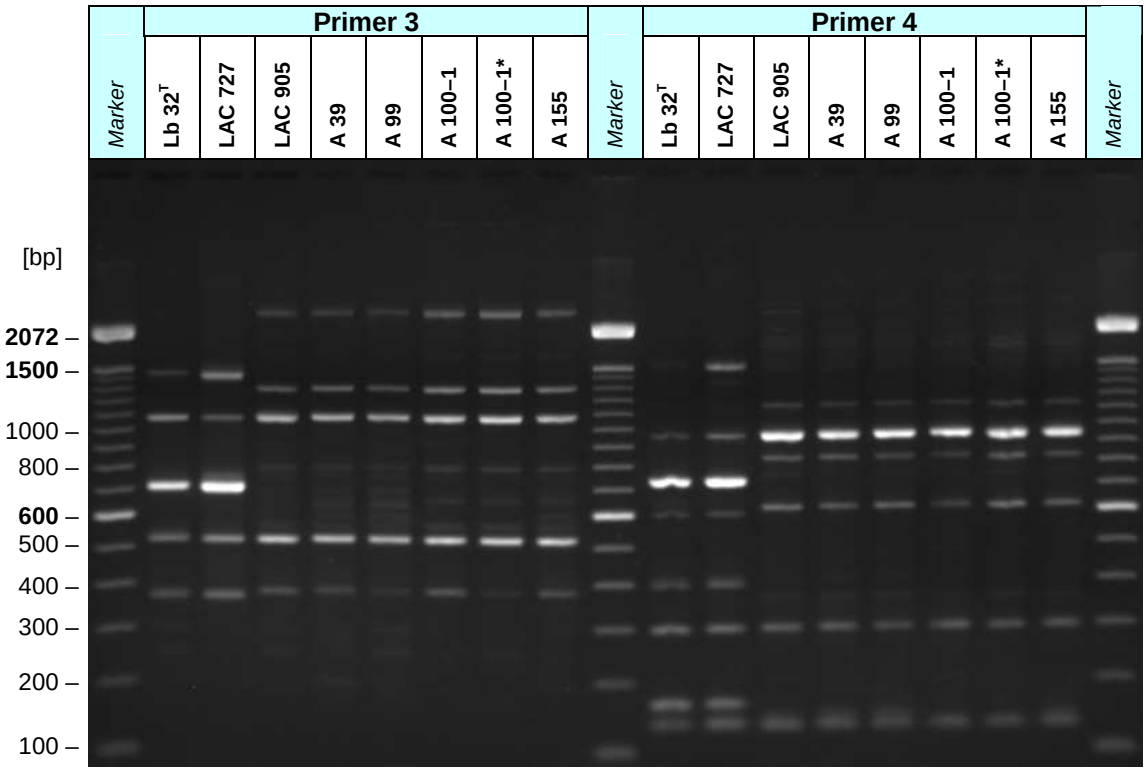


Abb. 9.1.1-2 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 3 und 4.

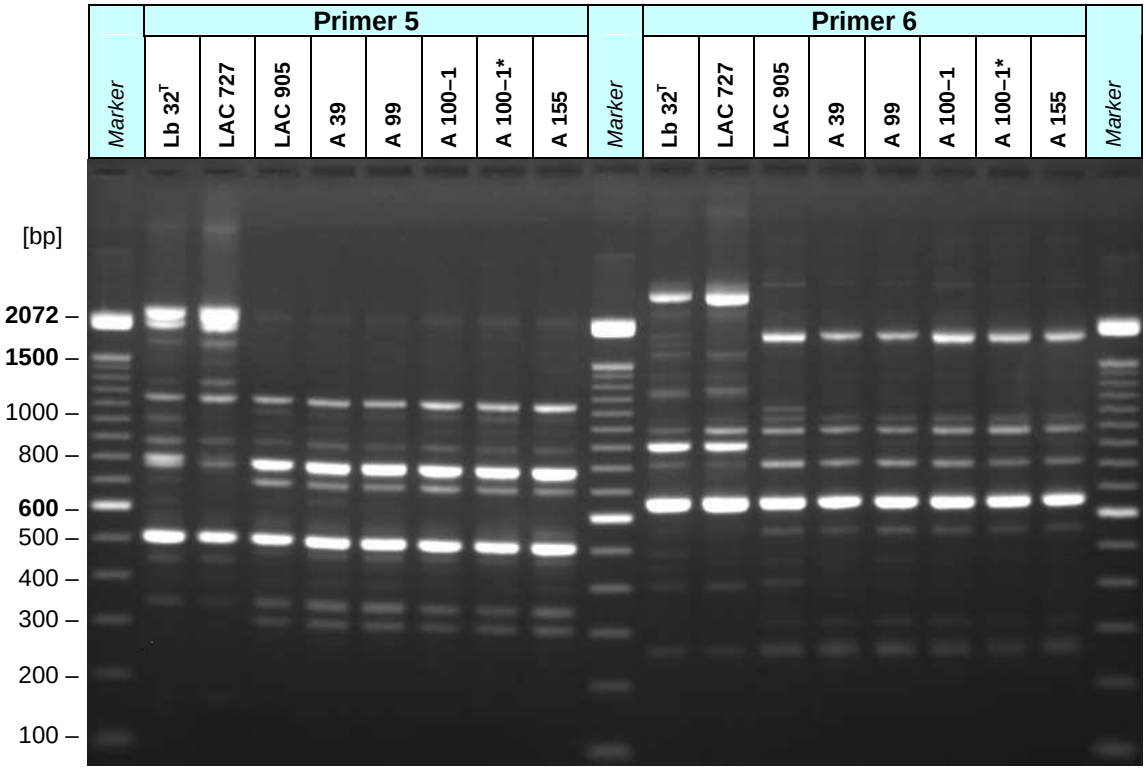


Abb. 9.1.1-3 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 5 und 6.

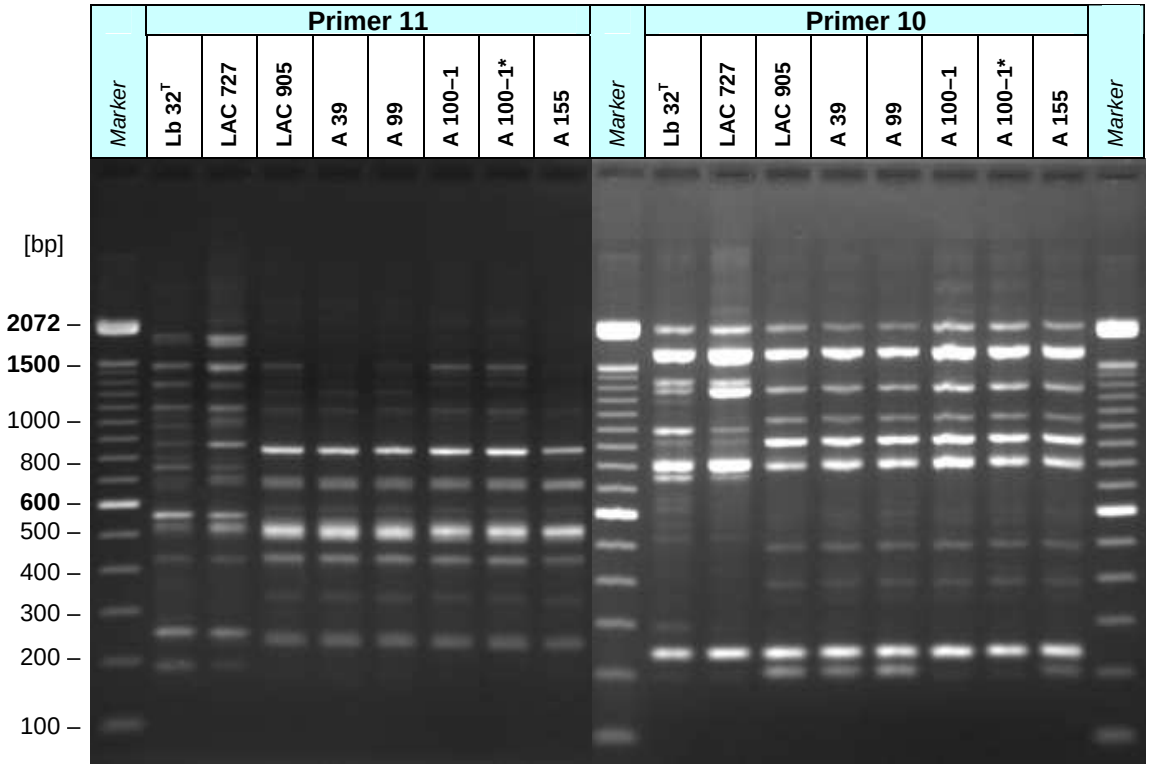


Abb. 9.1.1-4 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 11 und 10.

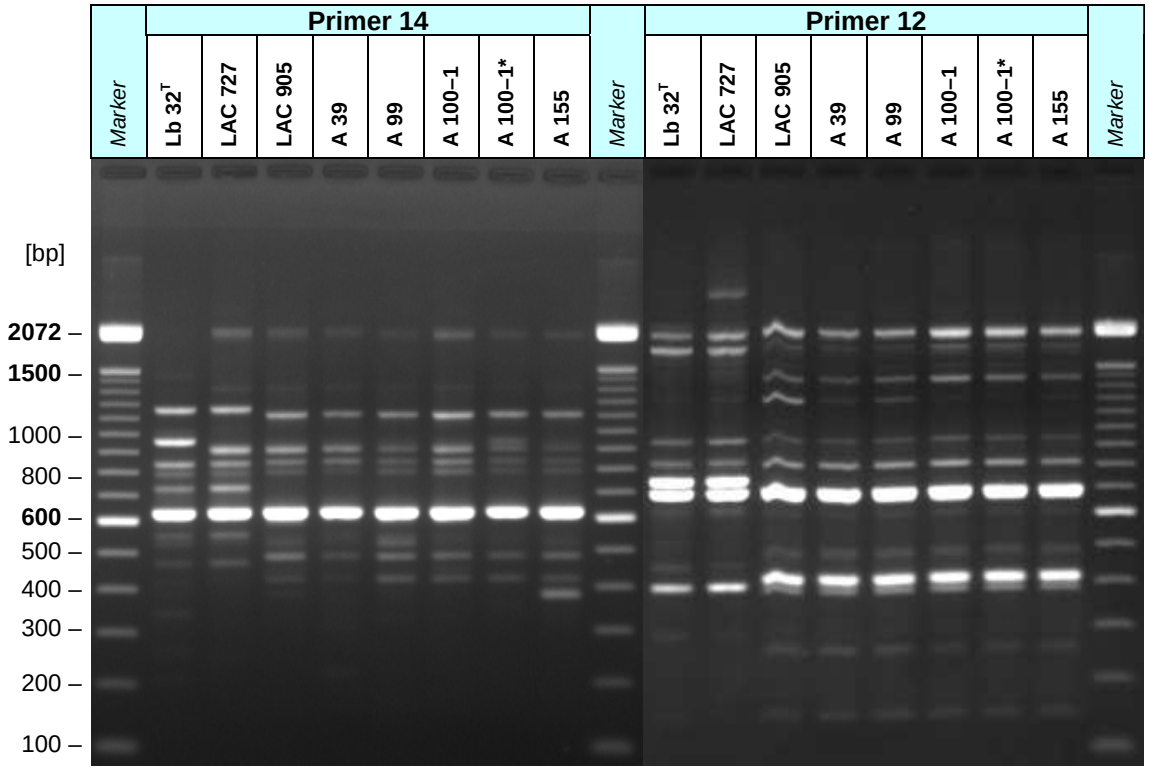


Abb. 9.1.1-5 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 14 und 12.

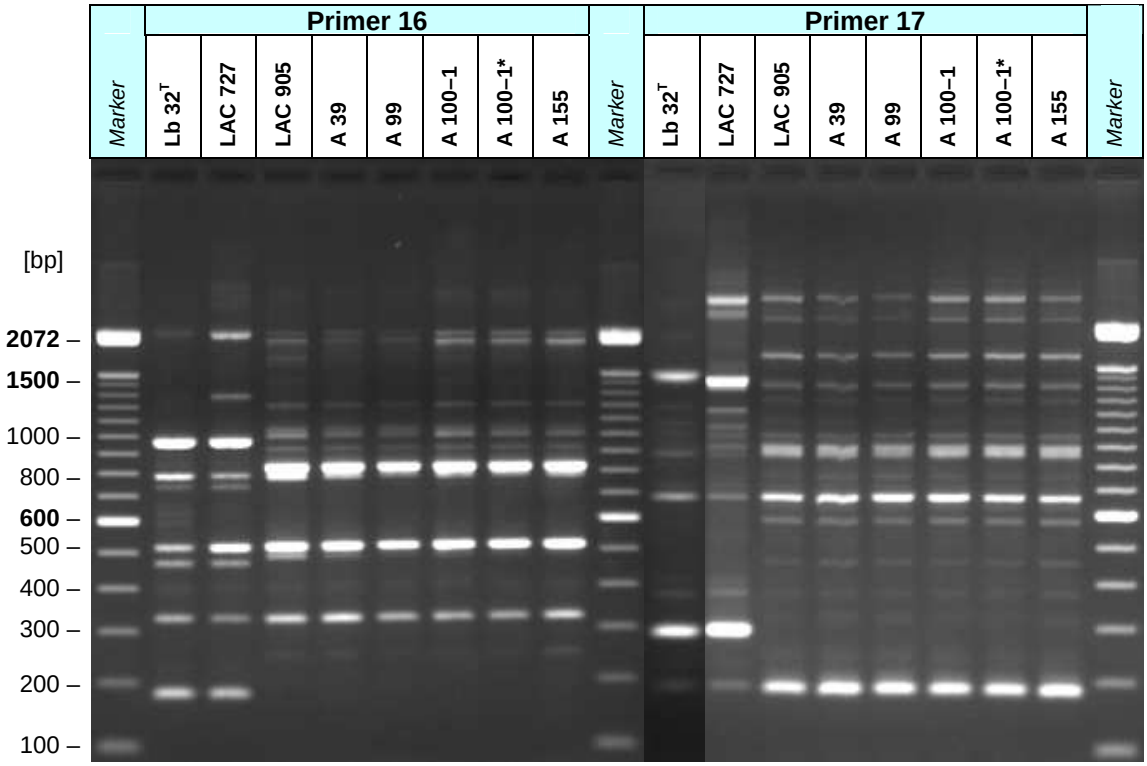


Abb. 9.1.1-6 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 16 und 17.

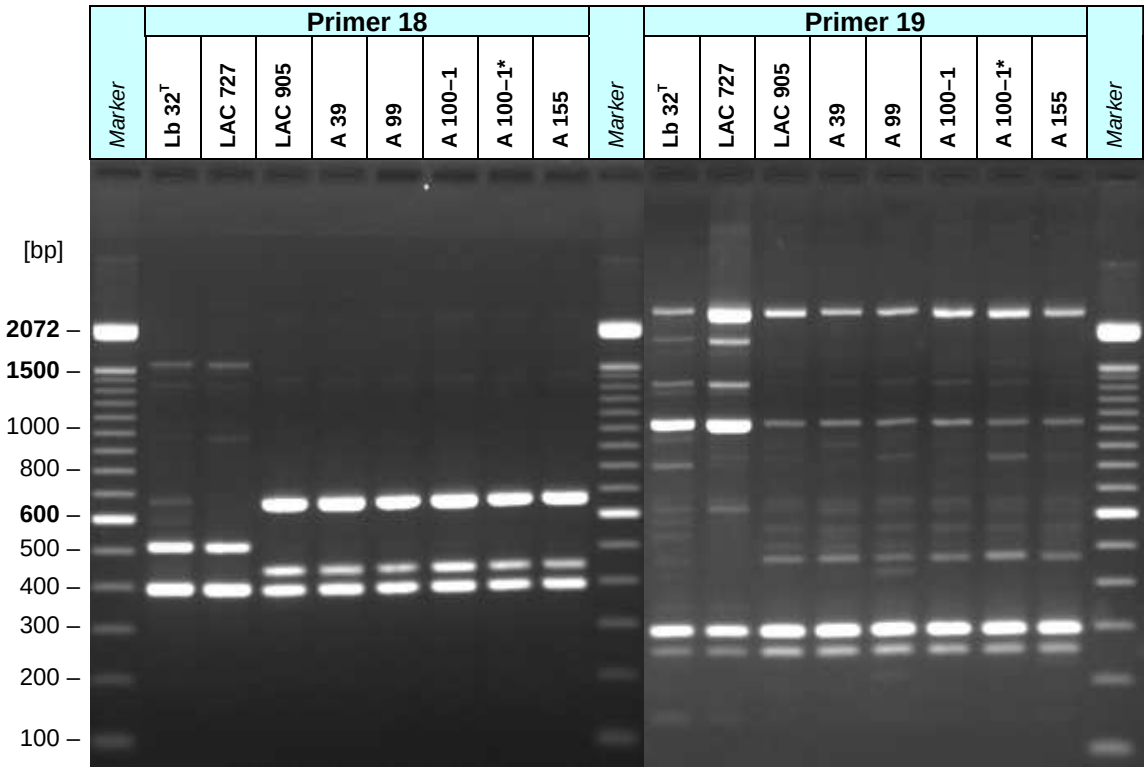


Abb. 9.1.1-7 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 18 und 19.

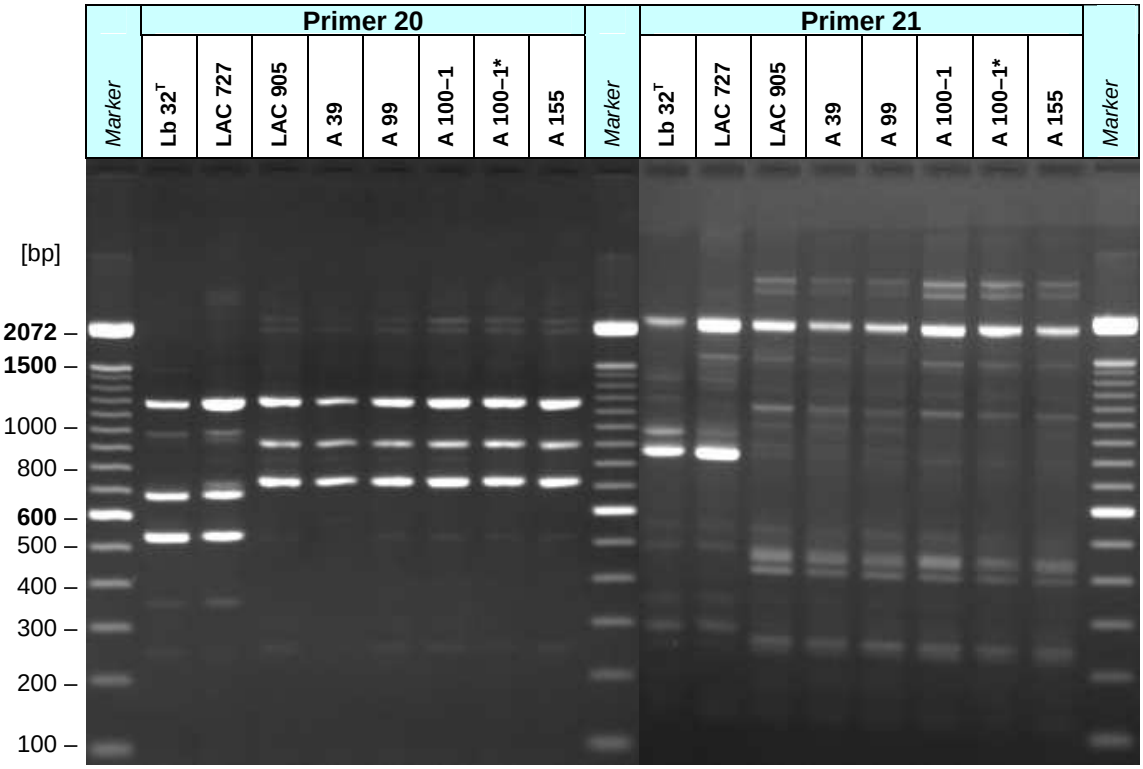


Abb. 9.1.1-8 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 20 und 21.

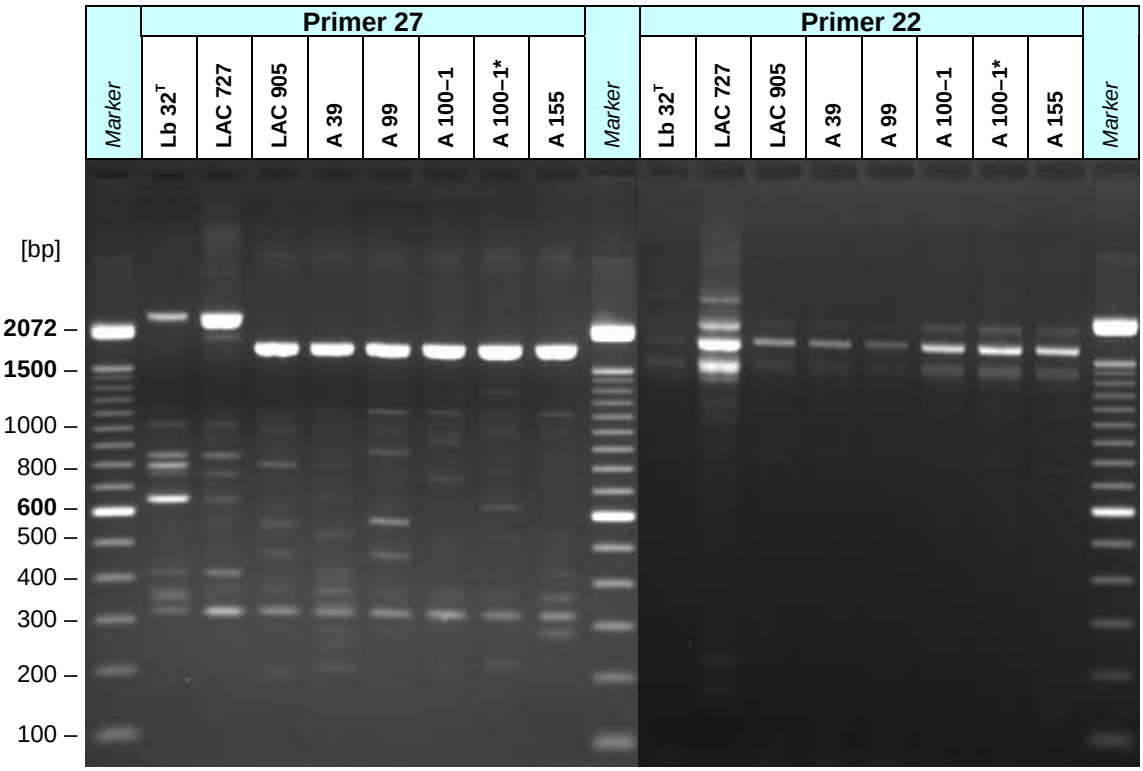


Abb. 9.1.1-9 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 27 und 22.

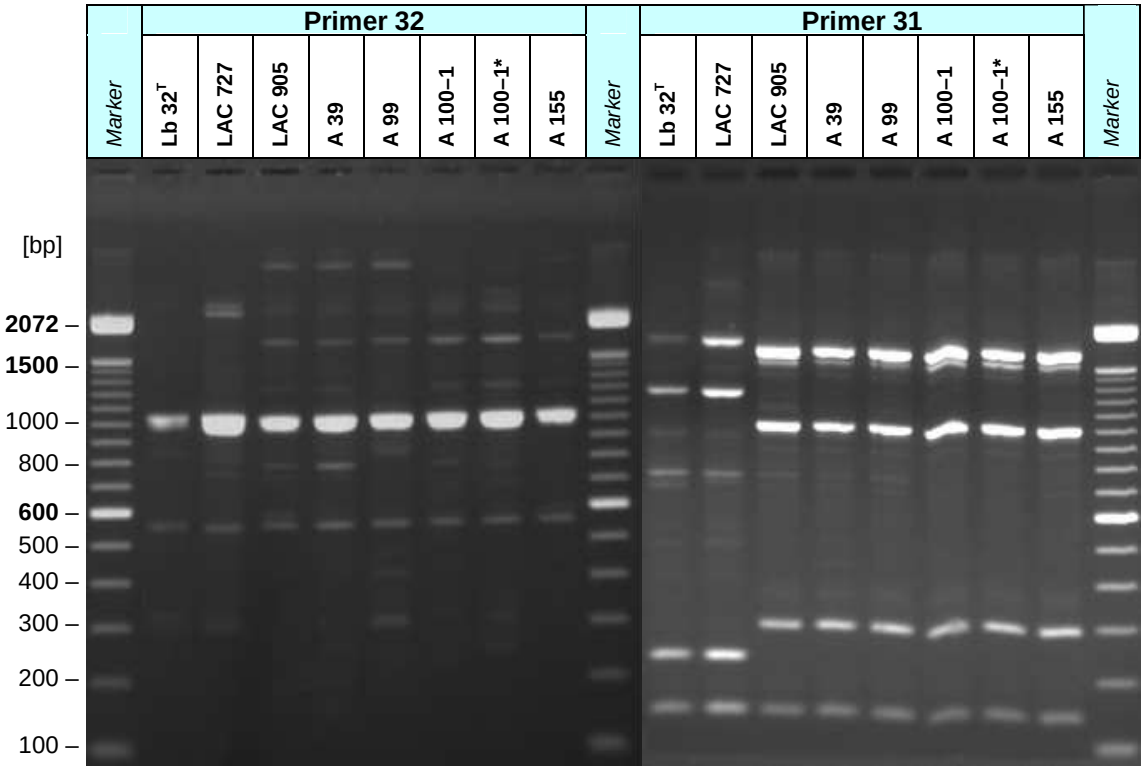


Abb. 9.1.1-10 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 32 und 31.

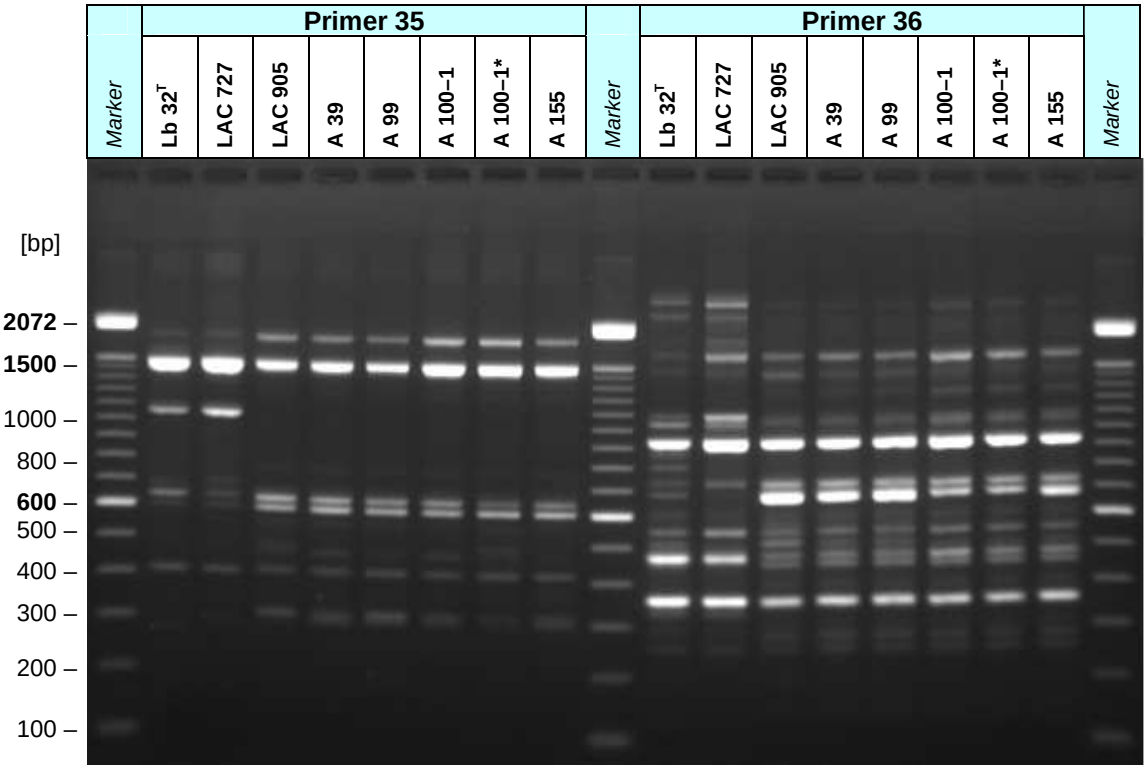


Abb. 9.1.1-11 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 35 und 36.

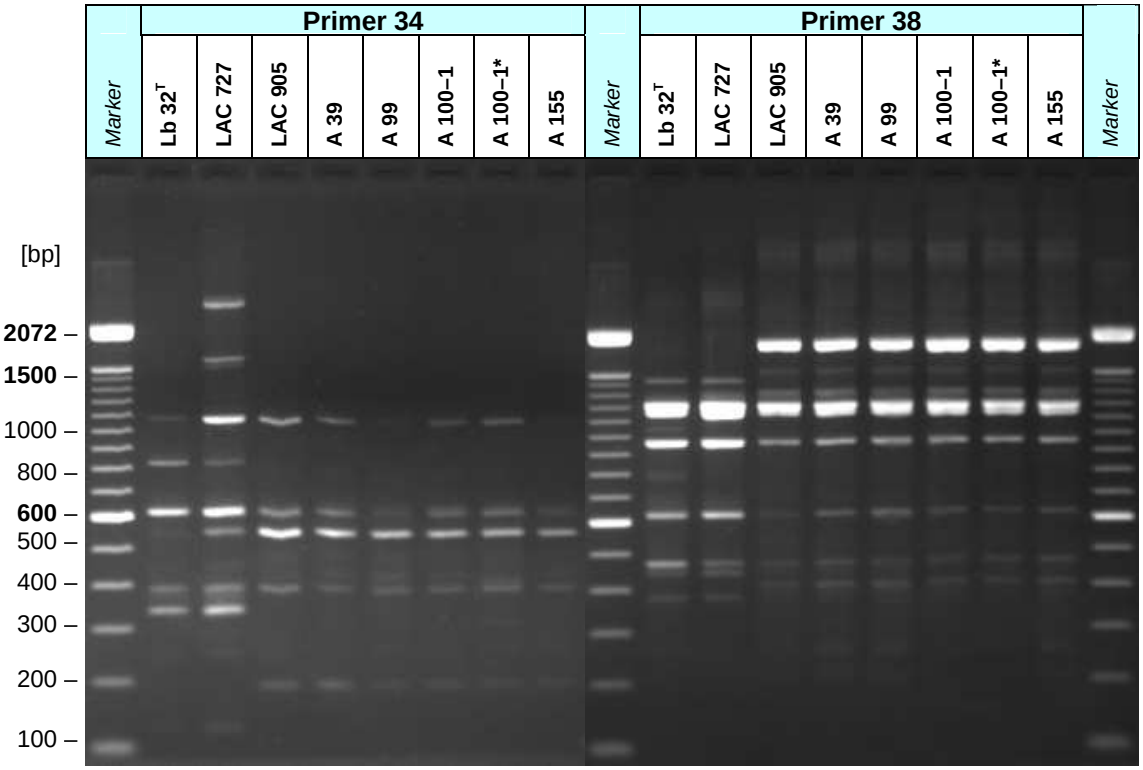


Abb. 9.1.1-12 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 34 und 38.

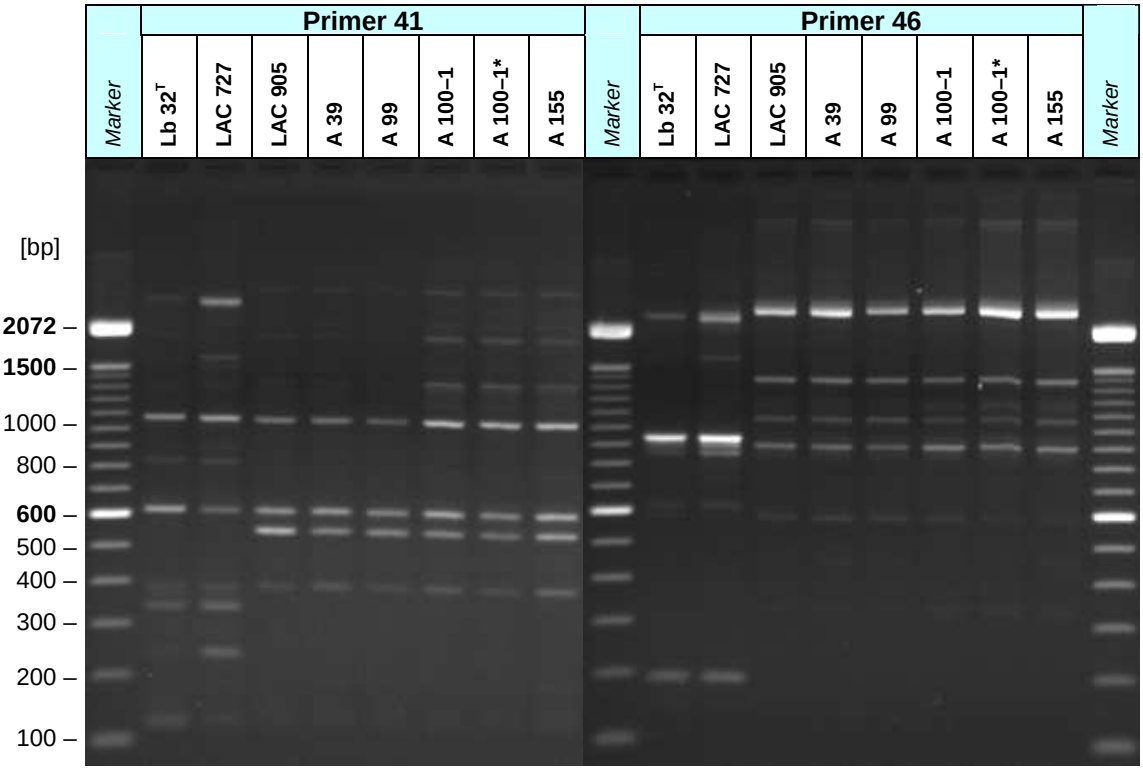


Abb. 9.1.1-13 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 41 und 46.

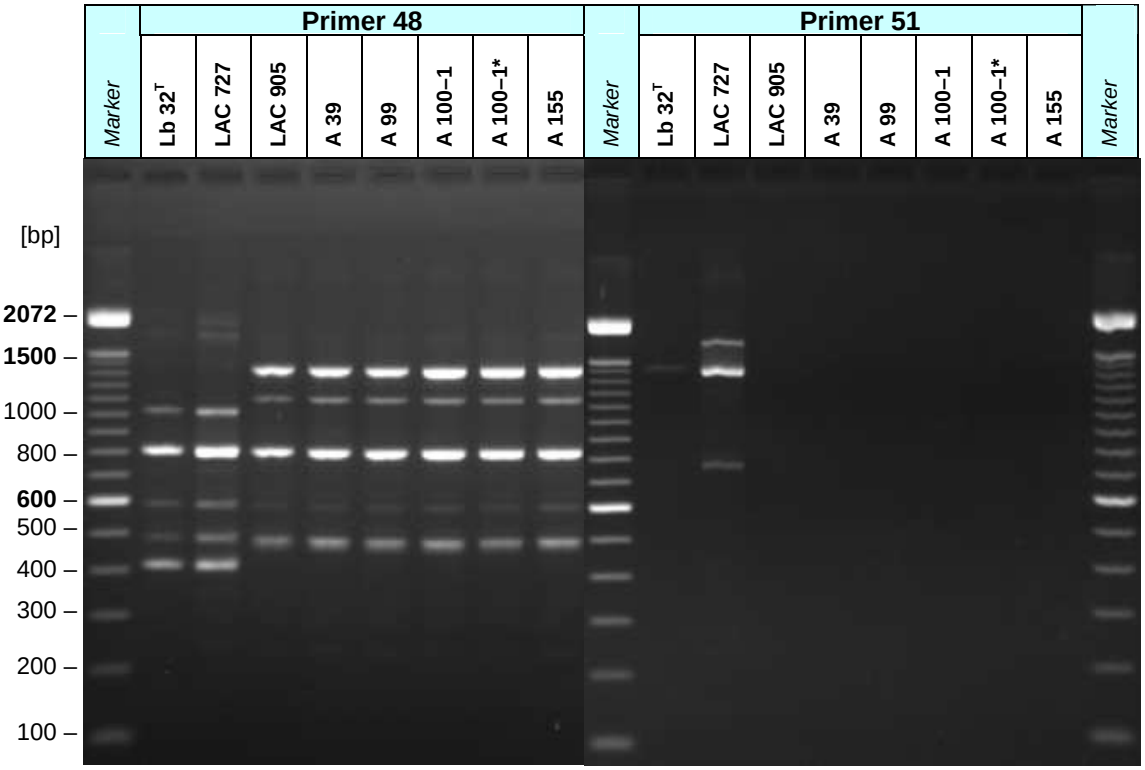


Abb. 9.1.1-14 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 48 und 51.

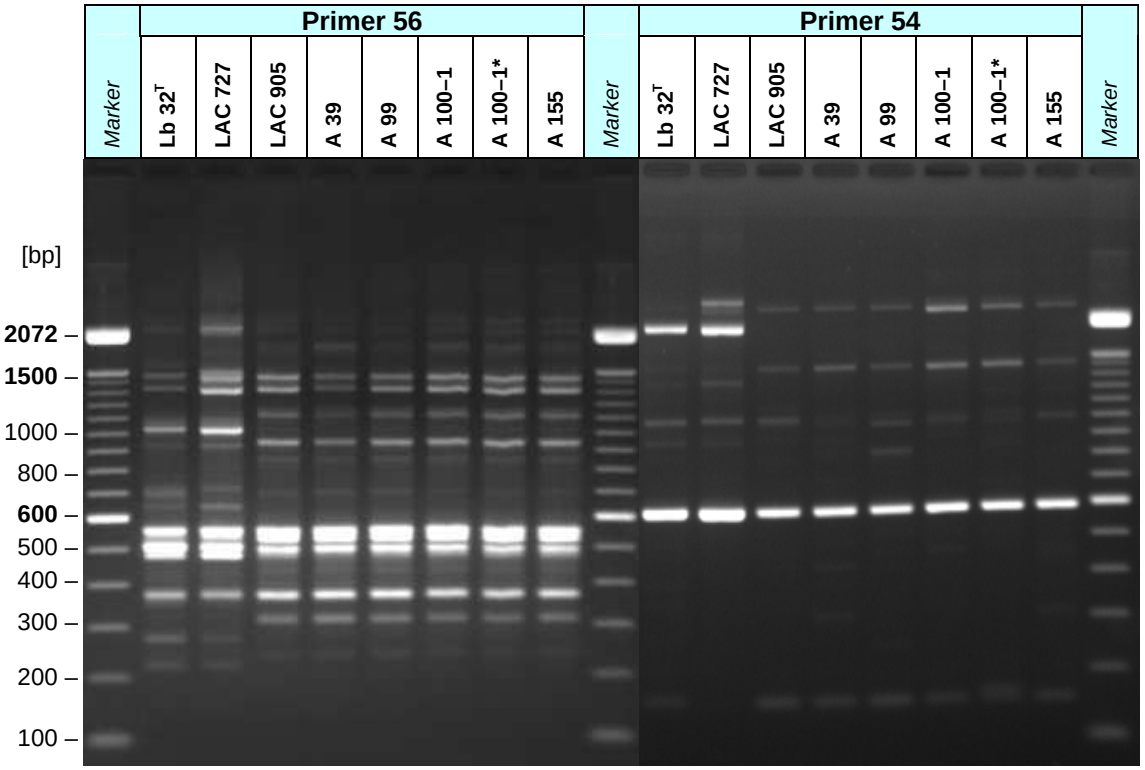


Abb. 9.1.1-15 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit den Primern 56 und 54.

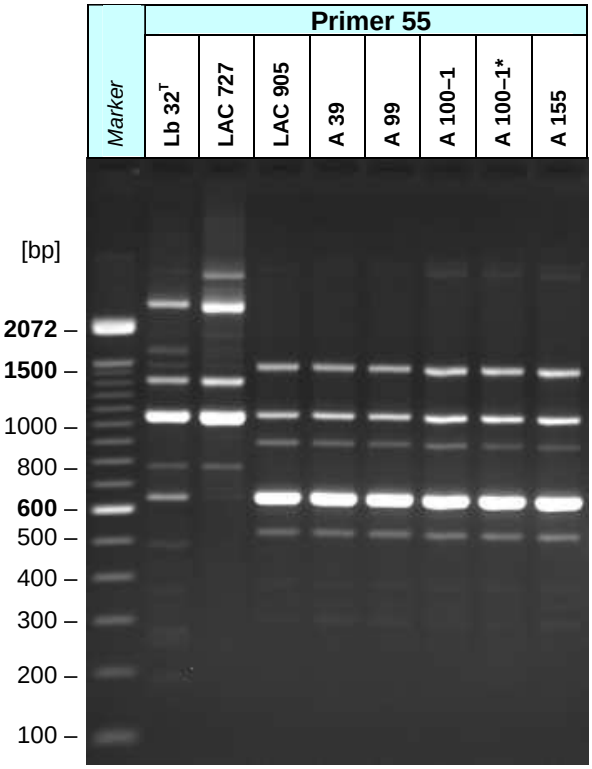


Abb. 9.1.1-16 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 55.

9.1.2 Lactobacillus buchneri – Vergleich der Versuchsreihe 1(N) mit Versuchsreihe 1(A)

Wie schon in *Kapitel 9.1.1* gehandhabt, sollen die restlichen unspezifischen Bandenmuster des Vergleichs der Versuchsreihen $1^{(N)}$ mit $1^{(A)}$ in diesem Kapitel angeführt werden. Da sich im Verlauf dieser Arbeit herausgestellt hat, dass die jeweils gleich bezeichneten Stämme beider Versuchsreihen exakt den selben DNA-Fingerprint besitzen, gelten die schon im *Kapitel 9.1.1* für die Versuchsreihe $1^{(N)}$ formulierten Aussagen analog für die Versuchsreihe $1^{(A)}$.

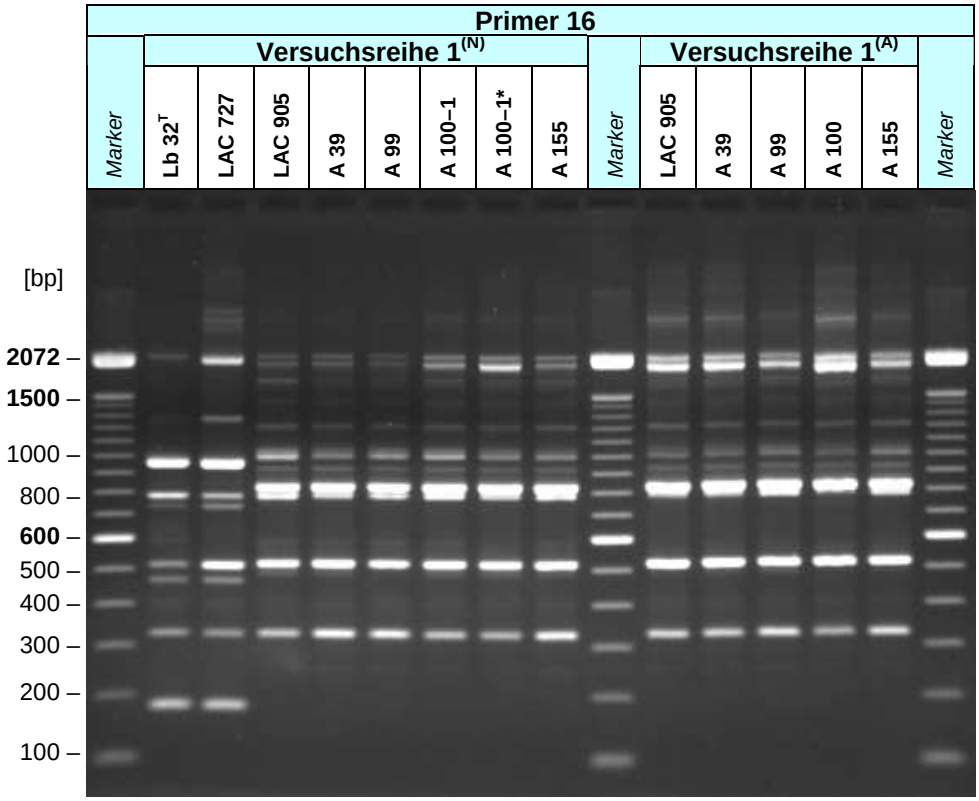


Abb. 9.1.2-1 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 16.

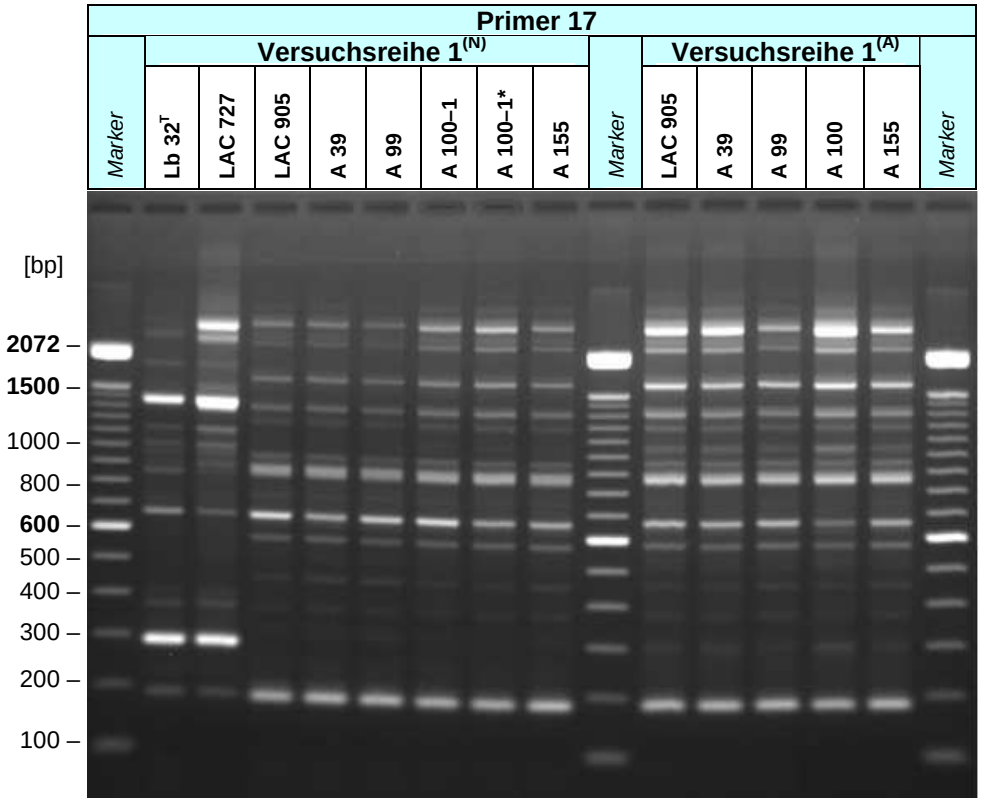


Abb. 9.1.2-2 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 17.

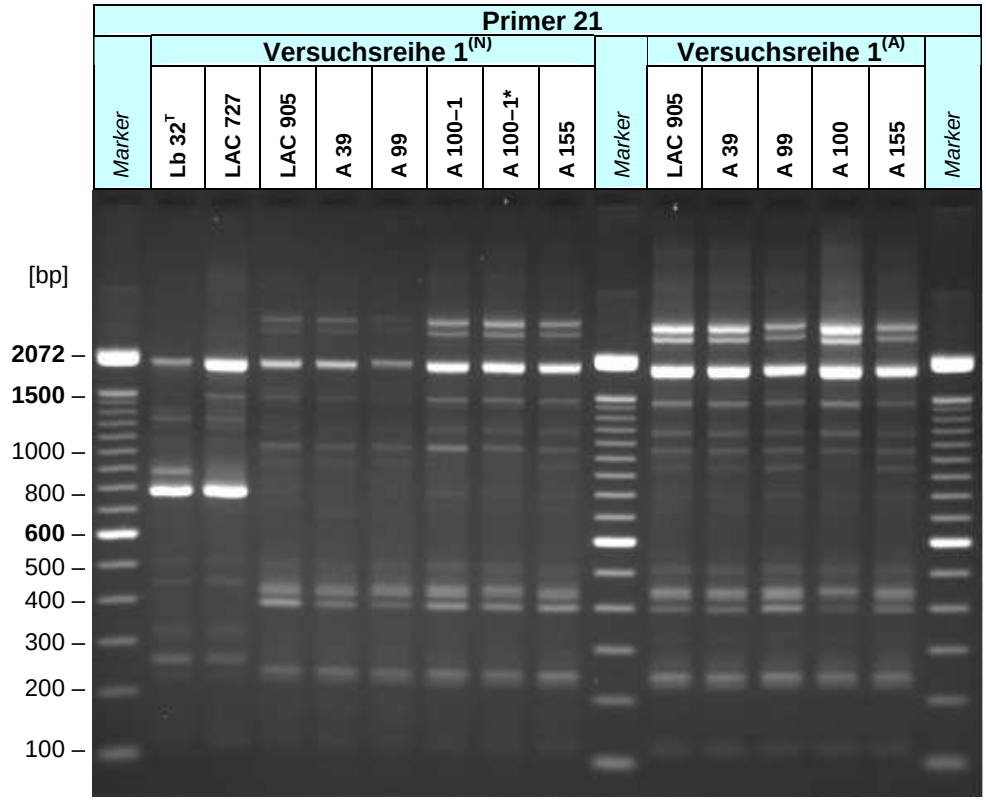


Abb. 9.1.2-3 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 21.

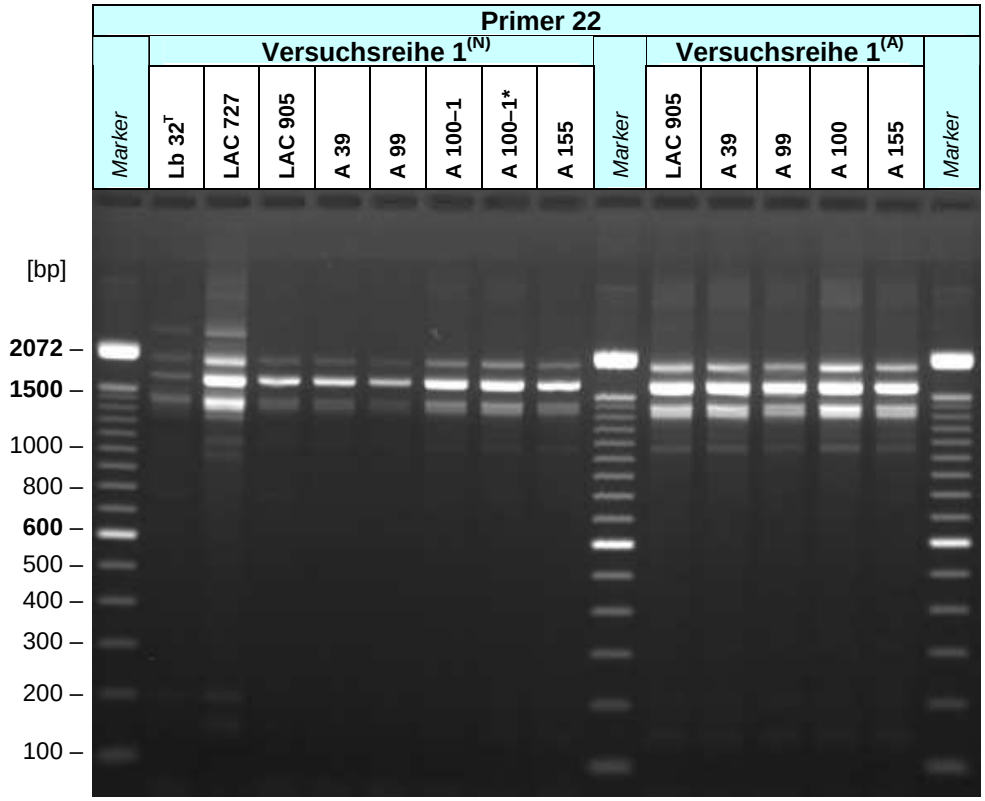


Abb. 9.1.2-4 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 22.

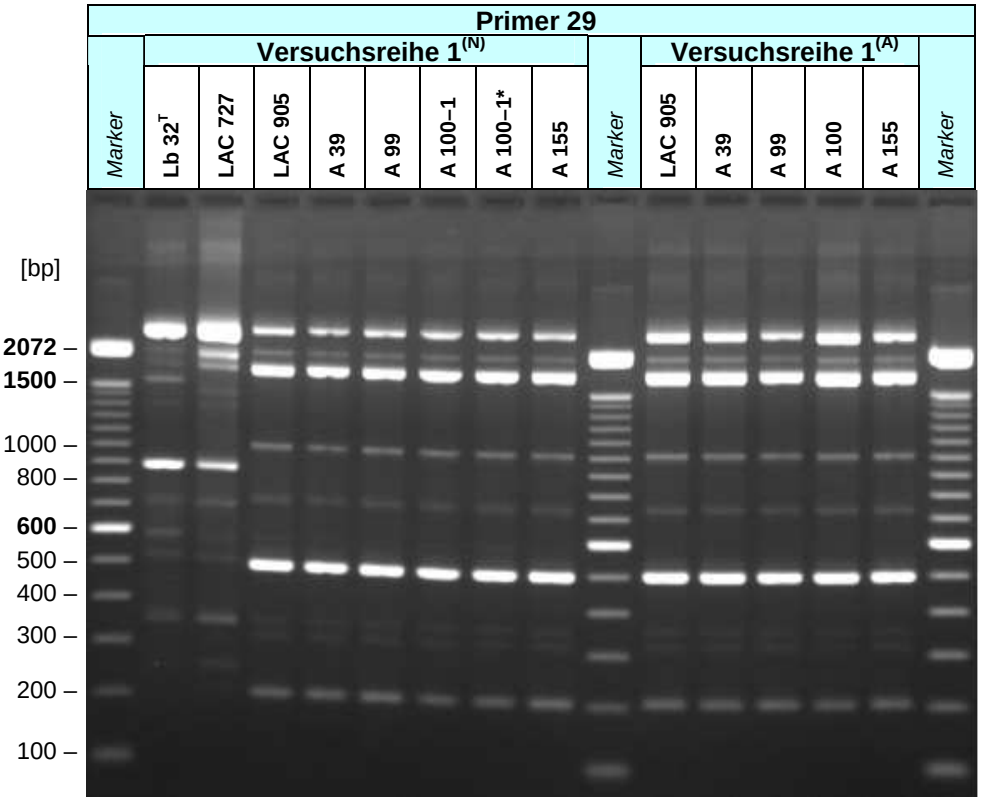


Abb. 9.1.2-5 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 29.

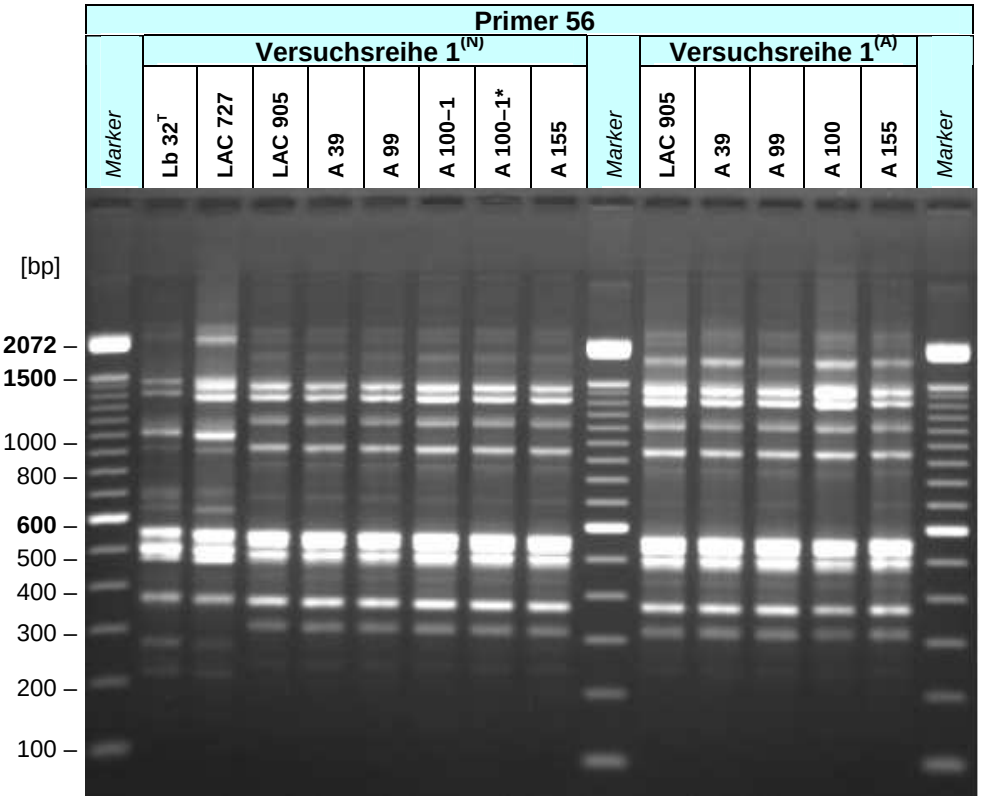


Abb. 9.1.2-6 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 56.

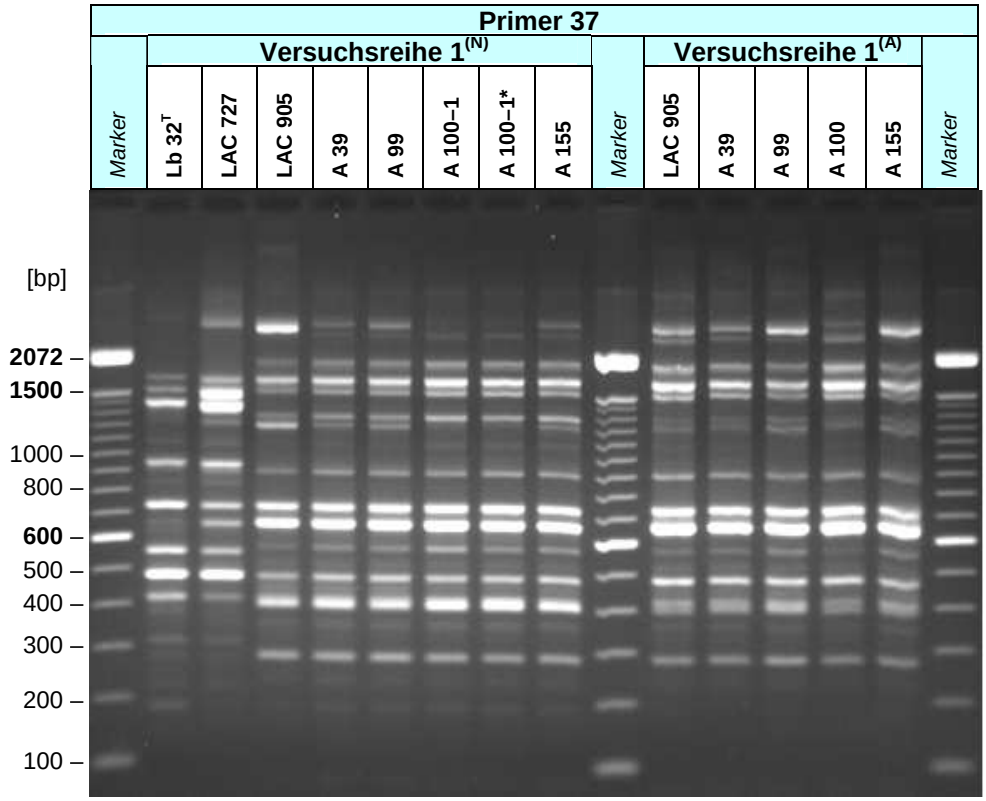


Abb. 9.1.2-7 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 37.

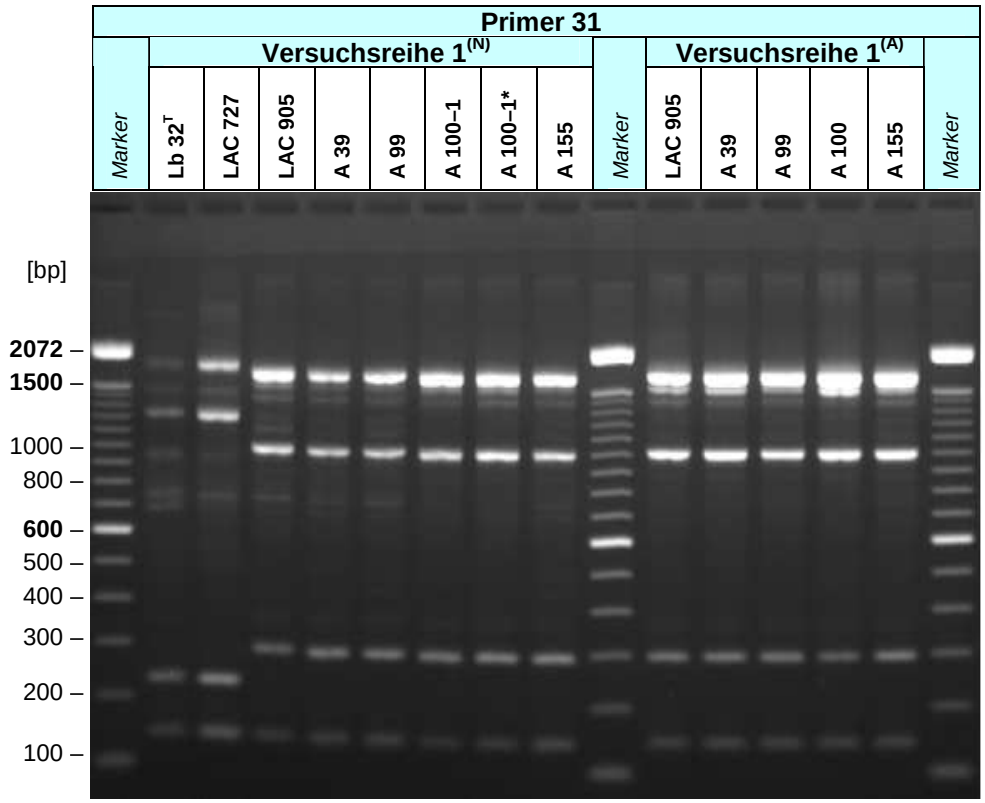


Abb. 9.1.2-8 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 31 nach erneuter DNA-Isolierung.

9.1.3 Lactobacillus sakei – Versuchsreihe 2

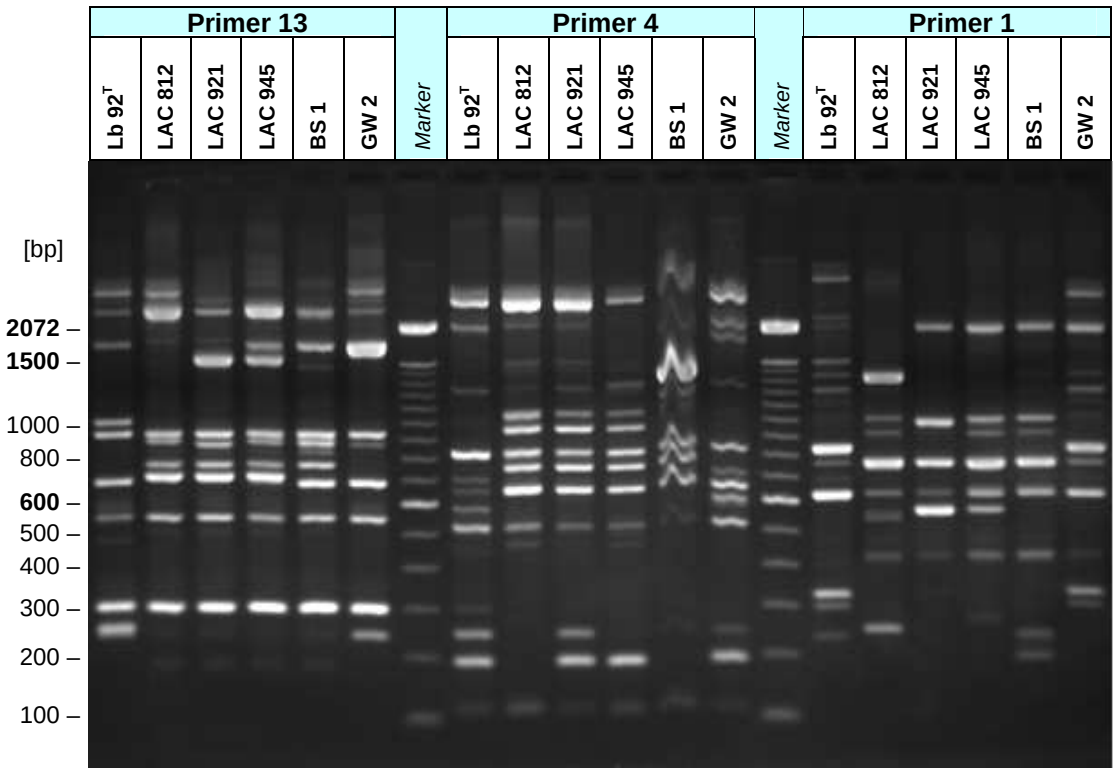


Abb. 9.1.3-1 Wiederholung der RAPD-PCR von ***Lb. sakei***-Isolaten und Typstamm mit den Primern 13, 4, 1.

9.1.4 Lactobacillus buchneri – Versuchsreihe 3

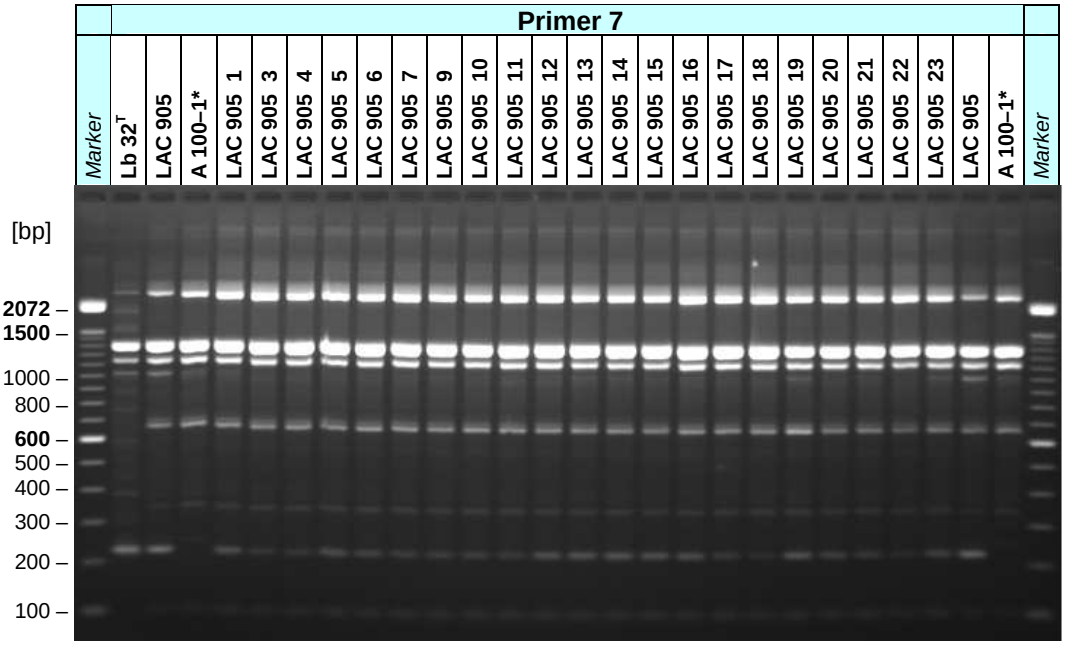


Abb. 9.1.4-1 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 7.

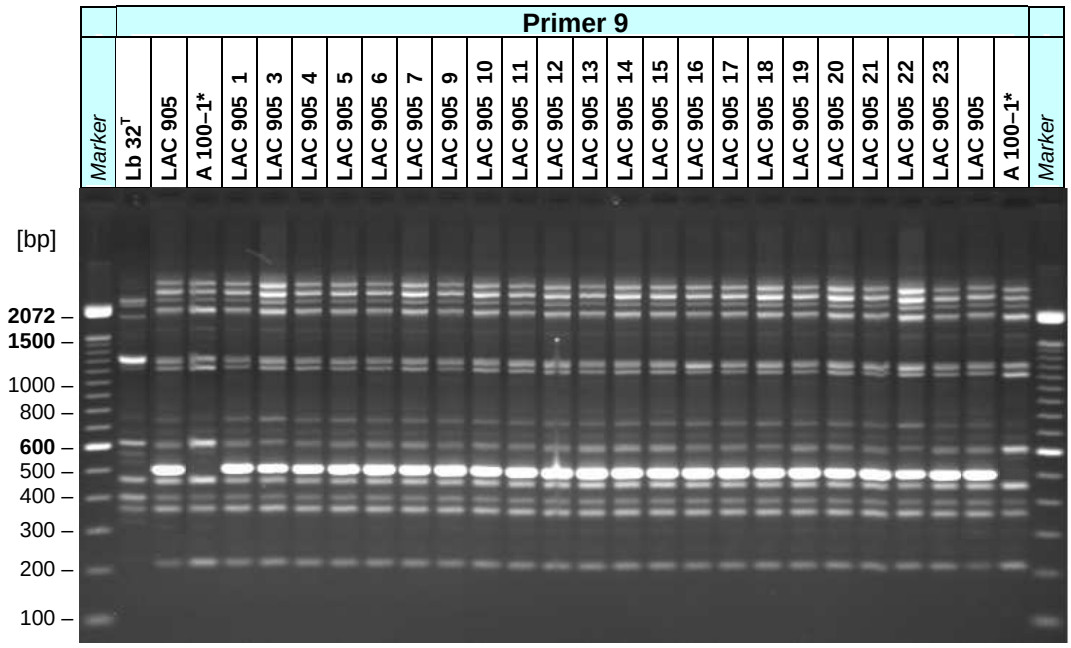


Abb. 9.1.4-2 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 9.

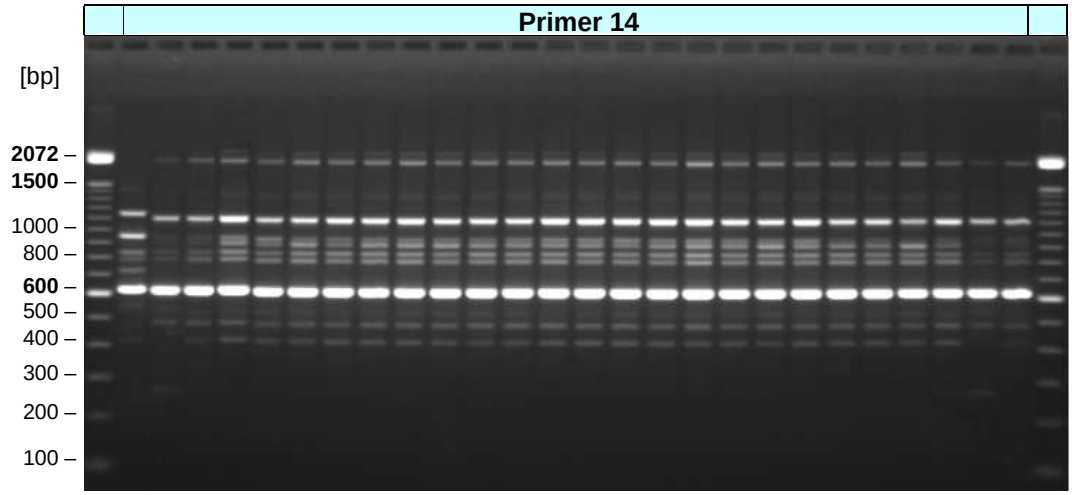


Abb. 9.1.4-3 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 14.

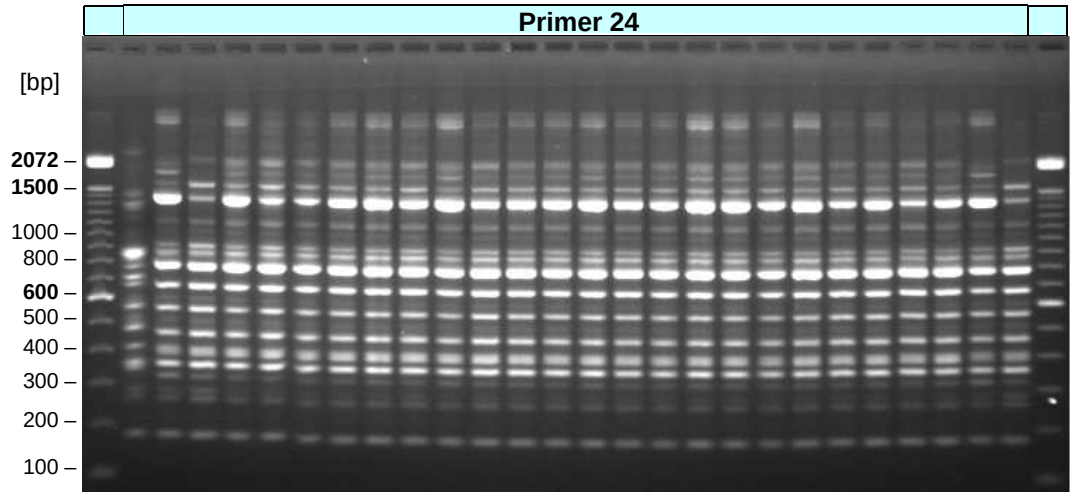


Abb. 9.1.4-4 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 24.

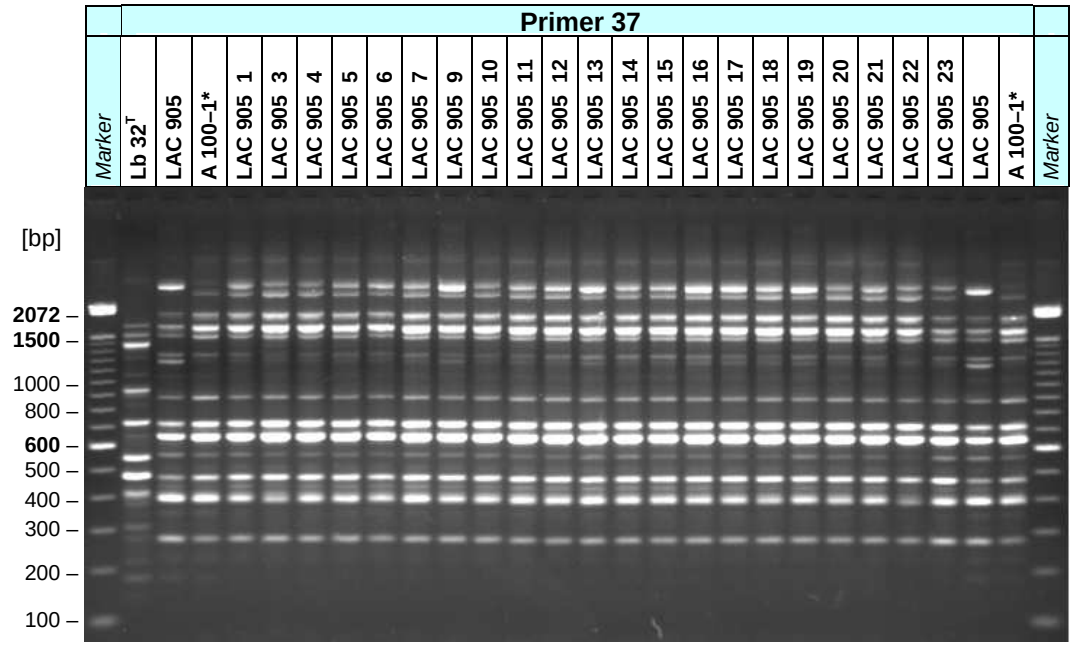


Abb. 9.1.4-5 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 37.

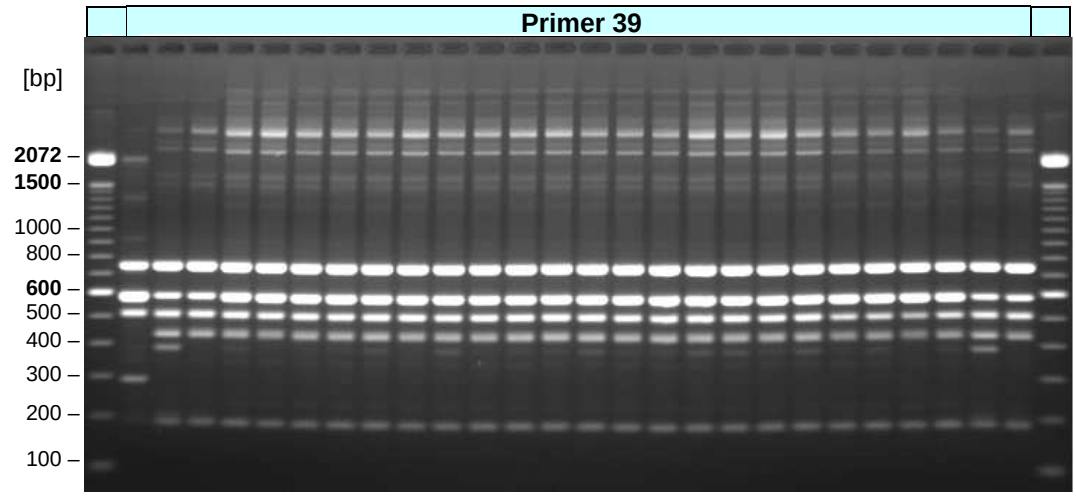


Abb. 9.1.4-6 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 39.

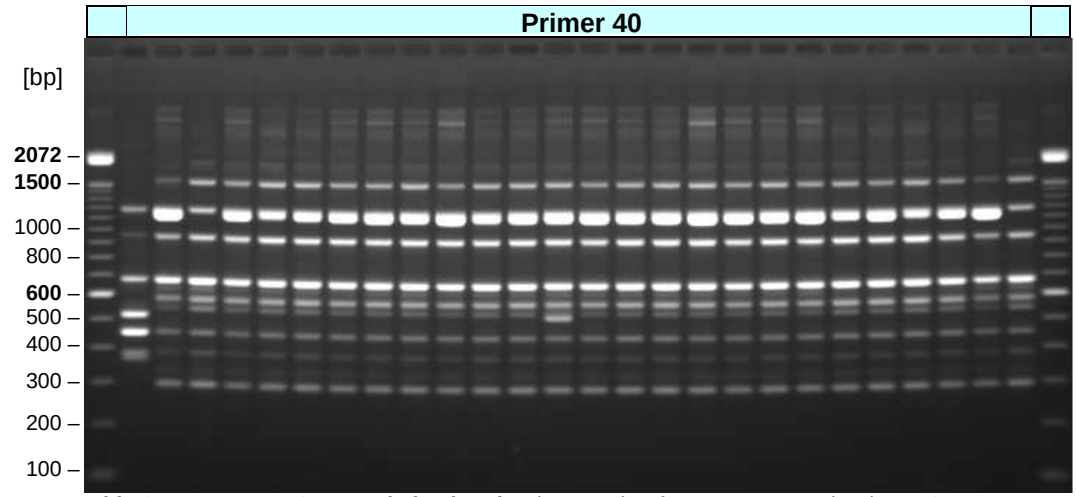


Abb. 9.1.4-7 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 40.
Bei der zusätzlich auftretenden Bande des Isolats LAC 905 12 handelt es sich um einen Artefakt.

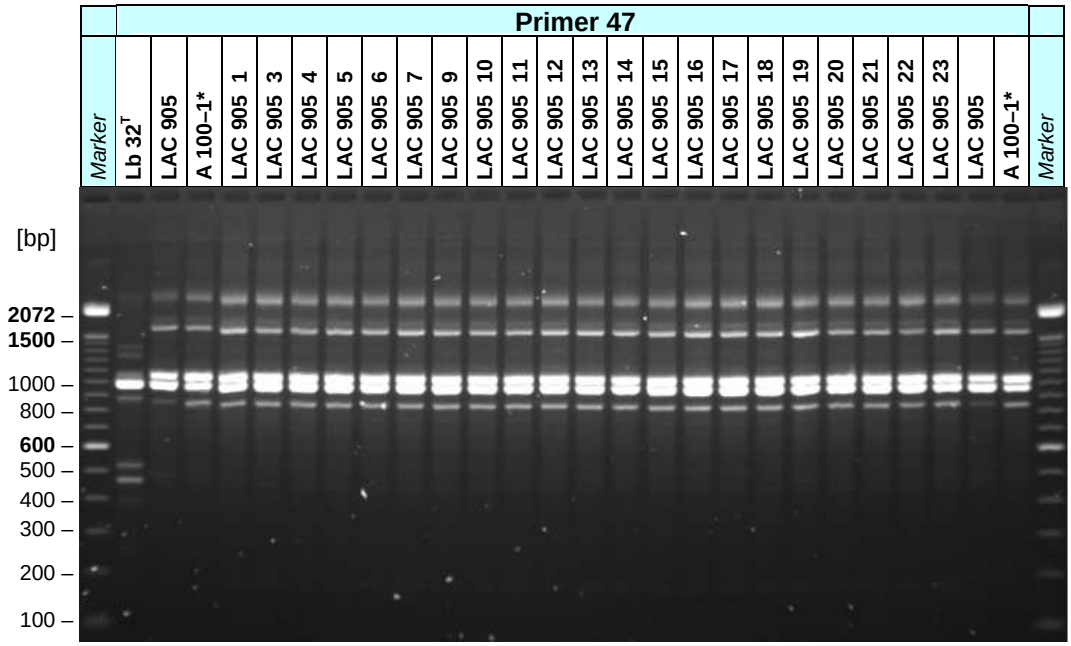


Abb. 9.1.4-8 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 47.

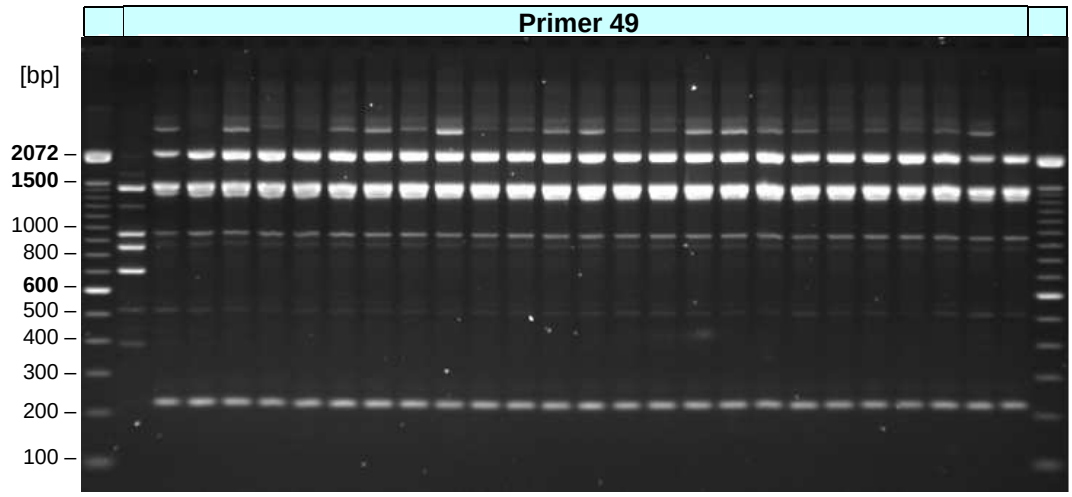


Abb. 9.1.4-9 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 49.

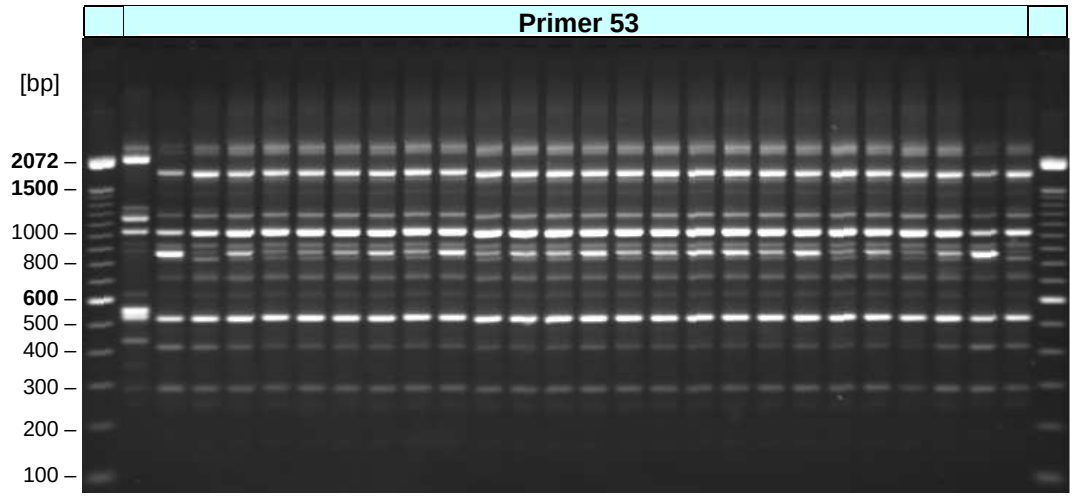


Abb. 9.1.4-10 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 53.

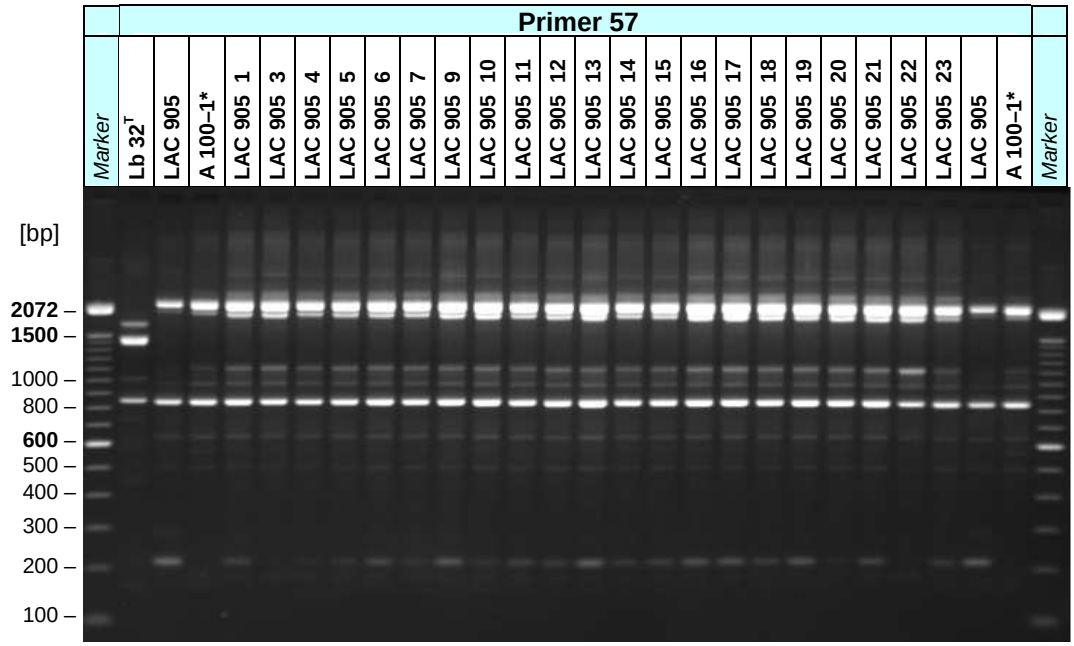


Abb. 9.1.4-11 RAPD-PCR von ***Lb. buchneri***-Isolaten und Referenzstämmen mit Primer 57.

9.2 PFGE

9.2.1 Lactobacillus buchneri – Vergleich der Versuchsreihe 1(N) mit Versuchsreihe 1(A)

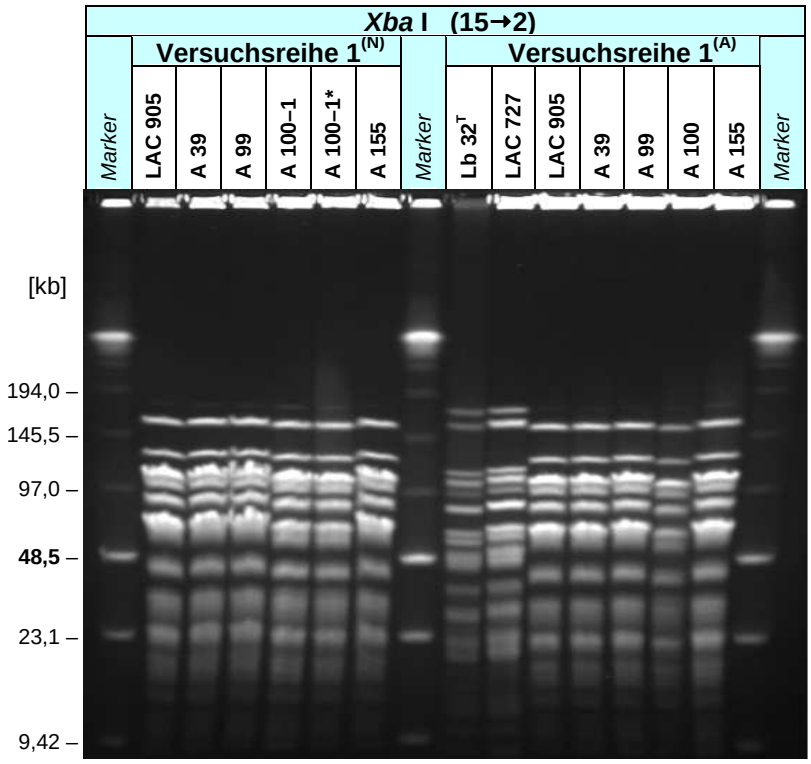


Abb. 9.2.1-1 PFGE von ***Lb. buchneri***-Stämmen nach Restriktion mit *Xba* I.

9.2.2 Lactobacillus buchneri – Versuchsreihe 3

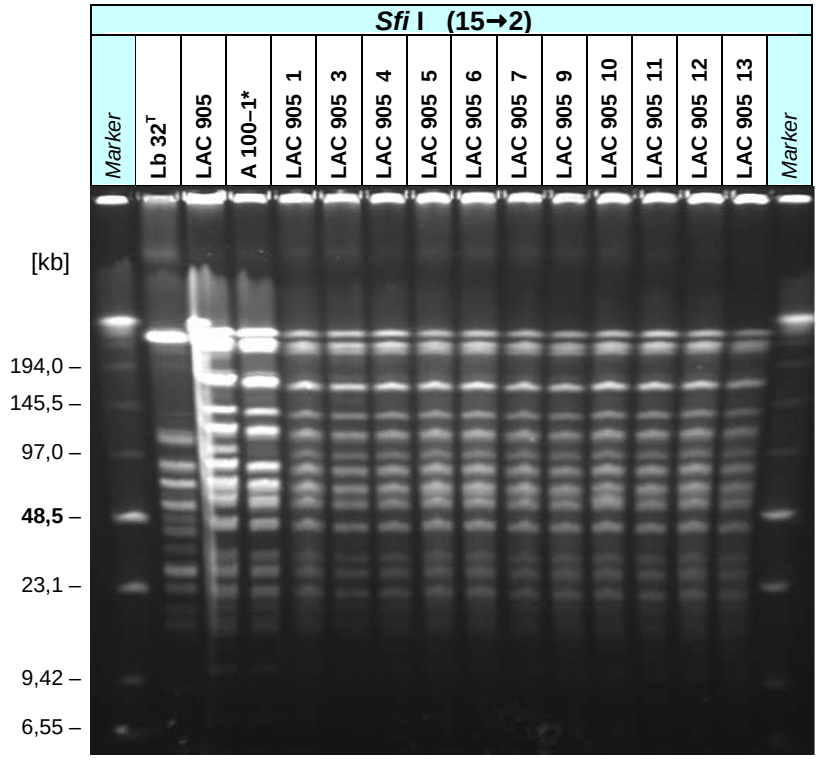


Abb. 9.2.2-1a PFGE von ***Lb. buchneri*** **LAC 905**-Isolaten nach Restriktion mit *Sfi* I.

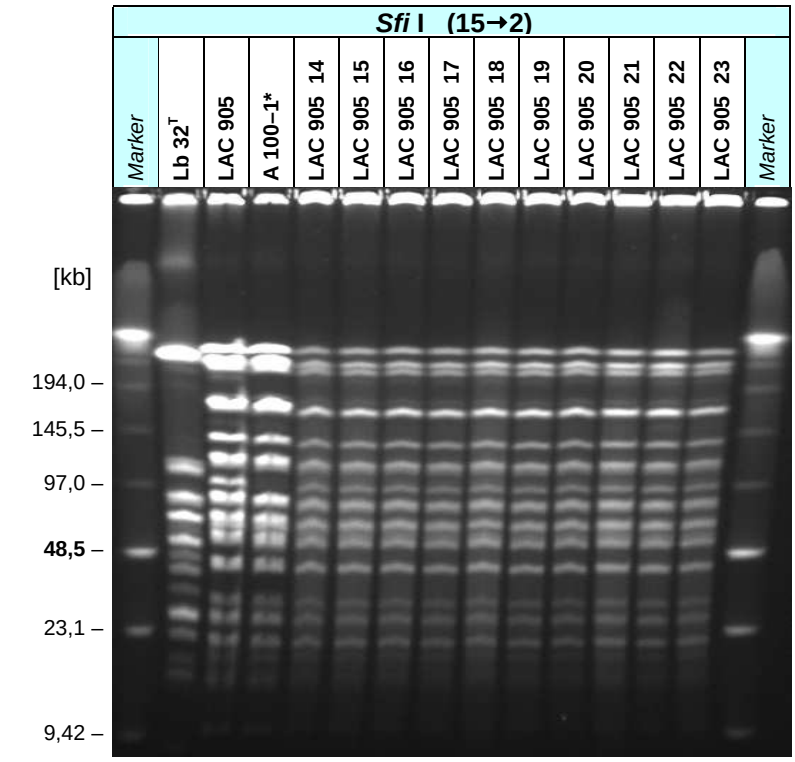


Abb. 9.2.2-1b PFGE von ***Lb. buchneri*** **LAC 905**-Isolaten nach Restriktion mit *Sfi* I.

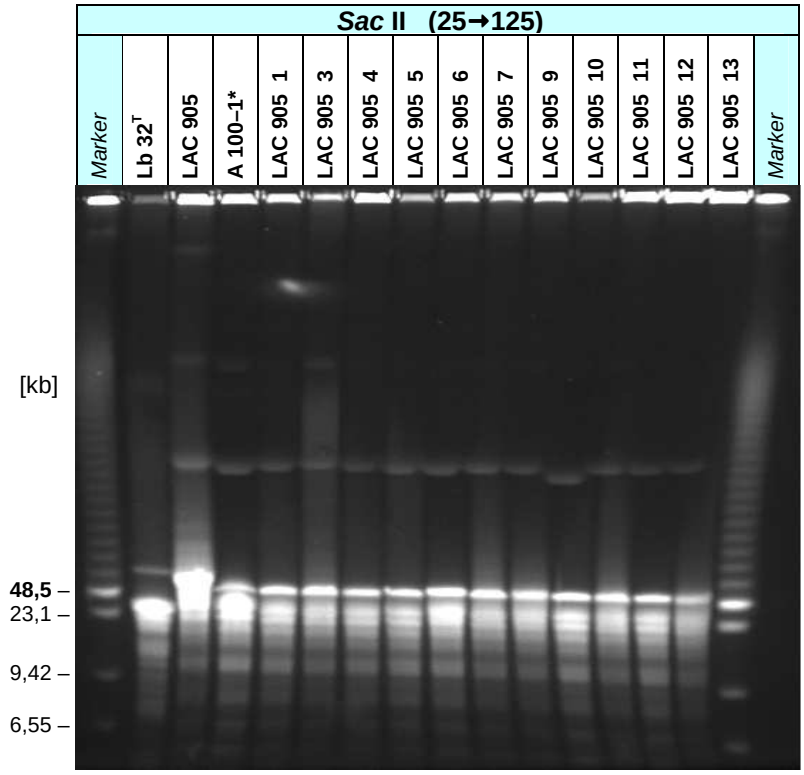


Abb. 9.2.2-2 PFGE von ***Lb. buchneri*** **LAC 905**-Isolaten nach Restriktion mit *Sac* II.

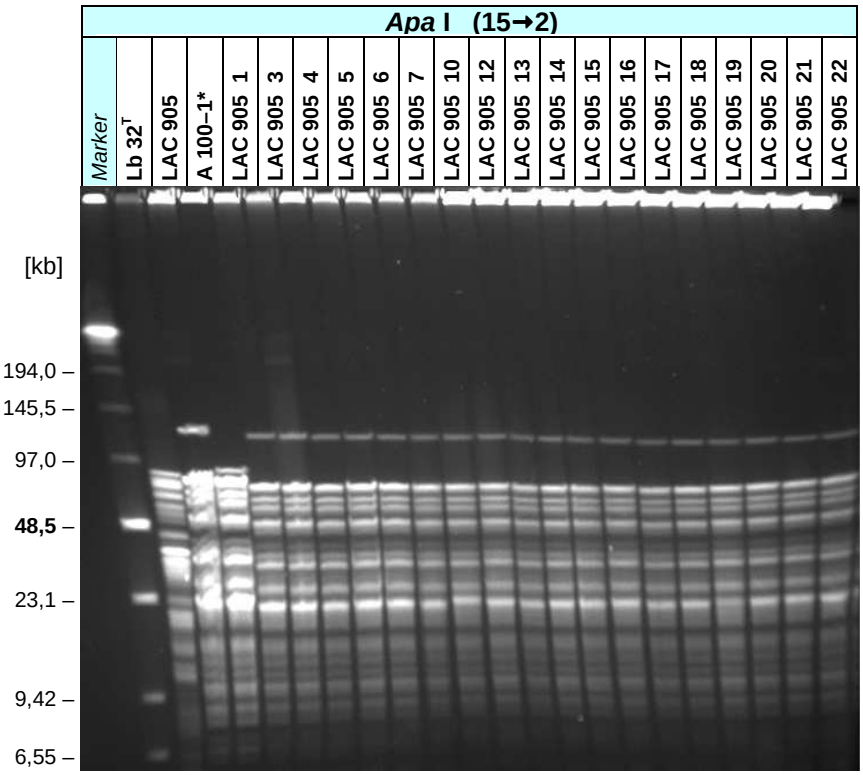


Abb. 9.2.2-3 PFGE von ***Lb. buchneri*** **LAC 905**-Isolaten nach Restriktion mit *Apa* I.

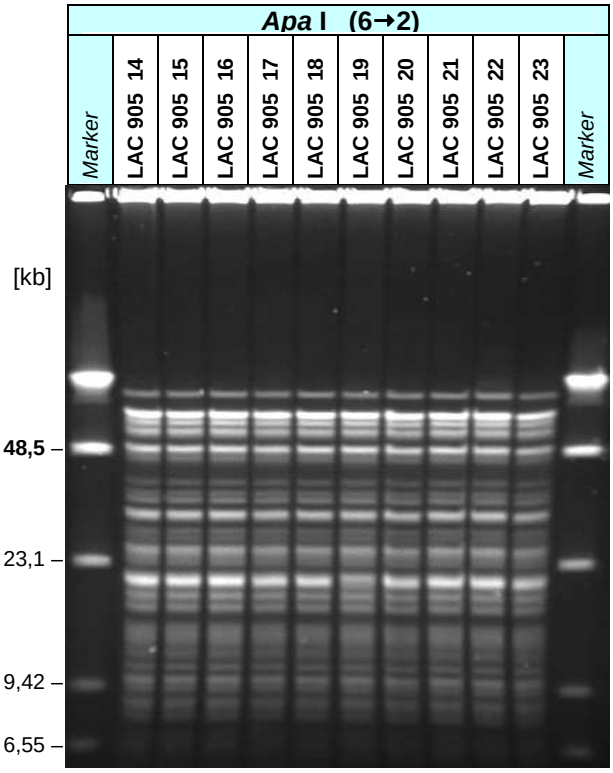


Abb. 9.2.2-4 PFGE von ***Lb. buchneri*** **LAC 905**-Isolaten nach Restriktion mit *Apa* I.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Cornelius Marcel Dürrer
Geburtsdatum	27. 02. 1978
Staatsbürgerschaft	Österreich
Familienstand	ledig
e-mail	c.duerrer@gmx.net

Ausbildung

2001 – 2010	Studium der Ernährungswissenschaften, Universität Wien, Wahlschwerpunkt: Lebensmittelproduktion und –technologie
2000 – 2001	Inskription Elektrotechnik
1999 – 2000	Zivildienst Pflegeheim Baumgarten, Wien
1992 – 1999	TGM – Fachrichtung Nachrichtentechnik – Ausbildungszweig Biomedizinische Elektrotechnik, Wien
1988 – 1992	Bundesrealgymnasium Schopenhauerstraße, Wien
1984 – 1988	Volksschule Antonigasse, Wien

Berufserfahrung - Praktika

07/2009 – 11/2009	Diplomarbeit am Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie, Abteilung Lebensmittelchemie der BOKU, Thema: *„Molekularbiologische Differenzierung und Identifizierung von Lactobacillus-Isolaten mit RAPD-PCR und PFGE"*
09/2008	4-wöchiges Praktikum bei der MA 38, Lebensmitteluntersuchungsanstalt der Stadt Wien (Tätigkeit in den Bereichen Chemie, Bakteriologie, Organoleptik)
07/2008 – 08/2008	4-wöchiges Praktikum bei der MA 39, Prüf-, Überwachungs- und Zertifizierungsstelle der Stadt Wien im Mikrobiologielabor des IFUM - Labors für Umweltmedizin (Tätigkeit in den Bereichen Zellkultur, Molekularbiologie und Wasserbakteriologie)

04/2008	2-wöchiges Praktikum am Department für Ernährungswissenschaften (Aufbereitung von Lebensmittelproben im Rahmen eines Industrieprojekts)
09/2007 – 10/2007	5-wöchiges Praktikum am Department für Ernährungswissenschaften (Aufbereitung von Lebensmittelproben im Rahmen eines Industrieprojekts und graphische Darstellung der Analyseresultate, Literaturrecherchen, Auswertung von Ernährungsprotokollen mit der Ernährungssoftware DGE-PC professional)
07/2006	4-wöchiges Praktikum im Ernährungsmedizinischen Dienst der Krankenanstalt Rudolfstiftung (Ausarbeitung und Gestaltung von Broschüren, Mitarbeit in der Milchküche und bei den vorbereitenden Maßnahmen zur Bandkontrolle, Stationsbesuche)
01/2006 – 02/2006	4-wöchiges Praktikum bei der Arbeitsgemeinschaft für klinische Ernährung im Rahmen des Projekts „NutritionDay in European Hospitals" (Oganisation des Projekttagesablaufs im AKH der Abteilung für Strahlentherapie, Datenerhebung und -eingabe)

Studienbegleitende Tätigkeiten

seit 01/2007	Eventservice, Mitarbeit bei Veranstaltungen, Gästebetreuung
09/2004 – 06/2007	Ärzte ohne Grenzen, Bereich Spendenbetreuung
2005/ 2006/ 2007	MA 48, Ferialarbeiter
07/2004 – 08/2004	Österreichische Post AG, Postzusteller
2003/ 2004	European Congress of Radiology, Auf- und Abbauarbeiten
02/2002 – 10/2002	Eventservice, Mitarbeit bei Veranstaltungen, Gästebetreuung

Wien, am _____ _____

Cornelius Dürrer