

Typisierung von Bifidobakterien aus fermentierten Milchprodukten mit der Pulsfeld-Gel-Elektrophorese.

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

Institut für Mikrobiologie der Bundesanstalt für Milchforschung, Postfach 60 69, 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). Da sie in allen Altersstufen des Menschen einen quantitativ bedeutsamen Anteil der Darmflora bilden und als nicht pathogen gelten, setzt man sie als Probiotika in Lebensmittel, vor allem in fermentierten Milchprodukten ein. Untersuchungen an probiotischen Produkten auf dem europäischen Markt zeigen, dass aus der Gattung *Bifidobacterium* folgende Arten insbesondere aus probiotischem Joghurt isoliert wurden: *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. lactis*, *B. infantis* und *B. breve* (2). Bei der Deklaration *B. bifidum* auf der Verpackung probiotikahaltiger Lebensmittel soll es sich um eine Falschdeklaration handeln, da es sich bei den hier eingesetzten Keimen zumeist um *B. animalis* oder *B. longum* handelt, während *B. lactis* mit großer Wahrscheinlichkeit ein Synonym für *B. animalis* bzw. *B. longum* darstellt (2, 3, 4).

Nachdem festgestellt wurde, dass die phänotypischen Eigenschaften nicht ausreichen, alle infrage kommenden Bifidobakterienarten und -isolate gleichzeitig und zweifelsfrei zu identifizieren (5 - 9), wurden molekularbiologische Methoden angewendet. Hierbei erwies sich die Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (PFGE) als besonders geeignet zur Differenzierung unterhalb der Speziesebene, also auf Stammebene (10). Nach Scardovi (11) schwankt der G + C-Gehalt der Genome von Bifidobakterien zwischen 55 und 64 %. Restriktionsenzyme wie *SpeI* (ACTAGT) und *XbaI* (TCTAGA) erkennen Sequenzen, die reich an A- und T-Nukleotiden sind, zerschneiden das Chromosom in einige große DNA-Fragmente, die mittels PFGE aufgetrennt werden können (12). Mit dieser Methode konnten Roy et al. (13) vier verschiedene genomische Fingerprints für *B. animalis*, fünf für *B. bifidum*, drei für *B. breve*, fünf für *B. infantis* und drei für *B. longum* dokumentieren.

Ziel der nachfolgenden Untersuchung war es, das PFGE-Muster verschiedener Stämme milchwirtschaftlich relevanter Arten von Bifidobakterien, die aus Stammsammlungen zur Verfügung standen, zu bestimmen. Diese sollen verglichen werden mit denen, die aus verschiedenen fermentierten Milchprodukten zu unterschiedlichsten Zeitpunkten isoliert wurden und überwiegend in Deutschland, aber auch in Österreich und Spanien hergestellt wurden.

2. Material und Methoden

2.1 Herkunft der Stämme, Isolate und Milchprodukte

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*. Außerdem wurden 2 Starterkulturen, 2 Isolate aus Pulver, 1 Isolat aus Kautabletten sowie 40 Isolate aus probiotischen Sauermilchprodukten der Jahre 1985-2002, die überwiegend in Deutschland, vereinzelt in Österreich und Spanien hergestellt wurden, analysiert. Sie sind gemäß der hiesigen Stammsammlung mit einer fünfstelligen Bezeichnung, beginnend mit den Anfangszahlen 94, gekennzeichnet.

Die Bakterien-Stämme bzw. Isolate wurden bei -80°C gelagert, als Lagermedium dient das CRYOBANK™ – rot System der Fa. Mast Diagnostica.

2.2 Präparation und Verdau der bakteriellen DNA (13, 14)

Aus den Cryoröhrchen wurden ein bis zwei Kügelchen in ca. 5 ml TPY-Nährlösung (15) 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 Lysozymlösung in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße 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.

2.3 Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (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.

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.

2.4 Lösungen

Lysozymlösung

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

SpeI (Biolabs 10 000 U/ml)
NEBuffer 2 (Biolabs)

XbaI (MBI Fermentas 10 000 U/ml)
Buffer Y⁺ / Tango (MBI Fermentas)

3. Ergebnisse und Diskussion

36 Referenzstämme, die 15 verschiedene Spezies der Gattung *Bifidobacterium* repräsentieren, wurden mittels PFGE charakterisiert, wobei als Restriktionsenzym überwiegend *SpeI* verwendet wurde. *XbaI* diente zur Bestätigung, wenn gleiche DNA-Fragmentmuster nach Verdau mit *SpeI* erhalten wurden. Milchwirtschaftlich relevante Bifidobakterienarten sind nach Auftrennung mit der PFGE in Abb. 1 dargestellt, wobei die einzelnen DNA-Muster, ebenso wie in Abb. 2 und 3, aus verschiedenen Gelen stammen können. Als Bezugspunkt diente der bei jedem Gel mitgeführte Marker. Stämme jener Arten, die als probiotische Bifidobakterien in fermentierten Milchprodukten eingesetzt werden, zeigten alle unterschiedliche Muster auch innerhalb der gleichen Spezies. Von den anderen untersuchten und nicht in fermentierten Milchprodukten zu erwartenden Bifidobakterienarten zeigten die *B. dentium*-Stämme DSM 20221 (Isolat **20** in Abb. 1) und DSM 20436 (**21**) ein gleiches Muster. Ebenfalls gleiche Muster waren bei den beiden

Stämmen *B. angulatum* (DSM 20098, **18**) und *B. catenulatum* (DSM 20103, **19**) zu finden (siehe Abb. 1). Trotz der Übereinstimmungen in den letztgenannten Fällen kann man davon ausgehen, dass sich die PFGE beim Einsatz ausgewählter Restriktionsenzyme eignet, Bifidobakterien stammspezifisch zu identifizieren, wie dies bereits von Roy et al. (13) beschrieben wurde.

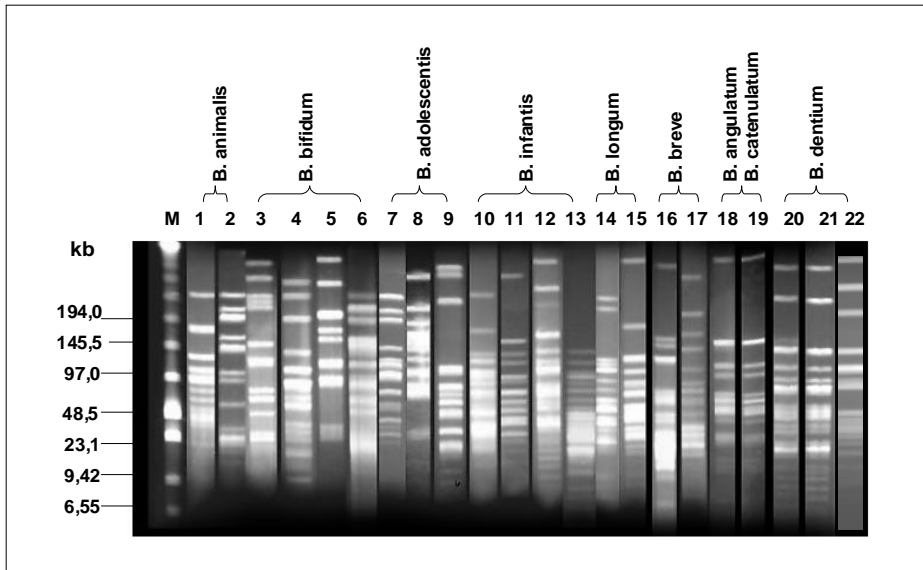


Abb. 1: PFGE von Bifidobakterienstämmen nach Behandlung mit *SpeI*.

M = Low Range PFG Marker in kb,

B. animalis: **1** = DSM 20104, **2** = DSM 20105, *B. bifidum*: **3** = DSM 20082, **4** = DSM 20239, **5** = DSM 20456, **6** = DSM 20215, *B. adolescentis*: **7** = DSM 20083, **8** = DSM 20086, **9** = DSM 20087, *B. infantis*: **10** = DSM 20088, **11** = DSM 20090, **12** = DSM 20223, **13** = DSM 20218, *B. longum*: **14** = DSM 20097, **15** = DSM 20219, *B. breve*: **16** = DSM 20091, **17** = DSM 20213, **18** = *B. angulatum* DSM 20098, **19** = *B. catenulatum* DSM 20103, *B. dentium*: **20** = DSM 20221, **21** = DSM 20436, **22** = DSM 20084

Vergleicht man die DNA-Fragmentmuster von aus Milchprodukten isolierten Stämmen mit denen aus der Stammsammlung, so sind diese in auffallender Weise mit dem aus „chicken feces“ isolierten Stamm *B. animalis* DSM 20105 (entspricht ATCC 27536) identisch (siehe Abb. 2, **B.a.**). Dies bestätigt die Befunde anderer Arbeitsgruppen (13, 14), die ebenfalls nachweisen konnten, dass viele der gewonnenen DNA-Fragmentmuster, deren Stämme aus fermentierten Milchprodukten isoliert wurden, mit diesem *B. animalis* Stamm identisch sind. Biaviati et al. (16) konnten bereits 1992 nur *B. animalis* in den von ihnen analysierten fermentierten Milchprodukten nachweisen. Sie stellten fest, dass das elektrophoretische Muster zellulärer Proteine der untersuchten Isolate mit dem von *B. animalis* ATCC 27536 vergleichbar war.

In der hier vorliegenden Untersuchung ist erstmals mit der PFGE bestätigt worden, dass Bifidobakterienstämmen aus Joghurt aus der Zeit um 1990 gleiche Muster aufwiesen wie die 40 Stämme, die zwischen 1999 und 2002 aus in der Bundesrepublik Deutschland aber auch aus in Österreich und Spanien hergestellten Milchprodukten isoliert wurden. Eine Auswahl dieser Muster ist in Abb. 2 dargestellt. Hieraus ist zweifelsfrei erkennbar,

dass fast alle diese Muster mit dem von *B. animalis* (DSM 20105 bzw. ATCC 27536) (siehe Abb. 2, **B.a.**) identisch sind. Auch bei aus Pulver (Abb. 2, **17** und **18**) und Tabletten (Abb. 2, **19**) isolierten probiotischen Bifidobakterien wurden identische oder nahezu identische Muster gefunden. Bei **19** handelt es sich um das DNA-Fragmentmuster eines Isolates aus Kautabletten, die nach Angaben des Herstellers neben *Lactobacillus acidophilus* noch ca. 10^7 Bifidobakterien/g enthalten sollten. Dieses Isolat wies im Vergleich zu den übrigen aus Milchprodukten isolierten Bifidobakterienstämmen Änderungen bei 145,5 kb (zusätzliche Bande) und bei 97 kb (größerer Abstand zwischen zwei Banden) auf.

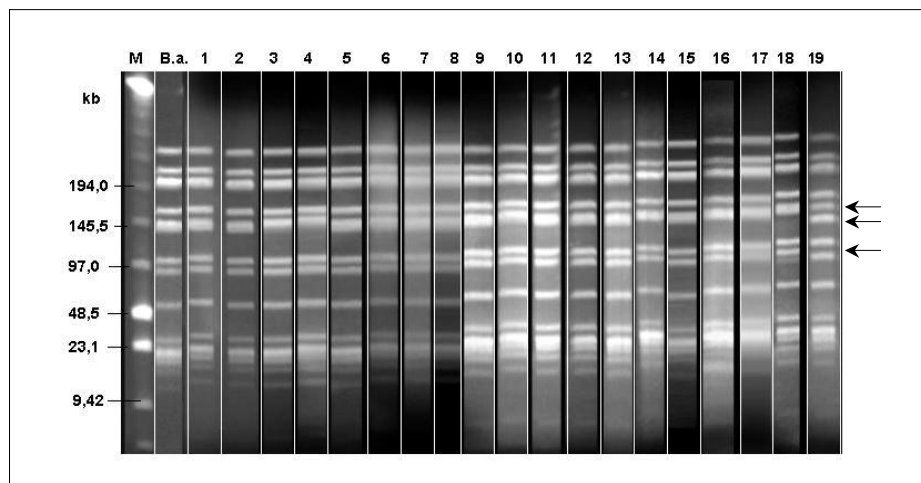


Abb. 2: PFGE von Bifidobakterienstämmen aus Milchprodukten nach Behandlung mit *SpeI*.

M = Low Range PFG Marker in kb,

B.a. = *B. animalis* (DSM 20105 / ATCC 27536)

Joghurt, Deutschland: **1** = 1985, **3-4** = 1988, **5** = 1996, **6-8** = 1999, **9-11** = 2000, **15-16** = 2001; Österreich: **12** = 2000; Spanien: **13** = 2000, **14** = 2001

Starterkultur: **2** = 1988

Pulver: **17, 18**, Tabletten: **19**

Die Pfeile deuten auf Änderungen im Muster von Isolat **19** hin

Eine Ausnahme bildete der Stamm 94006 (siehe Abb. 3, **6**), der 1993 als Starterkultur unter der Bezeichnung „Bifidobacterium animalis“ erworben wurde. Dieser weist ein DNA-Fragmentmuster auf, welches sowohl nach Behandlung mit *SpeI* als auch mit *XbaI* mit dem von *B. adolescentis* DSM 20083 (Abb. 3, **7**) identisch ist und von allen übrigen Mustern abweicht. Ein interessanter Fall zeigte sich bei einem der Joghurtisolates von 1988 (Abb. 3, **4**). Während das *SpeI*-Muster identisch zu *B. animalis* DSM 20105 (**B.a.**) und den übrigen Joghurtisolaten ist, zeigt das *XbaI*-Muster eine Abweichung im Bereich von ca. 194 kb (siehe Abb. 3, **4**, *XbaI*). Ansonsten waren die Muster der restlichen Isolate aus Joghurt sowie der analysierten Starterkulturen untereinander und mit dem von *B. animalis* DSM 20105 nach Einwirkung beider Restriktionsenzyme identisch, wobei die *SpeI*-Muster anders aussahen als die *XbaI*-Muster. Dennoch wurden diese Joghurts mit den verschiedensten Stammbezeichnungen beispielsweise mit „Bif. lactis“, „BB12“, „Bif. longum BB536“, „Lb. bifidus LA7“, „Bifidus acitvo“, „Bifidobacterium OC B111“ oder „B. bifidum“ deklariert. Daraus kann, wie auch schon in der Literatur mehrfach (3, 4, 6,

14) erwähnt, gefolgert werden, dass als Ausgangsstamm für den Zusatz zu probiotischen, fermentierten Milchprodukten in Europa überwiegend der Stamm *B. animalis* DSM 20105 / ATCC 27536 verwendet wurde, und dass die auf den Verpackungen der Milchprodukte ausgedruckten Bakterienbezeichnungen Falschdeklarationen darstellen. Es ist Ziel einer weiteren Untersuchung festzustellen, ob Stämme mit diesem DNA-Fragmentmuster auch in humanen Stuhlproben vorkommen bzw. ob man Stämme, die vor Jahren isoliert wurden, auch heute noch in humanen Stuhlproben finden kann.

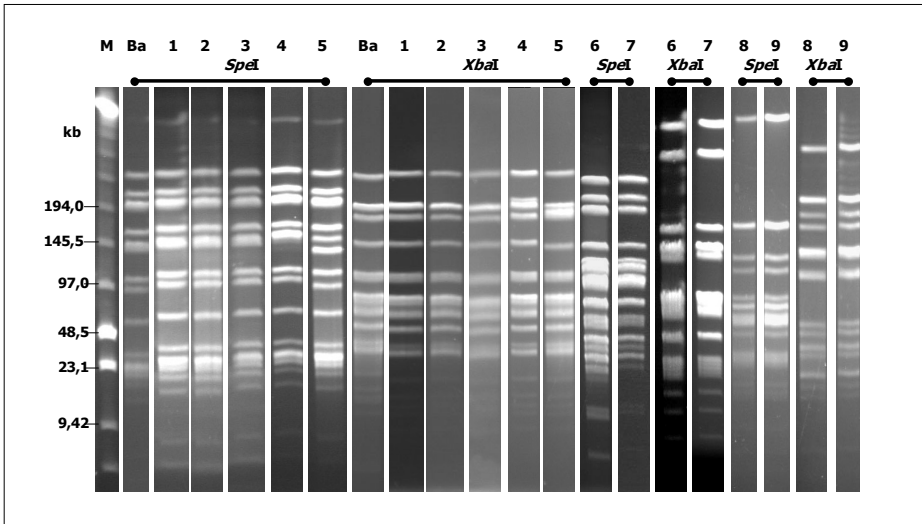


Abb. 3: PFGE von Bifidobakterienstämmen bzw. Isolaten aus Milchprodukten nach Behandlung mit *SpeI* und *XbaI*.

M = Low Range PFG Marker in kb,

B.a. = *B. animalis* (DSM 20105 / ATCC 27536)

1-3: Joghurt, Deutschland 2000, 4: Joghurt, Deutschland 1988, 5: Tabletten, 6: Starterkultur 1993, 7: *B. adolescentis* (DSM 20083), 8: *B. angulatum* (DSM 20098), 9: *B. catenulatum* (DSM 20103)

Danksagung

Für die anregenden Diskussionen und Unterstützung bei der Durchführung der Analysen bedanken wir uns bei Frau Beate Jäger.

4. Literatur

- (1) Gomes, A.M.P., Malcata, F.X.: Trends in Food Science & Technology **10**, 133-157 (1999)
- (2) Abschlußbericht der Arbeitsgruppe "Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln am BGVV: Ernährungs-Umschau 47, 191-195 (2000)
- (3) Reuter, G., Klein, G., Goldberg, M.: Fodd Res. Int. **35**, 117-124 (2002)
- (4) Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G.: Int. Journ. Of Food Microbiol. **41**, 103-125 (1998)
- (5) Chevalier, P., Roy, D., Ward, P.: J. Appl. Bacteriol. **68**, 619-624 (1990)
- (6) Roy, D., Ward, P.: J. Appl. Bacteriol. **69**, 739-749 (1990)
- (7) Yaeshima, T., Fujisawa, T., Tanaka, R.: Milchwissenschaft **47**, 212-214 (1992)
- (8) Bahaka, D., Neut, C., Khattabi, A., Monget, D., Gavini, F.: Int. J. Syst. Bacteriol. **43**, 565-573 (1993)

- (9) Roy, D., Berger, J.L., Reuter, G.: *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 55-70 (1994)
- (10) Lick, S.: *Milchwissenschaft* **58**, 256-260 (2003)
- (11) Scardovi, V.: The genus *Bifidobacterium*. In P.H.A. Sneath, N.S. Nair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (editors), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2 Williams an Wilkins, Baltimore 1418-1434 (1986)
- (12) McClelland, M., Jones, R., Patel, Y., Nelson M.: *Nucl. Acids Res.* **15**, 59856005 (1987)
- (13) Roy, D., Ward, P., Champagne, G.: *Intern. J. of Food Microbiol.* **29**, 11-29 (1996)
- (14) Grand, M., Küffer, M., Baumgartner, A.: *Eur. Food Res. Technol.* **217** 90-92 (2003)
- (15) Biavati, B., Sgorbati, B., Scardovi, V.: *The Procaryotes*, 2nd Edition vol 1. The Genus *Bifidobacterium*, 816-831 (1991)
- (16) Biavati, B., Mattarelli, B., Crociani, F.: *Microbiologica* **15**, 7-14 (1992)

5. Zusammenfassung

Engel, G., Rösch, N., Heller, K.J.: **Typisierung von Bifidobakterien aus fermentierten Milchprodukten mit der Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (PFGE)**. *Kieler Milch-wirtschaftliche Forschungsberichte* **55** (3) 225-232 (2003)

26 Mikrobiologie (Bifidobakterien, PFGE)

Von 36 Stämmen (15 Spezies) der Gattung *Bifidobacterium* von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen wurden nach Behandlung mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *XbaI* DNA-Fragmente mit der PFGE aufgetrennt, untereinander und mit Mustern von 45 Bifidobakterienisolaten aus Starterkulturen und probiotischen fermentierten Milchprodukten verglichen. Letztere wurden teilweise um 1990 isoliert, meistens aber zwischen 1999 und 2002 aus probiotischem Joghurt, welcher in Deutschland, vereinzelt in Österreich und Spanien hergestellt wurde.

Abgesehen von wenigen Ausnahmen waren die DNA-Fragmentmuster der Referenz-Stämme unterschiedlich, was auf eine stammspezifische Einteilungsfähigkeit dieser Methode für Bifidobakterien hinweist. Nach Vergleich der Muster mit denen der Isolate aus Milchprodukten konnte festgestellt werden, dass bis auf zwei Ausnahmen diese Muster mit jenem übereinstimmten, welches von *B. animalis* (DSM 20105 bzw. ATCC 27536) erhalten wurde. Auch bei Tabletten und Pulvern, die probiotische Bifidobakterien enthielten, wurde das gleiche Muster gefunden. Dieser Bakterienstamm wurde aus „chicken feces“ isoliert. Die Befunde bestätigen bzw. ergänzen die schon früher gewonnenen Erkenntnisse, insbesondere auch die, dass die auf den Verpackungen der Milchprodukte ausgedruckten Bakterienbezeichnungen Falschdeklarationen darstellen.

Summary

Engel, G., Rösch, N., Heller, K.J.: **Typing of bifidobacteria from fermented milk products with Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)**. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **55** (3) 225-232 (2003)

26 Microbiology (Bifidobacteria, PFGE)

After treatment with the restriction enzymes *SpeI* and *XbaI* DNA fragments were separated by PFGE from 36 strains (15 species) of the genus *Bifidobacterium* from the German collection of microorganisms and cell cultures. Afterwards they were compared

with samples of 45 bifidobacteria isolates from starter cultures and probiotic fermented milk products. A small number was isolated about 1990, the largest number between 1999 and 2002 from probiotic yoghurt that was manufactured in Germany, in some cases also in Austria and Spain.

Most of the DNA fragment pattern of the reference strains differed from each other thus indicating strain specific differentiation for bifidobacteria. After comparing the samples with those of the isolates from milk products it was stated that they, except for two samples, concord with the sample obtained from *B. animalis* (DSM 20105, ATCC 27536).

The same pattern was found in tablets and powders containing probiotic bifidobacteria. The mentioned bacterial strain was isolated from „chicken feces“. The findings confirm or complete the already obtained knowledge that the bacterial names printed on the packaging of milk products are wrong.

Résumé

Engel, G., Rösch, N., Heller, K.J.: **Typification de bifidobactéries par électrophorèse en champs pulsés (PFGE) de produits laitiers fermentés.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **55** (3) 225-232 (2003)

26 Microbiologie (bifidobactéries, électrophorèse en champs pulsés (PFGE))

Après avoir été traité par les enzymes de restriction *SpeI* et *XbaI* les fragments d'ADN étaient séparés par électrophorèse en champs pulsés de 36 souches (15 espèces) du genre *Bifidobacterium* de la collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires. Ensuite ils étaient comparés à 45 échantillons d'isolats de bifidobactéries provenant de levains et de produits laitiers probiotiques fermentés. Quelques uns étaient isolés vers 1990, la majorité entre 1999 et 2002 de yaourts probiotiques produits en Allemagne, et partiellement aussi en Autriche et en Espagne.

La plupart des échantillons de fragment d'ADN des souches de référence étaient différents, indiquant ainsi les qualités de différenciation pour les bifidobactéries. Après avoir comparé les échantillons avec ceux des isolats de produits laitiers, il a été constaté, à deux exceptions près, qu'ils concordent avec l'échantillon tiré de *B. animalis* (DSM 20105 respectivement ATCC 27536). Le même schéma a été constaté pour des cachets et poudres contenant des bifidobactéries probiotiques. Cette souche de bactéries a été isolée de „chicken feces“. Les résultats obtenus confirment ou complètent les connaissances déjà acquises, notamment que les définitions bactériennes imprimées sur les emballages de produits laitiers sont faux.