

Nachweis von Bifidobakterien in Faeces von Kleinkindern mit der „amplified ribosomal DNA restriction analysis“ (ARDRA)

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

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

1. Einleitung

In einer früheren Studie (1) wurden 171 Faecesproben von 69 Kleinkindern aus dem Gebiet der Bundesrepublik Deutschland sowohl quantitativ als auch qualitativ auf Bifidobakterien untersucht. Dabei wurden aus 123 Stuhlproben 197 Bifidobakterienstämme isoliert und mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) molekularbiologisch analysiert. Diese Methode erlaubt eine stammspezifische Einteilung (2) innerhalb dieser Bakteriengattung. Insgesamt wurden von jenen 197 Bifido-Isolaten 161 Bakterienstämme mit unterschiedlichen PFGE – Mustern erhalten.

Beim Vergleich dieser DNA-Muster mit denen bekannter Bifidobakterienstämme wurde nach Restriktionsverdau mit den Enzymen SpeI und XbaI nur einmal eine völlige Übereinstimmung gefunden. Dieses Muster ist identisch mit dem von *B. animalis* DSM 20105/ATCC 27536, welches auch wiederum identisch ist mit dem der meisten Bifido-Isolate aus probiotischem Joghurt, egal, ob das Milchprodukt 1985 oder später in Deutschland, Österreich und Spanien hergestellt wurde (1, 2). Die übrigen 196 Isolate konnten nach PFGE keinem bekannten Vergleichsmuster und somit auch keiner Spezies zugeordnet werden. Dieses Ergebnis zeigt zwar die Größe und Vielfalt der Biodiversität der Bifidobakterienflora im Stuhl von Kleinkindern an, gibt aber keine Auskunft über die Spezies relevante Zusammensetzung.

In der nachfolgenden Untersuchung wurden diese Isolate molekularbiologisch mit der „amplified ribosomal DNA restriction analysis“ (ARDRA) untersucht, um Aussagen über die Spezies treffen zu können (3-8). Es sollte somit festgestellt werden, welche Bifidobakterienarten im Stuhl von Kleinkindern vorkommen und wie häufig diese dort auftreten.

2. Material und Methoden

2.1 Herkunft der Stämme

2.1.1 Reinkulturen

Die zum Vergleich herangezogenen 55 Bifidobakterien-Stämme, die von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, bezogen wurden, sind in Tabelle 1 mit DSM bezeichnet und repräsentieren 36 verschiedene Arten bzw. Unterarten der Gattung *Bifidobacterium*. Diese Stämme wurden bei -80 °C gelagert, als Lagermedium diente 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 aber dreimal in zeitlichen Abständen von bis zu 4 Wochen Stuhlproben erhalten und daraus Bifidobakterien isoliert. Diese Isolate wurden wie die Reinkulturenstämme bei -80 °C gelagert.

2.2 Isolierung, Kultivierung und „amplified ribosomal DNA restriction analysis“ (ARDRA)

2.2.1 Isolierung, Kultivierung und Lagerung

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 und 0,1 ml dieser Verdünnungen (10^{-4} - 10^{-8}) auf die mit Nährboden beschickten und vorgetrockneten Petrischalen aufgespatelt. Als Nährboden diente AMCTw-Agar (1, 9), bebrütet wurde 5 Tage, bei fehlendem Wachstum 7 Tage bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen. Vertreter der Gattung *Bifidobacterium* 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).

Danach wurden von den Kolonien mit jeweils gleicher Morphologie und Farbe Isolate gewonnen, in TPY (10) bei 37 °C bis zum Auftreten einer Trübung anaerob bebrütet und anschließend bei -80°C (siehe 2.1.1) gelagert.

2.2.2 Präparation, PCR und Verdau der bakteriellen DNA (nach Ventura et al. (5), modifiziert)

Anzucht:

Aus den Cryoröhrchen wurden ein bis zwei Kügelchen in ca. 5 ml TPY-Nährmedium (10) 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 1,0-1,4 inkubiert. Anschließend wurde die gesamte Zellsuspension in 2,0 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und 10 min bei 13000 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.

Isolierung und Reinigung der Nukleinsäure:

Die Isolierung und Reinigung der Gesamt-Nukleinsäure aus den Bifidobakterien erfolgte mit dem Reinigungskit *PrestoSpin DBug* (Molzym). Anschließend wurde mit 100 µl TE-Puffer eluiert.

PCR:

Für die Vervielfältigung der 16S rDNA Abschnitte der Bifidobakterien DNA wurden je Probe ein 50 µl Ansatz hergestellt.

Reagenzien für einen PCR-Ansatz:

2 x PCR – Master Mix (Fermentas K 0171)	25 µl
Primer P0 MWG-Biotech AG 50 pmol/µl	1 µl
Primer P6 MWG-Biotech AG 50 pmol/µl	1 µl
Aqua dest.	22 µl

Die verwendeten Primer P0 (5'-GAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') und P6 (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') (5) wurden 1:2 mit sterilem Aqua dest. auf eine Konzentration von 50 pmol/µl verdünnt.

Zu dem Ansatz wurde 1,0 µl Nukleinsäureextrakt pipettiert und anschließend im Thermocycler (Perkin Elmer Gene Amp 9600) amplifiziert.

Die PCR beginnt mit einer Denaturierung 3 min bei 95 °C, anschließend folgen 35 Zyklen, beginnend mit einer Denaturierung 30 sec bei 94 °C, einem Annealing für 30 sec bei 55 °C und einer Extension bei 72 °C für 2 min. Zum Abschluss der PCR wird ein Elongationsschritt bei 72 °C für 7 min durchgeführt.

Zur Überprüfung der PCR wurden 5 µl PCR-Produkt mit 3 µl DYE-Lösung vermischt, auf ein 0,8 % Agarosegel aufgetragen, bei 50 V aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Die visuelle Auswertung erfolgt mit dem ChemiDoc XRS (Fa. BioRad).

Restriktionsverdau:

Reagenzien

Enzym: Sau3AI (New England BioLabs NEB, R0169L) 4000 U/ml

1 x TE-Puffer

Puffer U + 10 % BSA

Es wird wie bei der PCR ein Master Mix hergestellt.

Master Mix für einen Ansatz:

Enzym: Sau3AI 1 µl

Puffer U + BSA 2 µl

1 x TE-Puffer 2,5 µl

Der Mix wurde zusammen pipettiert und gemischt.

In jedes Eppendorfreaktionsgefäß wurden 5,5 µl Master Mix gegeben und mit 15 µl PCR-Produkt vermischt, wobei das Produkt unter Umständen vorher noch mit 1x TE-Puffer verdünnt wurde, damit die Enzymmenge für den Verdau ausreichte. Verdaut wurde 24 h bei 37 °C. Anschließend erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente mit der Elektrophorese. Hierzu wurden 10 µl des Verdau auf ein Agarosegel (3% w/v) aufgetragen und 3 h bei 75 Volt aufgetrennt. Als Marker diente 100 bp DNA Ladder (Bereich 100-1517 Basenpaare (bp), New England BioLabs, N3231S). Danach wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht (260 nm) ausgewertet.

3. Ergebnisse und Diskussion

Zur Überprüfung, ob sich ARDRA unter den gewählten Bedingungen zur spezies-spezifischen Unterteilung der Gattung *Bifidobacterium* eignet, wurden 55 zur Verfügung stehenden DSM-Stämme, die 36 Arten bzw. Unterarten der Gattung *Bifidobacterium* repräsentieren (11-12) analysiert, wobei die Universal Primer P0 mit 22 Basenpaaren und P6 mit 20 Basenpaaren (5, 14) bei der PCR verwendet wurden. Mittels dieser Primer wird ein ca. 1500 bp großer Abschnitt der 16S rDNA amplifiziert. Ein Fragment entsprechender Größe wurde für alle Stämme nachgewiesen. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym Sau3AI verdaut. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die in der ersten Spalte dieser Tabelle fettgedruckten Stammbezeichnungen sind die für die Spezies definierten Typstämme. Die unterstrichenen Stammbezeichnungen, überwiegend auch Typstämme, markieren die Spezies- bzw. Gruppenvertreter, die nach ARDRA von uns ausgewählt wurden, und deren DNA-Fragmentmuster auch in der Abb. 1 dargestellt sind. Insgesamt wurden 13 verschiedene DNA-Fragmentmuster für die Gattung *Bifidobacterium* erhalten, die in Abb. 1 zusammen mit entsprechendem Marker, in vorliegendem Fall zwischen 100 und 1517 Basenpaaren, dargestellt sind. Die Zuordnung dieser Muster zu bekannten Stämmen bzw. Spezies aus der DSMZ erwies sich vereinzelt als nicht einfach, weil bei den gewählten Versuchsbedingungen einerseits für Stämme der gleichen Art unterschiedliche DNA-Muster gefunden wurden, während andererseits für Stämme verschiedener Arten gleiche Muster erhalten wurden, wobei die ursprüngliche systematische Einteilung überwiegend nach physiologischen Gesichtspunkten erfolgte. Die letztere Problematik traf insbesondere für die DSM-Stämme 20098 und 20103 zu (beide in Tabelle 1 mit (*) gekennzeichnet), die bei der DSMZ als *B. angulatum* bzw. *B. catenulatum* geführt werden, deren PFGE – Muster aber identisch sind (2). Aufgrund der vorher beschriebenen Möglichkeit, kann sich ergeben, dass unbekannte Isolate nach ARDRA verschiedenen Arten innerhalb einer Gruppe zuzuordnen wären. Eine weiter gehende Differenzierung wäre dann möglich, wenn auf die Spezies optimierte Primerkombinationen und/oder Restriktionsenzyme verwendet würden, wie dies von Germond et al. (14) an Faecesproben von 13 verschiedenen Personen zwischen 21 und 50 Jahren durchgeführt wurde.

Da aber im vorliegenden Falle die meisten aus Faecesproben isolierten Stämme solchen Arten zugeordnet werden konnten, die nach ARDRA nur eine Spezies repräsentieren, wurden diese Untersuchungen zunächst zurückgestellt und mehrere infrage kommenden Arten in einer Gruppe zusammengefasst. Wie aus Tab. 2 zu entnehmen ist, sind mit den beiden Universal Primern für die Gattung *Bifidobacterium* die beiden am häufigsten vorkommenden Arten *B. longum* mit Einschränkung und *B. bifidum* nach ARDRA auch nur diesen Spezies zuzuordnen, während z.B. die *adolescentis*-Gruppe außer dem DNA-Muster von *B. adolescentis* auch die noch von *B. asteroides*, *B. boum*, *B. coryneforme*, *B. indicum*, *B. merycicum*, *B. ruminantium* *B. thermacidophilum* ssp. *thermacidophilum* und *B. thermophilum* aufweist. Das DNA-Muster von *B. longum* wurde außer bei *B. longum* noch bei der Spezies *B. suis* gefunden, welche aus Faeces eines Schweines isoliert wurde und nach (13) als „*Bifidobacterium longum* biotype *suis*“ bezeichnet wird. Das Muster von *B. pseudocatenulatum* wurde lediglich noch bei einem der beiden *B. catenulatum*-Stämme nachgewiesen. Die erhaltenen DNA-Fragmentmuster sind vergleichbar mit denen von Ventura et al. (5), die ARDRA mit gleichen Primern und Restriktionsenzym durchführten, wenn die entsprechenden Stämme verwendet wurden.

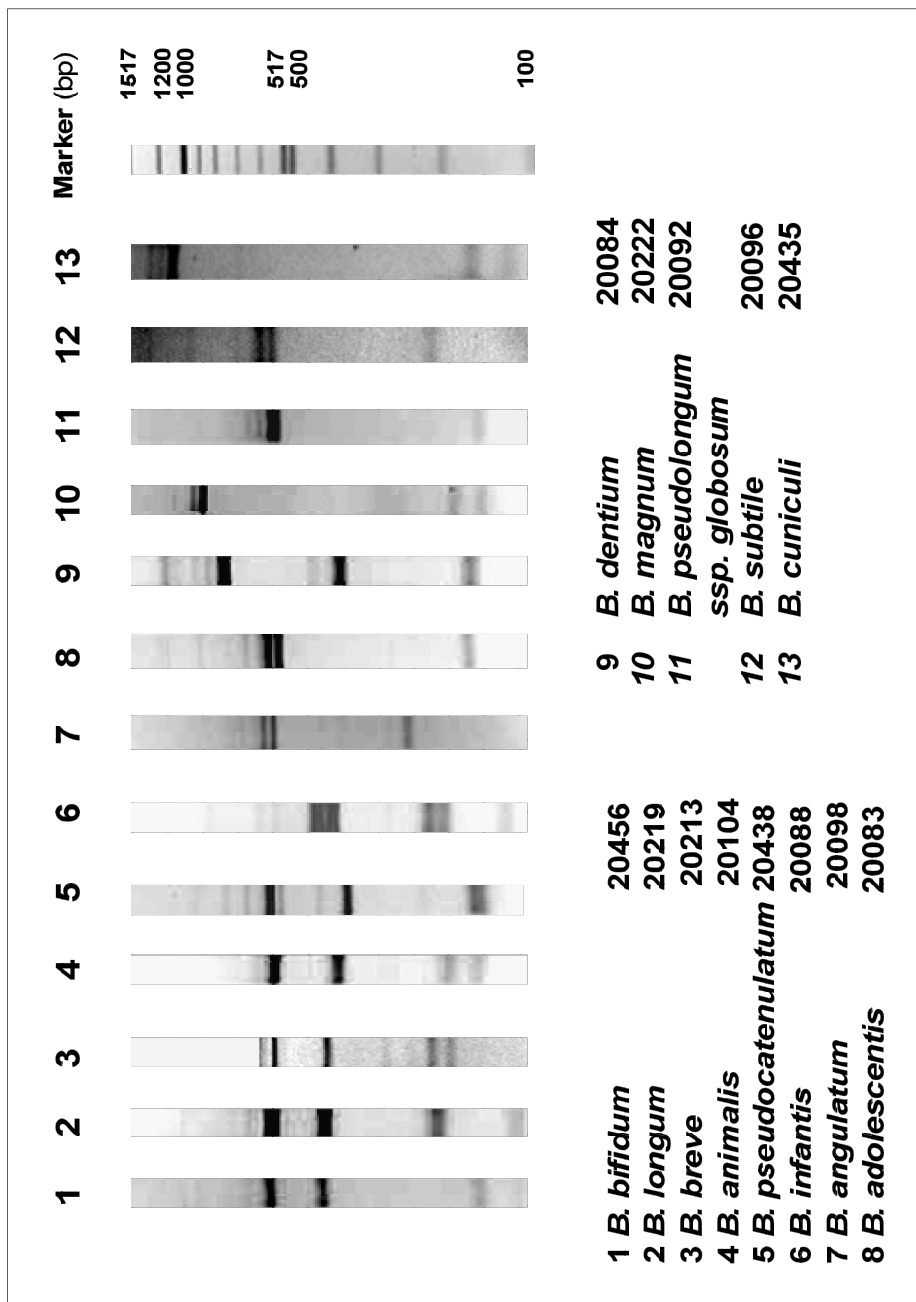


Abb. 1: ARDNA verschiedener Bifidobakterienarten/gruppen

Tab. 1: Zuordnung der DSM-Stämme der Gattung *Bifidobacterium* nach Analyse mit ARDRA

Stammbezeichnung (DSM)	Speziesbezeichnung (DSMZ)	Ergebnisse nach ARDRA
20083 , 20086, 20087	<i>B. adolescentis</i>	<i>B. adolescentis</i>
20098* , 20225,	<i>B. angulatum</i>	<i>B. angulatum</i>
20104 ,	<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i>	<i>B. animalis</i>
10140*** , 20105***	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>B. animalis</i>
20089	<i>B. asteroides</i>	<i>B. adolescentis</i>
20082, 20215, 20239, 20456	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>
20432	<i>B. boum</i>	<i>B. adolescentis</i>
20091	<i>B. breve</i> , <i>B. parvulorum</i>	<i>B. subtile</i>
20213	<i>B. breve</i>	<i>B. breve</i>
20103*	<i>B. catenulatum</i>	<i>B. angulatum</i>
20224	<i>B. catenulatum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>
20434	<i>B. choerium</i>	<i>B. animalis</i>
20216	<i>B. coryneforme</i>	<i>B. adolescentis</i>
20435	<i>B. cuniculi</i>	<i>B. cuniculi</i>
10105	<i>B. denticolens</i>	<i>B. magnum</i>
20084 , 20221**, 20436**	<i>B. dentium</i>	<i>B. dentium</i>
20093	<i>B. gallicum</i>	<i>B. animalis</i>
20670	<i>B. gallinarum</i>	<i>B. subtile</i>
20214	<i>B. indicum</i>	<i>B. adolescentis</i>
20088 , 20090, 20218	<i>B. longum</i> biotype <i>infantis</i>	<i>B. infantis</i>
20223	<i>B. infantis</i> , <i>B. lactentis</i>	<i>B. dentium</i>
10107	<i>B. inopinatum</i>	<i>B. magnum</i>
20097, 20219	<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>
20220, 20222	<i>B. magnum</i>	<i>B. magnum</i>
6492	<i>B. merycicum</i>	<i>B. adolescentis</i>
20102	<i>B. minimum</i>	<i>B. angulatum</i>
20438 , 20439	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>
20092	<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i> (<i>globosum</i>)	<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i>
20094, 20095	<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>pseudolongum</i>	<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i>
20099	<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>pseudolongum</i>	<i>B. animalis</i>
20433	<i>B. pullorum</i>	<i>B. subtile</i>
6489	<i>B. ruminantium</i>	<i>B. adolescentis</i>
6531	<i>B. saeculare</i>	<i>B. subtile</i>
13734	<i>B. scardovii</i>	<i>B. angulatum</i>
20096	<i>B. subtile</i>	<i>B. subtile</i>
20211	<i>B. longum</i> biotype <i>suis</i>	<i>B. longum</i>
15837	<i>B. thermacidophilum</i> ssp. <i>thermacidophilum</i>	<i>B. adolescentis</i>
20209, 20210 , 20212	<i>B. thermophilum</i>	<i>B. adolescentis</i>

Fettdruck = Typstamm; ____ = ARDRA –Gruppenvertreter; */**/** identisch in der PFGE

Tab. 2: Zusammenstellung der Spezies/Gruppen nach ARDRA

<i>B. adolescentis</i> -Gr.:	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. asteroides</i> , <i>B. boum</i> , <i>B. coryneforme</i> , <i>B. indicum</i> , <i>B. merycicum</i> , <i>B. ruminantium</i> , <i>B. thermacidophilum</i> ssp. <i>thermacidophilum</i> , <i>B. thermophilum</i>
<i>B. angulatum</i> -Gr.:	<i>B. angulatum</i> , <i>B. catenulatum</i> (DSM 20103), <i>B. minimum</i> , <i>B. scardovii</i>
<i>B. animalis</i> -Gr.:	<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> , <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>B. choerium</i> , <i>B. gallicum</i> , <i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>pseudolongum</i> (DSM 20099)
<i>B. bifidum</i> :	<i>B. bifidum</i>
<i>B. breve</i> :	<i>B. breve</i> (DSM 20213)
<i>B. cuniculi</i> :	<i>B. cuniculi</i>
<i>B. dentium</i> :	<i>B. dentium</i> , <i>B. infantis</i> (DSM 20223)
<i>B. infantis</i> :	<i>B. longum</i> biotype <i>infantis</i> (DSM 20088, 20090, 20218)
<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i> , <i>B. longum</i> biotype <i>suis</i>
<i>B. magnum</i> :	<i>B. magnum</i> , <i>B. denticolum</i> , <i>B. inopinatum</i> , <i>B. scardovii</i>
<i>B. pseudocatenulatum</i> :	<i>B. pseudocatenulatum</i> , <i>B. catenulatum</i> (DSM 20224)
<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i> :	<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i> , ssp. <i>pseudolongum</i> (DSM 20094, 20095)
<i>B. subtile</i> -Gr. :	<i>B. subtile</i> , <i>B. breve</i> (DSM 20091), <i>B. gallinarum</i> , <i>B. pul-lorum</i> , <i>B. saeculare</i>

Insgesamt wurden von 69 Kleinkindern aus dem Gebiet der Bundesrepublik Deutschland 171 Faecesproben sowohl quantitativ als auch qualitativ auf Bifidobakterien untersucht (1). Aus diesen 171 Proben wurden 228 Isolate gewonnen, von denen wiederum 164 nach Analyse mit ARDRA der Gattung Bifidobacterium zugeordnet werden konnten, -einige dieser Isolate wiesen andere DNA-Muster auf als die zur Verfügung stehenden Vergleichsstämme, einige sind nicht mehr angewachsen-. Insgesamt konnten diese 164 Faecesisolate sechs verschiedene Spezies bzw. Gruppen zugeordnet werden (siehe Tabelle 3). Davon konnten 50 % *B. longum*, 17 % *B. pseudocatenulatum/catenulatum*, 15 % *B. bifidum*, 11 % *B. breve* und 6 % der *B. adolescentis*-Gruppe zugeordnet werden. Lediglich zwei Isolate (1 %) wiesen das gleiche Muster auf wie *B. animalis*. Hierbei handelt es sich um die gleichen Isolate, die bereits in der PFGE mit dem auch in probiotischen Milchprodukten gefundenen *B. animalis*-Stamm DSM 20105/ATTC 27536 identisches Muster aufwiesen (1). Nach Verwendung klassischer Kulturmethoden wurde festgestellt, dass *B. adolescentis* und *B. longum* als dominierende Bifidobakterienstämme in Faeces von Erwachsenen vorkommen (15-17), was auch von Satakori et al. (18) mit der „Genus-spezifischen PCR“ und anschließender „Gradient-Gel Elektrophorese“ bestätigt wurde, während *B. infantis* und *B. breve* als dominierende Bifidobakterienart in Faeces von Säuglingen vorkommen soll (15,19). Letzteres konnte nur teilweise durch die vorliegende

Untersuchung bestätigt werden, vor allem konnte *B. infantis* nicht nachgewiesen werden. Zu ähnlichen Ergebnissen wie in der vorliegenden Untersuchung kamen auch Vlkovka et al. (20), die in Faeces von 33 mit Muttermilch ernährten Kindern, die zwischen 1 und 12 Wochen alt waren, überwiegend *B. longum* (in ca 58 % der Bifidobakterien-positiven Proben), gefolgt von *B. adolescentis* (ca 32 %), *B. bifidum* (ca 21 %), *B. breve* (ca. 10 %) und *B. pseudocatenulatum* und *B. dentium* (jeweils ca. 5 % der Proben), nachweisen konnten, während *B. infantis* ebenfalls nicht gefunden wurde.

Tab. 3: Anteil der Bifidobakterienarten im Stuhl von Kleinkindern

Spezies/Gruppenbezeichnung nach ARDRA	Anteil		
<i>Bifidobacterium longum</i>	82	Isolate	(50 %)
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	27	Isolate	(17 %)
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	25	Isolate	(15 %)
<i>Bifidobacterium breve</i>	18	Isolate	(11 %)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	10	Isolate	(6 %)
<i>Bifidobacterium animalis</i>	2	Isolate	(1 %)
Gesamt <i>Bifidobacterium</i> sp.	164	Isolate	(100 %)

4. Literatur

- (1) Engel, G., Rösch, N., Heller, K.J.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **56** (2) 135-144 (2004)
- (2) Engel, G., Rösch, N., Heller, K.J.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **55** (3) 225-232 (2003)
- (3) Roy, D., Ward, P. and Champagne, G.: Intern. J. of Food Microbiol. **29**, 11-29 (1996)
- (4) Roy, D., Sirois, S.: FEMS Microbiology Letters **191**, 17-24 (2000)
- (5) Ventura, M., Elli, M., Remiero, R., Zink, R.: FEMS Microbiology Ecology **36**, 113-121 (2001)
- (6) Venema, K., Maathuis, A.J.H.: FEMS Microbiology Letters **224**, 143-149 (2003)
- (7) Ward, P., Roy, D.: Lait **85**, 23-32 (2005)
- (8) Satokari, R.: Molecular identification and characterisation of bifidobacteria and lactobacilli in human gastrointestinal tract. (Academic dissertation) VTT Publications 454 (2001)
- (9) Arroyo, L., Cotton, L.N., Martin, J.H.: Cultured Dairy Products J. , 12-15 (Feb. 1995)
- (10) Biavati, B., Sgorbati, B., Scardovi, V.: The Prokaryotes, 2nd Edition vol 1. The Genus *Bifidobacterium*, 816-831 (1991)
- (11) Katalog der Deutschen Stammsammlung 1993, 40-42
- (12) DSMZ – List of Microbial Genera: *Bifidobacterium* (Bacteria) Stand Juli 2005
- (13) Sakata, S., Kitahara, M., Sakamoto, M., Hayashi, H., Fukuyama, M., Benno, Y.: Intern. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiol. **52**, 1945-1951 (2002)
- (14) Germond, J.E., Mamin, O., Mollet, B. : Systematic and Applied Microbiology **25**, 536-543 (2002)
- (15) Finegold, S.M., Atterbury, H.R., Slutter, V.L.: Am.J.Clin.Nutr. **27**, 1456-1469 (1974)
- (16) Moore, W.E.C., Holdeman, L.V.: Appl. Microbiol. **27**, 961-979 (1974)
- (17) Mutai, M., Tanaka, R.: Bifidobacteria Microflora **6**, 33-41 (1987)
- (18) Satokari, R.M., Vaughan, E.E., Akkermans, A.D.L., Saarela, M., de Vos, W.M.: Appl. Environm. Microbiol. **2**, 504-513 (2001)
- (19) Benno, Y., Sawada, K., Mitsouka, T.: Microbiol. Immunol. **28**, 975-986 (1984)
- (20) Vlkovka, E., Rada, V., Bujnakova, D., Kmet, V.: Folia Microbiol. **29**, 209-212 (2004)

5. Zusammenfassung

Engel, G., Rösch, N., Heller, K.J.: **Nachweis von Bifidobakterien in Faeces von Kleinkindern mit der „amplified ribosomal DNA restriction analysis“ (ARDRA).** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **57** (2) 87-96 (2005)

26 Mikrobiologie (Faeces, Bifidobakterien, ARDRA)

An 36 verschiedenen Arten (55 Stämme) der Gattung *Bifidobacterium* wurde zunächst die Eignung von ARDRA zur molekularbiologischen Differenzierung auf Speziesebene untersucht. Mit den gewählten Bedingungen (PCR mit den Universalprimern P0 und P6, Restriktionsverdau mit Sau3AI) konnten die überwiegend nach biochemischen Merkmalen eingeteilten Stämme molekularbiologisch in 13 Arten bzw. Gruppen unterteilt werden, wobei jedoch einige Gruppen wie z.B. die „*adolescentis*-Gruppe“ mehrere Spezies enthält. Da aber die meisten aus Faecesproben isolierten Bifidobakterienstämme solchen Gruppen zugeordnet werden konnten, die nur eine Art repräsentieren, wurde für die weiteren Untersuchungen diese Analysenbedingungen gewählt.

Insgesamt wurden von 69 Kleinkindern aus dem Gebiet der Bundesrepublik Deutschland aus 171 Faecesproben 228 Isolate gewonnen, von denen 164 nach Analyse mit ARDRA der Gattung *Bifidobacterium* angehörten. Die restliche Isolate wiesen entweder andere DNA-Fragmentmuster auf als die zur Verfügung stehenden Vergleichsstämme oder sind nicht mehr angewachsen. Insgesamt konnten jene 164 Faecisolate in sechs verschiedenen Gruppen eingeteilt werden, von denen ca. 50 % *B. longum*, 17 % *B. pseudocatenulatum/catenulatum*, 15 % *B. bifidum*, 11 % *B. breve* und 6 % der *B. adolescentis*-Gruppe zugeordnet werden konnten. Lediglich zwei Isolate wiesen das gleiche Muster auf wie *B. animalis*, was auch vorher schon durch die PFGE bestätigt wurde.

Summary

Engel, G., Rösch, N., Heller, K.J.: **Detection of bifidobacteria in feces of infants with the „amplified ribosomal DNA restriction analysis“ (ARDRA).** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **57** (2) 87-96 (2005)

26 Microbiology (Feces, bifidobacteria, ARDRA)

The suitability of ARDRA for molecular-biological differentiation on species level was investigated in 36 different species (55 strains) of the genus *Bifidobacterium*. The selected conditions (PCR with the universal primers P0 and P6, restriction digests with Sau3AI) allowed to proceed to a molecular-biological subdivision of the strains, which were mainly subdivided according to biochemical criteria into 13 species or groups. Some groups, like the „group *adolescentis*“, displayed several species. However, as most of the bifidobacteria strains isolated from feces could be allocated to the groups representing only one species, the above mentioned analytical conditions were chosen for further investigations.

Altogether, 228 isolates were taken from 171 feces samples of 69 infants in the territory of the Federal Republic of Germany. The ARDRA analysis showed that 164 of these isolates belonged to the genus *Bifidobacterium*. The remaining isolates had either different DNA fragment patterns than the available comparative strains, or did simply no more adhere. 164 feces isolates could be allocated to six different groups: among others

50 % to *B. longum*, 17 % to *B. pseudocatenulatum/catenulatum*, 15 % to *B. bifidum*, 11 % *B. breve* and 6 % to the group *B. adolescentis*. Only two isolates showed the same pattern as *B. animalis*, which had already been confirmed by PFGE.

Résumé

Engel, G., Rösch, N., Heller, K.J.: **Détection de bifidobactéries dans les selles d'enfants en bas âge avec l'analyse de restriction de l'ADNr amplifié (ARDRA)**. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsbericht **57** (2) 87-96 (2005)

26 Microbiologie (selles, bifidobactéries, ARDRA)

Dans 36 espèces différentes (55 souches) du genre *Bifidobacterium*, la qualification d'ARDRA pour la différenciation moléculaire-biologique au niveau de l'espèce a été examinée. Les conditions choisies (PCR avec les primaires universels P0 et P6, enzyme de restriction avec Sau3AI) permettaient de subdiviser les souches, étant principalement classées selon des propriétés biochimiques, dans 13 espèces ou groupes selon des critères moléculaires-biologiques. Certains groupes, comme le groupe „*adolescentis*“, comptaient plusieurs espèces. Cependant, comme la plupart des souches de bifidobactéries isolées ont pu être attribuées aux groupes à une seule espèce, les conditions d'analyse sus-mentionnées furent choisies pour les examens ultérieurs.

Au total, 228 isolats étaient pris de 171 échantillons de selles de 69 enfants en bas âge sur le territoire de la République fédérale d'Allemagne. L'analyse ARDRA a démontré que 164 de ces isolats appartenaient au genre *Bifidobacterium*. Les autres isolats avaient, ou bien des patrons de fragment ADN différents des souches comparatives disponibles, ou ne pouvaient plus se proliférer. Au total, 228 isolats étaient tirés de 171 échantillons de selles de 69 enfants en bas âge sur le territoire de la République fédérale d'Allemagne. L'analyse ARDRA a démontré que 164 de ces isolats appartenaient au genre *Bifidobacterium*. 164 isolats de selles pouvaient être affectés à six groupes différents, entre autres 50 % à *B. longum*, 17 % à *B. pseudocatenulatum/catenulatum*, 15 % à *B. bifidum*, 11 % *B. breve* et 6 % au groupe *B. adolescentis*. Seulement deux isolats avaient le même patron que *B. animalis*, ce qui avait été déjà confirmé par Electrophorèse en Champ Pulsé (ECP).