

Nachweis von Bifidobakterien in Faeces von Kleinkindern mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese

von G. Engel, N. Rösch, und K.J. Heller

Institut für Mikrobiologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel,
Standort Kiel, Postfach 6069, 24121 Kiel

1. Einleitung

Zur Zeit sind etwas mehr als 30 verschiedene Arten der Gattung *Bifidobacterium* (*B.*) beschrieben, von denen ca. 10 überwiegend aus dem menschlichen Darm isoliert wurden (1). Dabei handelt es sich um die Spezies *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. gallicum*, *B. infantis*, *B. longum* und *B. pseudocatenulatum* (2, 3), wobei die *B. catenulatum*-Gruppe, gefolgt von *B. longum* und *B. adolescentis*, am häufigsten im Darm Erwachsener auftrat, während *B. breve*, *B. infantis* und *B. longum* überwiegend im Intestinaltrakt von Kleinkindern nachgewiesen werden konnten (4).

Eine quantitative Bestimmung von Bifidobakterien in Faecesproben erweist sich als schwierig, weil wegen der Vielfalt der dort vorkommenden Keime eine befriedigende Selektierung aller Bifidobakterienarten mit einem Nährmedium problematisch zu sein scheint. Einerseits sollte die im Stuhl vorkommende Begleitflora ausreichend gehemmt werden, andererseits sollten möglichst viele auch gestresste Bifidobakterien noch wachsen können. Hartemink u. Rombouts (5) verglichen verschiedene Medien und wiesen nach, dass in Human-Faeces mit RB- und Beerens-Medien zwar annähernd gleiche Bifido-Konzentrationen ermittelt wurden, dass aber diese Medien nicht für Faeces anderer Warmblüter und somit nicht für alle Bifidobakterienarten geeignet waren. Engel (6) stellte fest, dass mit einem von Arroyo et al. (7) entwickelten Nährboden (AMC-Agar), dem noch Tween 80 zugegeben wurde (AMCTw-Agar), fast alle untersuchten Bifidobakterienarten nachzuweisen waren. Schwierigkeiten machte die Erfassung gestresster Bifidobakterien. Eine Entfernung von Hemmstoffen aus AMC-Agar, wie dies von Engel (8) zum Nachweis auch von gestressten Bifidobakterien aus probiotischen Milchprodukten auf RCMATwTPL erfolgreich durchgeführt wurde, dürfte wegen der Vielfalt und der Resistenz der Keime in Faeces zu unerwünschtem Wachstum der Begleitflora führen. Auch weil AMCTw-Agar relativ leicht herstellbar war, wurde dieser Nährboden zum quantitativen Nachweis von Bifidobakterien in Faeces verwendet.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, festzustellen: i) ob und wie viele Bifidobakterien in Stuhl von Kleinkindern vorkommen und ii) wie groß die Biodiversität der Bifidobakterienflora ist.

2. Material und Methoden

2.1 Herkunft der Stämme

2.1.1 Reinkulturen

Die zur Untersuchung verwendeten 36 Bifidobakterien-Stämme, die von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, bezogen wurden, sind mit DSM bezeichnet und repräsentieren 15 verschiedene Arten der Gattung *Bifidobacterium*. Die Bakterien-Stämme bzw. Isolate wurden bei -80 °C gelagert, als Lagermedium dient das CRYOBANK™ System der Fa. Mast Diagnostica.

2.1.2 Isolate aus Faeces

Von Kleinkindern im Alter zwischen 1-6 Jahren aus dem Gebiet der Bundesrepublik Deutschland wurden einmal, meistens dreimal in zeitlichen Abständen von bis zu 4 Wochen Stuhlproben erhalten und daraus Bifidobakterien isoliert. Die Bifidoisolate wurden bei -80 °C wie die Reinkulturenstämme gelagert.

2.2 Methoden der Keimzahlbestimmung, Isolierung, Kultivierung und Pulsfeld-Gel-Elektrophorese

2.2.1 Isolierung und Keimzahlbestimmung

Die Stuhlproben wurden nach Entnahme in Plastikbeutel (Anaerocult) gefüllt, welche nach Luftentleerung verschlossen und ohne Kühlung per Post versandt wurden. Die Proben waren höchstens 2 Tage unterwegs, bevor sie analysiert wurden. Hierzu wurden nach Durchmischung 1 g der Stuhlprobe mit 99 ml Ringerlösung verdünnt. Von dieser ersten Anschüttelung wurde weiter jeweils 1 : 10 verdünnt (10^{-3} - 10^{-7}) und 0,1 ml dieser Verdünnungen auf die mit Nährboden beschickten und vorgetrockneten Petrischalen aufgespatelt. Als Nährboden diente AMCTw-Agar, bebrütet wurde 5 Tage, bei fehlendem Wachstum 7 Tage bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen. Vertreter der Gattung Bifidobakterien weisen 2-3 mm gleichmäßig große weiße, mit rötlichem Zentrum oder völlig rote Kolonien auf. Bei weiterer Bebrütung können gestresste Keime rote Kolonien mit einem Durchmesser von 1 mm bilden. 5 Kolonien gleicher Morphologie wurden mikroskopisch untersucht. Zellen von Bifidobakterien haben eine Länge von 1,5-8 µm, einen Durchmesser von 0,5 -1,3 µm und sind polymorphe Stäbchen (gekrümmt, keulenförmig, Y-förmig, verzweigt, kokkoid).

Nach der mikroskopischen Identifizierung der Bifidobakterien wurde deren Keimzahl ermittelt.

Danach wurden von den Kolonien mit jeweils gleicher Morphologie und Farbe Isolate gewonnen, in TPY bei 37 °C bis zum Auftreten einer Trübung anaerob bebrütet und anschließend bei -80 °C (siehe 2.1.1) gelagert.

2.2.2 Präparation und Verdau der bakteriellen DNA (9-11)

Aus den Cryoröhrchen wurden ein bis zwei Kügelchen in ca. 5 ml TPY-Nährmedium überführt und bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen bebrütet. Damit die Kulturen aktiv und frisch waren, wurden Subkulturen angelegt und bis zu einer optischen Dichte von 1,0 inkubiert. Anschließend wurde die gesamte Zellsuspension in 2,0 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und 10 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Die Pellets wurden 2 mal mit 0,05 M EDTA (pH 8,5) gewaschen und bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Zur Herstellung der Inserts für die PFGE wurden die Pellets in 100 µl 0,05 M EDTA (pH 8,5) resuspendiert. 75 µl von dieser Zellsuspension wurden mit 500 µl noch flüssiger 50 °C warmer Agarose (1 % low-melt Agarose, BioRad, in 0,05 M EDTA) vermischt und auf zwei Insert-Tröge verteilt. Zur Polymerisierung der Inserts wurde der Gießstand 10 min lang bei -20 °C gekühlt.

Für den nachfolgenden Verdau wurden 1,5 ml LysozymbLösung in 2 ml Eppendorf ReaktionsgefäÙe überführt und die fertigen Inserts darin 24 h bei 37 °C verdaut. Anschließend wurden die Inserts in Proteinase-K Lösung überführt und mindestens 24 h bei 50 °C inkubiert. Die so behandelten Inserts können nach ausgiebigem Waschen mit EDTA einige Wochen bei 4 °C in EDTA aufbewahrt werden.

Zum Verdau der DNA wurden die Inserts in Streifen von 10 x 3 mm geschnitten, mit Restriktions-Puffer (ohne Enzym) bei 4 °C equilibriert und anschließend ca. 18 h mit den entsprechenden Restriktionsendonucleasen bei 37 °C inkubiert.

2.2.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

1,1 % ige Pulsedfield-Agarose (BioRad) Gele wurden mit der verdauten DNA in den Inserts beschickt. Anschließend wurde die DNA in der PFGE-Kammer elektrophoretisch aufgetrennt. Als PFGE-Kammer diente Bio Rad CHEF DR II. Folgende Parameter (Switch Time Gradient) wurden eingestellt: Initial A Time = 2,0 sec, Final A Time = 30 sec, Laufzeit 24 h, Spannung 175 V. Der Puffer wurde auf 14 °C gekühlt.

Die Gele wurden anschließend 30 min mit 0,5 mg/l Ethidiumbromid gefärbt, 30 min in entmineralisiertem Wasser gespült und danach unter UV-Licht fotografiert.

Molekulargewichtsstandards wurden bei jeder Elektrophorese mitgeführt. Hierzu wurde Low Range Marker BioLabs No 350 S verwendet.

2.3 Nährböden und Lösungen

2.3.1 Nährmedien

TPY- Nährmedium (12)

Trypticase (BBL)	10,0 g
Phytone (BBL)	5,0 g
Glucose	15,0 g
Hefeextract (Difco)	2,5 g
Tween 80	1 ml
Cystein Hydrochlorid	0,5 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,5 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,25 g
CaCl ₂	0,15 g
FeCl ₃	Spuren
Wasser	1000 ml

In dem entmineralisierten Wasser durch Erhitzen lösen, portioniert a 7 ml abfüllen, 15 min autoklavieren bei 121 °C, pH = 6,5 ± 0,2.

RCM (Reinforced-Clostridial-Medium: Fertignährboden (Difco, 218081))

Pankreatisch abgebautes Casein	5,0 g
Proteose-Pepton Nr. 3	5,0 g
Rinderextrakt	10,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
D(+)-Glucose	5,0 g
lösliche Stärke	1,0 g
NaCl	5,0 g
Na-acetat	3,0 g
L-Cysteinhydrochlorid	0,5 g
Agar	0,5 g
Wasser	1000 ml

AMC-Agar (7)

RCM (Difco)	38,0 g
Agar-Agar	15,0 g
Na-propionat	3,0 g
Li-chlorid	2,0 g
Wasser	1000 ml

In dem entmineralisiertem Wasser durch Erhitzen lösen, portioniert zu je 100 ml abfüllen, 15 min bei 121 °C autoklavieren, pH = 6,8 ± 0,2.

Vor Gebrauch Zugabe von je 1 ml steril filtrierter Lösungen A und B zu je 100 ml flüssigem, 50 °C warmem, autoklaviertem Nährboden.

Lösung A:

Polymyxin B-sulfat	0,085 g
Kanamycinsulfat	0,5 g
Jodacetat	0,125 g
2,3,5 Triphenyltetrazoliumchlorid	0,25 g

In 100 ml H₂O bidest. lösen, steril filtrieren und in 5 ml portionieren und einfrieren.

Lösung B:

Nalidixinsäure	0,2 g
----------------	-------

In 100 ml H₂O bidest. lösen, nachdem mit NaOH (ca. 1 ml 1 N) alkalisiert wurde, steril filtrieren portionieren und einfrieren.

AMCTw-Agar

Vor dem Autoklavieren werden zu dem AMC-Agar 1 ml Tween 80 zugegeben. Vor Gebrauch werden wie beim AMC-Agar die Lösungen A und B mit dem flüssigen, 55 °C warmen Nährboden vermischt.

2.3.2 Lösungen

Lysozylösung

1,67 µl N-Lauroylsarcosin Natriumsalz (30%)

2,0 mg Lysozym (Serva)

20 U Mutanolysin (Sigma)

1000 µl 0,05 M EDTA pH 8,5

NDS-Puffer

10 µl 1M TRIS-HCl pH 8,0

100 µl 10%ig SDS

890 µl 0,5 M EDTA pH 8,5

Proteinase-K Lösung

1,5 mg Proteinase-K (AppliChem)

1,0 ml NDS-Puffer

Restriktionsenzym-Puffer

180 µl TE-Puffer pH 8,0

20 µl RC-Puffer (10 x)

0,2 µl BSA (Biolabs)

10 U Restriktionsenzym

Restriktionsenzyme

Spel (Biolabs 10 000 U/ml)

NEBuffer 2 (Biolabs)

XbaI (MBI Fermentas 10 000 U/ml)

Buffer Y⁺ / Tango (MBI Fermentas)

3. Ergebnisse und Diskussion

Eine quantitative Untersuchung von Faecesproben kann problematisch sein, da man den Einfluss des Probentransportes auf die Keime nicht abschätzen kann, insbesondere auch, weil die Keimzusammensetzung von Proband zu Proband unterschiedlich ist. Aus Vorversuchen mit Faecesproben einiger Erwachsener hat sich jedoch ergeben, dass ein maximal 72 Stunden dauernder Transport auch ohne Kühlung und ohne Zusatz von Schutzlösungen wie Cysteinhydrochlorid, Pepton oder Glycerin keinen signifikanten Einfluß auf die mit AMCTw-Agar bestimmbaren Bifidobakterien-Keimzahlen hatte. Wich-

tig war es, dass der Transport in luftdicht verschlossenen, möglichst luftleeren, keimfreien Plastikbeuteln stattfand. Nach Ankunft wurden die Proben entweder sofort analysiert oder bei 4 °C für maximal 2 Tage gelagert. Ein Versand der Stuhlproben über das Wochenende wurde vermieden.

171 Stuhlproben von 69 Kleinkindern aus dem Gebiet der Bundesrepublik Deutschland wurden sowohl quantitativ als auch qualitativ auf Bifidobakterien untersucht. Bei 44 dieser Kinder wurden drei, bei 14 zwei und bei 11 nur eine Stuhlprobe entnommen. Bei Probanden mit 3 Probenahmeterminen waren bei einem Probanden während des gesamten Zeitraumes keine ($< 10^4$ k.b.E/g) Bifidobakterien nachweisbar, bei einem anderen Probanden wurde in der Mitte des Versuchszeitraumes eine Probe entnommen, in der ebenfalls keine Bifidobakterien gefunden wurden, während bei 2 weiteren Probanden in der ersten Stuhlprobe zu Versuchsbeginn keine Bifidobakterien gefunden wurden. In Abb. 1 ist eine Übersicht über das Vorkommen und die Konzentration dieser Keime in den Erstproben vor dargestellt.

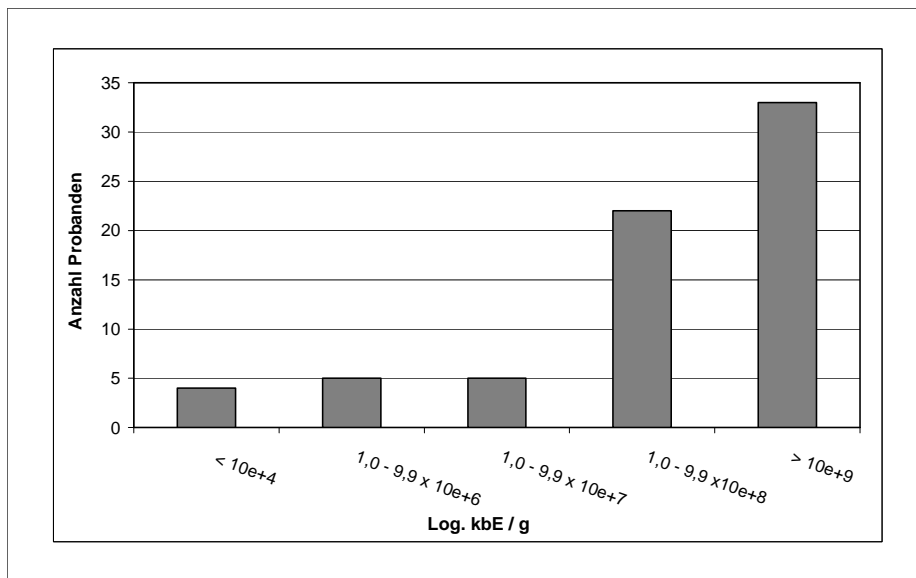


Abb. 1: Anzahl der Kleinkinder mit entsprechenden Keimzahlen an Bifidobakterien pro g Faecesprobe

Aus Abb. 1 ist zu entnehmen, dass in fast 80 % der Faecesproben von Kleinkindern mehr als 10^8 k.b.E. an Bifidobakterien nachweisbar waren, wobei bei etwa 50 % der Proben sogar Keimgehalte von mehr als 10^9 k.b.E./g aufwiesen. Es ist dabei davon auszugehen, dass mit vorliegendem Nährboden nicht alle Bifidobakterienkeime in den Stuhlproben nachgewiesen werden konnten und man daher noch mit höheren Keimzahlen rechnen muss. Fünf dieser Proben enthielt 10^{10} k.b.E./g, wobei die höchste Keimzahl bei $1,1 \times 10^{10}$ lag. Lediglich in 4 Stuhlproben konnten bei einer Nachweisgrenze von 10^4 k.b.E./g keine Bifidobakterien nachgewiesen werden.

Neben der quantitativen Analyse wurde eine qualitative Analyse durchgeführt, indem in der Morphologie unterscheidbare Kolonien isoliert und gereinigt wurden. Insgesamt wurden aus 123 Stuhlproben 197 Bifidoisolate gewonnen. In 41 Stuhlproben konnten

keine Bifidobakterien nachgewiesen werden, während 7 Isolate andere Keime, meistens kokkenförmige Bakterien enthielten. Die DNA-Muster der Bifidobakterienisolate wurden nach PFGE verglichen, womit eine stammspezifische Differenzierung möglich ist. Damit sollte bestimmt werden, ob sich die Zusammensetzung der Bifidobakterien während eines Zeitraumes bei einem Probanden ändert, inwieweit Stuhlproben verschiedener Probanden gleiche Bifidobakterienstämme aufweisen und ob aus Faeces isolierte Bifidobakterienstämme mit bekannten DSM- Stämmen übereinstimmen.

Die Analyse der Faecesproben mit der PFGE brachte eine immense Vielfalt der dort vorhandenen Bifidobakterienstämme zum Vorschein. Die 197 analysierten Bifidobakterienisolate bestanden aus 161 verschiedenen Stämmen. Lediglich bei zwei Probanden konnten in jeder ihrer Faecesprobe über den gesamten Zeitraum identische Stämme nachgewiesen werden (siehe L-M in Abb. 2). In der Regel hatte aber jeder Proband sein eigenes Spektrum an unterschiedlichen Stämmen, wie dies bei M-S in Abb. 2 beispielhaft dargestellt wurde. In der PFGE identische Isolate wurden überwiegend vom gleichen Probanden an einem oder an zwei Entnahmetermen erhalten (siehe J-L, Abb. 2). Lediglich 5 Stämme aus 14 Isolaten mit identischen DNA-Fragmentmuster traten bei verschiedenen Probanden auf. In der Abb. 2 sind exemplarisch die identischen DNA-Fragmentmuster für die Probanden S-R und J-H-L bzw. L-S und T-P dargestellt.

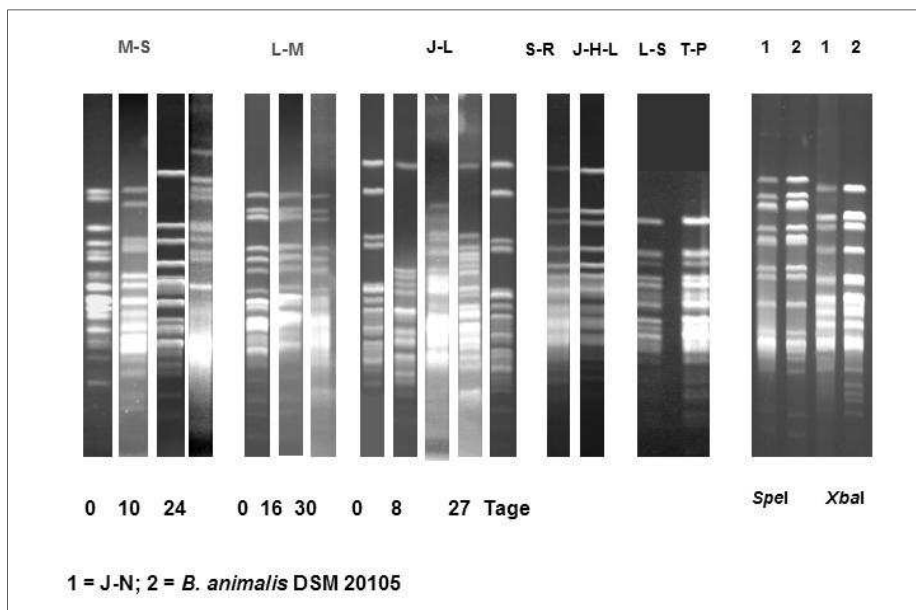


Abb. 2: PFGE von Bifidobakterienstämmen aus humanen Faecesproben

Beim Vergleich der DNA-Muster zwischen Isolaten aus Faeces und DSM-Stämmen wurde nur eine völlige Übereinstimmung beim Probanden J-N nach dem Restriktionsverdau mit den Enzymen *SpeI* und *XbaI* gefunden (Abb.2). Der Stamm, dessen DNA-Muster mit dem eines Faecesisolates identisch ist, ist *B. animalis* DSM 20105/ATCC 27536. Sein Muster ist auch identisch mit dem von Isolaten aus probiotischem Joghurt, egal, ob dieses Milchprodukt 1985 oder später in Deutschland, Österreich und Spanien hergestellt wurde (11). Hiermit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass dieser

Stamm, der ursprünglich aus „chicken feces“ isoliert worden war, auch in humanen Stuhlproben vorkommen kann. Andere Stämme konnten nach PFGE keinem bekannten Vergleichsmuster zugeordnet werden. Aufgrund dieser Untersuchungen lässt sich feststellen, dass die Bifido-Flora von Kleinkindern sich durch sehr große Biodiversität auszeichnet. Wie groß die Biodiversität auf Spezies-Ebene ist, wird zur Zeit mit Hilfe von ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) untersucht.

4. Literatur

- (1) Gomes, A.M.P., Malcata, F.X.: Trends in Food Science & Technology **10** 139-157 (1999)
- (2) Germond, J.E., Mamin, O., Mollet, B.: Systematic and Appl. Microbiology **25** 536-543 (2002)
- (3) Katalog der Deutschen Stammsammlung 1993, 40-42
- (4) Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fakuda, M., Oyaizu, H.: Appl. Environm. Microbiol. **65** 4506-4512 (1999)
- (5) Hartemink, R., Rombouts, F.M.: Journ. of Microbiol. Methods **36** 181-192 (1999)
- (6) Engel, G.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **54** (1) 21-33 (2002)
- (7) Arroyo, L., Cotton, L.N., Martin, J.H.: Cultured Dairy Products J., 12-15 (Feb. 1995)
- (8) Engel, G.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **54** (2) 107-123 (2002)
- (9) Roy, D., Ward, P. and Champagne, G.: Intern. J. of Food Microbiol. **29**, 11-29 (1996)
- (10) Grand, M., Küffer, M., Baumgartner, A.: Eur. Food Res. Technol. **217**, 90-92 (2003)
- (11) Engel, G., Rösch, N., Heller, K.J.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **55** (3) 225-232 (2003)
- (12) Biavati, B., Sgorbati, B., Scardovi, V.: The Procaryotes, 2nd Edition vol 1. The Genus Bifidobacterium, 816-831 (1991)

5. Zusammenfassung

Engel, G., Rösch, N., Heller, K.J.: **Nachweis von Bifidobakterien in Faeces von Kleinkindern mit der Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (PFGE)**. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **56** (2) 135-144 (2004)

26 Mikrobiologie (Faeces, Bifidobakterien, PFGE)

171 Faecesproben von 69 Kleinkindern aus dem Gebiet der Bundesrepublik Deutschland wurden sowohl quantitativ als auch qualitativ auf Bifidobakterien untersucht, wobei bei 44 Kindern drei Proben innerhalb von 14-28 Tagen entnommen wurden. Bei einem Kind konnten in allen drei Stuhlproben keine ($< 10^4$ k.b.E./g) Bifidobakterien gefunden werden, während bei 2 Probanden in der ersten der drei entnommenen Proben keine Bifidobakterien nachweisbar waren. Im Faeces von 80 % der untersuchten Kindern waren mehr als 10^8 und bei fast 50 % mehr als 10^9 k.b.E./g zu finden, wobei die höchste Keimzahl bei $1,1 \times 10^{10}$ lag.

Mit der PFGE wurden 197 erhaltene Bifidobakterienisolate analysiert. Dabei wurden 161 Stämme mit nicht identischen DNA-Mustern erhalten. Bei zwei Probanden konnten in jeder Faecesprobe über den gesamten Zeitraum identische Stämme nachgewiesen werden. In der Regel hatte aber jeder Proband sein eigenes Spektrum an unterschiedlichen Stämmen. Lediglich 5 Stämme mit identischem DNA-Fragmentmuster aus 14 Isolaten traten bei verschiedenen Probanden auf. Beim Vergleich der DNA-Muster zwischen Isolaten aus Faeces und DSM-Stämmen wurde eine völlige Übereinstimmung nach Behandlung sowohl mit dem Restriktionsenzym *SpeI* als auch mit *XbaI* nur mit dem Stamm *B. animalis* DSM 20105/ATTC 27536 gefunden. Dessen Muster ist auch identisch mit den überwiegend in probiotischen Milchprodukten gefundenen Bifidobakterien. Hiermit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass auch dieser Stamm, der ursprünglich aus „chicken feces“ isoliert worden war, auch in humanen Stuhlproben vorkommen kann.

Summary

Engel, G., Rösch, N., Heller, K.J: **Typification of bifidobacteria in feces of infants with Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)**. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **56** (2) 135-144 (2004)

26 Microbiology (Feces, Bifidobacteria, PFGE)

171 feces samples collected from 69 infants on the German territory were analyzed on bifidobacteria under quantitative and qualitative aspects. Hereby, three samples were taken from 44 infants within a period from 14-28 days. For one infant no ($< 10^4$ cfu/g) bifidobacteria were found in the three feces samples, whereas for 2 probands no bifidobacteria were detected in the first of the three taken samples. In the feces of 80 % of the analyzed infants more than 10^8 , and for almost 50 % more than 10^9 cfu./g were detected. The highest bacterial count was 1.1×10^{10} .

197 bifidobacteria isolates were analyzed with PFGE. 161 strains with non-identical DNA patterns were obtained. For two probands identical strains were detected in each feces sample over the whole period. Generally, each proband had, however, his own spectrum with different strains. Only 5 strains with identical DNA fragment patterns from 14 isolates were observed in different probands. At comparing the DNA patterns of isolates from feces and of DSM strains, an absolute concordance after treatment with the restriction enzyme *SpeI* and also with *XbaI* was detected only with the strain *B. animalis* DSM 20105/ATTC 27536. Its pattern is also identical with the bifidobacteria mainly found in probiotic milk products. Thus, it has been possible for the first time to demonstrate that this strain, originally isolated from chicken feces, can also occur in human feces samples.

Résumé

Engel, G., Rösch, N., Heller, K.J: **Typification de bifidobactéries dans des échantillons de selles de petits enfants par électrophorèse en champs pulsés (PFGE)**. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **56** (2) 135-144 (2004)

26 Microbiologie (Selles, bifidobactéries, PFGE)

171 échantillons de selles pris de 69 petits enfants sur le territoire de la RFA étaient analysés sur bifidobactéries sous l'aspect qualitatif et quantitatif. Pour 44 enfants, trois échantillons de selles étaient pris dans une période de 14-28 jours. Pour un enfant examiné, aucun des trois échantillons de selles ne contenait des bifidobactéries ($< 10^4$ UFC/g) tandis que pour deux participants, seulement le premier des trois échantillons n'en contenait pas. Dans les selles de 80 % des enfants examinés, plus de 10^8 et, pour presque 50 %, plus de 10^9 UFC/g étaient détectées. Le dénombrement de colonies le plus élevé était de $1,1 \times 10^{10}$.

197 des isolats de bifidobactéries étaient examinées par PFGE. 161 souches avec des dessins ADN non-identiques étaient obtenues. Pour deux enfants examinés, des souches identiques pouvaient être détectées dans chaque échantillon de selles pour toute la période. En général, chaque enfant examiné avait cependant son propre spectre de souches différentes. Seulement 5 souches à dessin ADN fragmenté identique tirées de 14 isolats étaient observées dans différents enfants examinés. En comparant les dessins ADN des isolats de selles et des souches DSM, une concordance absolue après

traitement avec l'enzyme de restriction *SpeI* et avec *XbaI* n'était observée qu'avec la souche *B. animalis* DSM 20105/ATTC 27536. Son dessin est également identique avec les bifidobactéries détectées avant tout dans les produits laitiers probiotiques. Ainsi, il a pu être démontré pour la première fois que cette souche, originellement isolée des selles de poulets, peut également se produire dans les selles humaines.