

**Tierärztliche Hochschule Hannover
Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit
des Zentrums für Lebensmittelwissenschaften**

**Durchflusszytometrische Bestimmungen von
probiotischen Starterkulturen
unter besonderer Berücksichtigung von
Laktobazillen und Bifidobakterien**

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

Vorgelegt von
Birte Ahlfeld
(Rendsburg)

Hannover 2008

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2008

© 2008 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-939902-71-3

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

**Tierärztliche Hochschule Hannover
Institut für Lebensmittelqualität und – sicherheit
des Zentrums für Lebensmittelwissenschaften**

**Durchflusszytometrische Bestimmungen von probiotischen Starterkulturen unter
besonderer Berücksichtigung von Laktobazillen und Bifidobakterien**

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

Vorgelegt von
Birte Ahlfeld
(Rendsburg)

Hannover 2008

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. Günter Klein

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Günter Klein
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Martina Hoedemaker, Ph. D.

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Mai 2008

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden an folgenden Stellen veröffentlicht:

AHLFELD, B., C. BONAPARTE, A. SULZER, A. SCHRÖDER, G. KLEIN (2005):
Die Durchflußzytometrie als alternative Methode neben klassischen Nährböden bei der Bestimmung von Bakterien in probiotischen Milchprodukten
In: Proc. 46. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der DVG, Garmisch-Partenkirchen 27.09.-30.09.2005, 299-304

SCHRÖDER, A., B. AHLFELD, C. BONAPARTE, A. SULZER, G. KLEIN (2005):
Durchflußzytometrische Analytik probiotischer Bakterien
Poster in: Deutsche Gesellschaft für Milchwissenschaft, Milchkonferenz 29.09.-30.09.2005, 118

AHLFELD, B., C. BONAPARTE, G. KLEIN (2006):
Ansätze zur quantitativen Bestimmung von probiotischen Bakterien im Durchflußzytometer
In: 47. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der DVG, Garmisch-Partenkirchen 26.09.-29.09.2006, Sonderausgabe Amtstierärztlicher Dienst, 178

AHLFELD, B., C. BONAPARTE, Y. KASHI, G. KLEIN (2007):
Probiotische Bakterien im Einsatz für den Menschen
Forschung fürs Leben, ISSN 0947- 0956, 45-47

AHLFELD, B., C. BONAPARTE, Y. KASHI, G. KLEIN (2007):
Probiotische Bakterien: kleine Helfer mit großer Wirkung
Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung 59 (5), 178-179

BONAPARTE, C., B. AHLFELD, G. KLEIN (2007):
Quantitative Bestimmung von Bakterien in probiotischen Milcherzeugnissen mittels Durchflußzytometrie
Vortrag in: Symposium Schnellmethoden und Automatisierung in der Lebensmittel-Mikrobiologie, Lemgo 27.06.-29.06.2007

AHLFELD, B., C. BONAPARTE, G. KLEIN (2007):
Einflüsse von Milch auf die quantitative Bestimmung von probiotischen Bakterien im Durchflußzytometer
In: 48. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der DVG, Garmisch-Partenkirchen 25.09.-28.09.2007, Sonderausgabe Amtstierärztlicher Dienst, 214

AHLFELD, B., C. BONAPARTE, G. KLEIN (2007):
Enumeration of probiotic bacteria in milk products by flow cytometry
Poster in: Internationales Yakult-Symposium, Verona 22.11-23.11.2007

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Birte Ahlfeld:

Durchflusszytometrische Bestimmungen von probiotischen Starterkulturen unter besonderer Berücksichtigung von Laktobazillen und Bifidobakterien

1 EINLEITUNG	1
2 SCHRIFTTUM	3
2.1 Probiotika	3
2.1.1 Definition	3
2.1.2 Taxonomische Betrachtung.....	4
2.1.2.1 <i>Lactobacillus</i> spp.....	5
2.1.2.2 <i>Bifidobacterium</i> spp.	9
2.1.2.3 Andere Spezies	13
2.1.3 Natürliches Vorkommen	15
2.1.4 Wirkungsmechanismen	16
2.1.5 Anwendungsgebiete	23
2.1.5.1 Lebensmittel und Futtermittel	23
2.1.5.2 Pharmazeutische Präparate.....	27
2.1.6 Anforderungen	27
2.1.7 Wirksamkeit	32
2.2 Qualitativer und quantitativer Nachweis von probiotischen Mikroorganismen	37
2.2.1 Kulturelle Keimzahlbestimmung	37
2.2.1.1 <i>Lactobacillus</i> spp. Nachweis.....	37
2.2.1.2 <i>Bifidobacterium</i> spp. Nachweis.....	38
2.2.1.3 Nährböden für andere Spezies.....	42
2.2.2 Durchflusszytometrie	43
2.2.2.1 Prinzip	43
2.2.2.2 Einsatzmöglichkeiten	44
2.2.2.3 Farbstoffe	45
2.2.2.4 Partikelzählung.....	48
3 MATERIAL UND METHODEN.....	51
3.1 Material	51
3.1.1 Bakterienstämme	51
3.1.2 Produkte	53
3.1.2.1 Milchlischerzeugnisse	53
3.1.2.2 Andere Produkte.....	54
3.1.3 Nährmedien	54
3.1.4 Durchflusszytometrie	56
3.1.5 Technische Geräte	56
3.2 Methoden.....	57
3.2.1 Kulturelle Nachweisverfahren.....	57
3.2.1.1 Reinkulturen	57
3.2.1.2 Mischkulturen.....	62
3.2.2 Durchflusszytometer	64

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.2.1 FACSCalibur®	64
3.2.2.2 Qualitativer Nachweis	65
3.2.2.3 Quantitativer Nachweis	66
3.2.2.4 Nachweisgrenze	68
3.2.2.5 Auswertung	69
4 ERGEBNISSE	71
4.1. Vitalitätsbestimmung	71
4.1.1 Reinkultur	71
4.1.2 Milchscherzeugnisse	74
4.1.3 Pharmazeutische Präparate	76
4.2 Keimzahlbestimmung	79
4.2.1 Nachweisgrenze	81
4.2.2 Reinkultur	88
4.2.3 Reinkultur mit Milchzusatz	89
4.2.4 Milchscherzeugnis	99
5 DISKUSSION	103
5.1 Vitalitätsbestimmung	103
5.1.1 Farbstoffauswahl	103
5.1.2 Reinkultur	104
5.1.3 Milchscherzeugnisse	106
5.1.4 Pharmazeutika	107
5.2 Keimzahlbestimmung	109
5.2.1 Nachweisgrenze	109
5.2.2 Reinkultur	111
5.2.3 Reinkultur mit Milchzusatz	111
5.2.4 Milchscherzeugnisse	113
5.2.5 Ausblick	117
6 SCHLUSSFOLGERUNGEN	119
7 ZUSAMMENFASSUNG	121
8 SUMMARY	125
9 ANHANG	129
9.1 Nährmedien	129
9.2 Reagenzien	135
9.2.1 Reagenzien für OSV	135
9.2.2 Reagenzien für die Durchflusszytometrie	136
9.2.3 Technische Geräte	138
9.2.4 Glas- und Einmalartikel	139
9.3 Gramfärbung	141
9.4 Probenaufbereitung	142
9.5 Stammsammlung	143
9.6 Tabellenanhang	146
9.7 Abbildungsverzeichnis	150
9.8 Tabellenverzeichnis	151
9.9 Abkürzungsverzeichnis	153
10 SCHRIFTTUMSVERZEICHNIS	155

I EINLEITUNG

Probiotische Produkte erfreuen sich weltweit zunehmender Beliebtheit. Sowohl in der Lebensmittel- als auch in der Futtermittelproduktion und als pharmazeutische Präparate kommen sie in vielfältiger Art zum Einsatz. Als funktionelle Lebensmittel besitzen sie über ihren reinen Nährwert hinaus eine gesundheitsbezogene Wirkungskomponente. Sie werden sowohl präventiv als auch bei vorhandenen Dysfunktionen des Gastro-Enteraltraktes, Laktoseunverträglichkeit oder mikroökologischen Entgleisungen eingesetzt.

Die wirtschaftliche Bedeutung dieser Produkte ist hoch und hat eine deutlich steigende Tendenz.

Ein großer Teil der probiotischen Lebensmittel sind fermentierte Milchprodukte wie Joghurt und Wellness-Drinks. In diesen sind neben den normalen Joghurtkulturen vor allem bestimmte Stämme von Bifidobakterien und Laktobazillen eingesetzt, die helfen sollen, die Gesundheit zu erhalten.

Um gesundheitsbegünstigende Leistungen erbringen zu können, ist ein Ausgangsgehalt von wenigstens einer Million Bakterien pro Milliliter Produkt vermehrungsfähiger Bakterien empfohlen.

Zur Qualitätssicherung erfolgt die qualitative und quantitative Bestimmung der Keimzahl klassischer Weise - ein Standardverfahren existiert nicht - auf Elektiv- und Selektiv-Nährböden, was jedoch einen Zeitraum von 48 h bis 7 d sowie gut geschultes Personal erfordert.

Die bei der somatischen Zellzahlanalyse bereits routinemäßig eingesetzte Durchflusszytometrie nimmt nur wenige Stunden in Anspruch, so dass sich eine spezifische Übertragung dieser Schnellmethode auf probiotische Mikroorganismen anbot.

Ziel dieser Arbeit sollte sein, die Durchflusszytometrie als Alternative zum herkömmlichen Oberflächenspatelverfahren zur Überprüfung des Gehaltes an probiotischen Bakterien und deren Lebensfähigkeit zu erproben.

Des Weiteren sollte neben der Qualifizierung auch eine Quantifizierung der Mikroorganismen durch das Durchflusszytometer erarbeitet werden.

1 EINLEITUNG

2 SCHRIFTTUM

2.1 Probiotika

2.1.1 Definition

Der Ursprung des Begriffes *Probiotikum* setzt sich aus der lateinischen Silbe *pro* und der griechischen Endung *bios* zusammen und bedeutet „für das Leben“.

Erstmals erwähnt wurde der Begriff 1965 von LILLEY und STILLWELL, die darunter das Gegenteil von Antibiotikum verstanden. FULLER (1989) hat eine zusammenfassende Definition geprägt und Probiotikum als „Futterzusatzstoff mit lebenden Mikroorganismen, der durch die Verbesserung des mikroökologischen Gleichgewichts der Intestinalflora nützliche Wirkung auf das Wirtstier hat“ beschrieben. REUTER (1997) hat diese Aussage dahingehend erweitert, dass er den Einsatz von Probiotika nicht auf den Gastrointestinaltrakt von Tieren beschränkt, sondern den Begriff auch auf in Lebensmitteln und pharmazeutischen Präparaten eingesetzte Bakterienkulturen ausweitet. SALMINEN et al. (1999) definieren Probiotika als lebenden, mikrobiellen Zusatz, der für die Gesundheit von Vorteil ist. Die Arbeitsgruppe „Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln“ am BgVV (1999, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, heute: BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung, ANONYM 1999a) hat Probiotika für den Einsatz in Lebensmitteln als definierte Mikroorganismen beschrieben, die in ausreichender Menge in aktiver Form in den Darm gelangen und hierbei positive gesundheitliche Wirkungen erzielen.

Deutlich von Probiotika abzugrenzen sind Pre- und Synbiotika.

Prebiotika sind von zuletzt genannter Arbeitsgruppe als „spezifische unverdauliche Stoffe, die selektiv Bifidobakterien und möglicher Weise auch andere Mikroorganismen in ihrem Wachstum im Darm fördern und dadurch positive gesundheitliche Wirkungen erzielen“ beschrieben, und „Synbiotika sind Kombinationen von Pro- und Prebiotika, die deren Vorteile synergistisch in sich vereinigen“.

GIBSON und ROBERFROID (1994) definieren Prebiotika als Futterbestandteile, die für den Makroorganismus unverdaulich sind und das Wachstum und/oder die Aktivität einzelner oder in begrenzter Anzahl im Dickdarm vorkommender Bakterien (v.a. die nützliche Darmflora) selektiv stimulieren und dadurch der Gesundheit des Wirtsorganismus zuträglich sind.

NOGOSSEK (2001) beschreibt sie genauer als „Ballaststoffe“ wie Kohlenhydrate (z.B. Oligofruktose, Inulin) der Gruppe der Nicht-Stärke-Polysaccharide. Bedingt durch ihre spezielle Bindungsform können sie von körpereigenen Verdauungsenzymen nicht gespalten werden und gelangen unverdaut in den hinteren Teil des Dünndarms sowie in den Dickdarm, wo sie als Energie- und Nährstoffquelle für Mikroorganismen, besonders Laktobazillen und Bifidobakterien, dienen. GIBSON und ROBERFROID (1994) sehen als Prebiotika zusätzlich Proteine, Peptide und verschiedene Fette, hauptsächlich aus Milch- und Pflanzenprodukten, welche die Absorption von Kationen wie Kalzium und Eisen erleichtern und das Immunsystem stimulieren. Einen Überblick über verschiedene Definitionen gibt TANNOCK (2004).

2.1.2 Taxonomische Betrachtung

Die Bezeichnung Milchsäurebakterien wird für eine große Anzahl von Genera genutzt, von denen einige probiotische Stämme beinhalten.

Allen Milchsäurebakterien gemein ist die Fähigkeit, bei der Fermentation von Kohlenhydraten Milchsäure zu bilden. Es handelt sich um Gram-positive Stäbchen oder Kokken, die weder Katalase (selten Bildung von Pseudokatalase) noch Sporen bilden, in der Regel unbeweglich und mikroaerophil oder strikt anaerob sind. Einen Überblick über die Charakteristik von Milchsäurebakterien gibt Tabelle 1 (KLEIN 1998).

Tabelle 1: Merkmale der Milchsäurebakterien (KLEIN 1998)

Kriterium	Ausprägung
Gram-Färbung	Gram-positiv
Sporenbildung	keine Sporenbildung
Wachstumsmilieu	mikroaerophil bis anaerob
Katalase	negativ
Hauptendprodukt bei der Fermentation von Kohlenhydraten	Milchsäure, daneben bei heterofermentativen Bakterien auch andere Endprodukte (z.B. Ethanol)
Habitat	Verdauungstrakt von Mensch und Tier sowie Vaginaltrakt natürlich oder künstlich fermentierte Lebens- oder Futtermittel; Pflanzen, Früchte

Die wichtigsten Genera der Milchsäurebakterien sind *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* und *Bifidobacterium*, wobei vor allem *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* und *Enterococcus* als probiotische Bakterien zum Einsatz kommen.

Bifidobakterien haben im Gegensatz zu allen anderen genannten Genera einen hohen Gehalt an Guanin und Cytosin (>50 mol %) und werden aufgrund des hohen Purin- bzw. Pyrimidinbasenanteils zu den Actinomyceten gezählt. Die anderen oben genannten Genera gehören zur Untergruppe der Clostridien (<50 mol %). Sensu stricto sind Bifidobakterien phylogenetisch keine Milchsäurebakterien, aber aufgrund ihrer Physiologie und Biochemie sowie ihrer Herkunft werden sie zu den Milchsäurebakterien gezählt (SCHLEIFER u. LUDWIG 1995).

2.1.2.1 *Lactobacillus* spp.

Taxonomisch können die Laktobazillen der Ordnung *Eubacteriales*, der Familie der *Lactobacillaceae* und dem Tribus der *Lactobacilleae* zugeordnet werden. Innerhalb dieses Tribus bilden sie das eigene Genus *Lactobacillus* Beijerinck.

ORLA-JENSEN nahm 1924 eine Einteilung des Genus *Lactobacillus* Beijerinck in drei Subgenera vor.

„*Thermobacterium*“ war gekennzeichnet durch einen homofermentativen Glukoseabbau mit dem Endprodukt Laktat, Wachstum bei 45 °C und fehlendem Wachstum bei 15 °C, ein typischer Vertreter ist die *L. acidophilus*-Gruppe.

„*Streptobacterium*“ wies ebenfalls einen homofermentativen Fermentationsweg auf, allerdings kein Wachstum bei 45 °C, dafür aber bei 15 °C. Stellvertretend hierfür sei die *L. casei*-Gruppe genannt, welche in Hinblick auf die Wachstumstemperatur allerdings eine Ausnahme bildet.

Der Subgenus „*Betabacterium*“ umfasste Bakterien mit heterofermentativer Verstoffwechselung von Glukose mit Gas- und Laktatbildung sowie einer Vielzahl anderer organischer Säuren und uneinheitlicher Wachstumstemperatur wie z.B. *L. reuteri*.

Eine Zusammenfassung über die phänotypischen und molekularbiologischen Untergruppen aus heutiger Sicht geben KLEIN et al. (1998).

Gruppe A umfasst Bakterien mit obligat homofermentativen Fermentationsweg, bei dem Pentosen nicht fermentiert werden, hierzu gehört die *L. acidophilus*-Gruppe.

Gruppe B enthält fakultativ heterofermentative Bakterien wie die *L. casei*-Gruppe.

In Gruppe C sind obligat heterofermentative Bakterien, welche Gas aus Glukose und Pentose bilden und zu denen *L. reuteri* zählt.

L. acidophilus-Gruppe

Unter der Bezeichnung „*Bacillus acidophilus*“ wurde die Spezies *L. acidophilus* erstmals 1900 von MORO beschrieben. Aufgrund der Eigenschaft des aus Säuglingsfaeces isolierten Keimes in angesäuertem Medium zu wachsen erfolgte die Benennung als „säureliebend“.

Es erfolgten vielfache taxonomische Neueinordnungen aufgrund von physiologischen Parametern wie Säuretoleranz, Säureproduktion, Wachstumstemperaturoptimum, Kohlenhydratverwertung, Zuckerzusammensetzung der Zellwände und DNA-Struktur (KULP u. RETTGER 1924, KUNDRAT 1958, LERCHE u. REUTER 1960, MITSUOKA 1969).

Die heute gültigen Einteilung erfolgte basierend auf DNA-DNA-Homologiestudien aus dem Jahr 1980 von JOHNSON et al. sowie LAUER et al. in die 6 Spezies *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* und *L. johnsonii*. Hauptsächlich werden

L. gasseri, *L. johnsonii* seltener *L. acidophilus* oder *L. crispatus* als probiotische Stämme eingesetzt (KLEIN 1998). Einen zusammenfassenden Überblick bietet Tabelle 2.

Tabelle 2: *L. acidophilus*-Gruppe; Erstbeschreibung, weitere Einordnungen und Typstämme

Spezies	Autoren	Typstämme
<i>L. acidophilus</i>	MORO (1900); HANSEN u. MOCQUOT (1970); JOHNSON et al. (1980)	ATCC 4356 ^T ; DSM 20079 ^T
<i>L. crispatus</i>	BRYGOO u. ALADAME (1953); CATO et al. (1983)	ATCC 33820 ^T ; DSM 20584 ^T
<i>L. amylovorus</i>	NAKAMURA (1981)	ATCC 33620 ^T ; DSM 20531 ^T
<i>L. gallinarum</i>	FUJISAWA et al. (1992)	ATCC 33199 ^T ; DSM 10532 ^T
<i>L. gasseri</i>	LAUER u. KANDLER (1980)	ATCC 33323 ^T ; DSM 20243 ^T
<i>L. johnsonii</i>	FUJISAWA et al. (1992)	ATCC 33200 ^T ; DSM 10533 ^T

L. casei-Gruppe

Bei der Ersteinteilung der Streptobakterien durch ORLA-JENSEN (1919) erfolgte diese in zwei Spezies: *L. casei*, auch als *Bacterium casei* oder *Casobacterium vulgare* bezeichnet, ein typisches Käsebakterium, und *L. plantarum* als typisches Pflanzenbakterium. Da diese Beschreibung sich nicht nach den Regeln des Bakteriologischen Codes richtete, erfolgte eine Neubezeichnung von HANSEN und LESSEL (1971) als *L. casei* comb. nov. mit dem Stamm ATCC 393 als Typstamm. Nach der Beschreibung von verschiedenen Subspezies (*L. casei* subsp. *casei* / *alactosus* / *pseudoplantarum* / *tolerans* / *rhamnosus*) durch ROGOSA et al. (1953) sowie ABO-ELNAGA und KANDLER (1965) erfolgte 1989 durch COLLINS et al. aufgrund von DNA-DNA-Homologiestudien eine neue Aufteilung in die drei Spezies *L. casei*, *L. paracasei* (subsp. *paracasei* und subsp. *tolerans*) und *L. rhamnosus*. Allerdings stellte sich kurz darauf durch genotypische Untersuchungen der *L. casei* -Stämme heraus,

dass diese sich nicht in ihrer Benennung mit den natürlich vorkommenden oder in probiotischen Produkten eingesetzten Stämmen in Einklang bringen ließen (DELLAGIO et al. 1991). Trotz wissenschaftlich untermauerter Daten wurde eine Revision der Benennung des Typstammes *L. casei*^T ATCC 393, der nicht mehr mit der Erstbeschreibung durch ORLA-JENSEN (1919) übereinstimmte, wegen drohender Konfusion in der Nomenklatur von der Judicial Commission des International Committee on Systematic Bacteriology abgelehnt (GOLDBERG 2002). Erst DICKS et al. (1996) erreichten eine teilweise Neuordnung, aus welcher u.a. *L. zeae*^T ATCC 15820 als Nomen revictum (ehemals zu *L. rhamnosus*) resultierte. Von großer praktischer Bedeutung sind diese Revisionsversuche infolge des weit verbreiteten Einsatzes von Stämmen der *L. casei*-Gruppe in probiotischen Produkten v.a. auf Milchbasis, aber auch in anderen Lebens- oder Arzneimitteln (VESCOVO et al. 1995). Als Probiotika kommen die Stämme *L. casei*, *L. paracasei* sowie *L. rhamnosus* zum Einsatz (KLEIN 1998).

Einen Überblick über die aktuelle Nomenklatur liefert die Tabelle 3.

Tabelle 3: *L. casei*-Gruppe, Erstbeschreibung, weitere Einordnungen und Typstämme

Spezies	Autoren	Typstämme
<i>L. casei</i>	ORLA-JENSEN (1919);	ATCC 393 ^T ; DSM 20011 ^T
	HANSEN u. LESSEL (1971)	NCIMB 11970 ^T (= NCDO 161 ^T)
<i>L. paracasei</i>	COLLINS et al. (1989)	ATCC 25302 ^T ; DSM 5622 ^T
		NCIMB 700151 ^T (= NCDO 151 ^T)
<i>L. rhamnosus</i>	HANSEN (1968);	ATCC 7469 ^T ; DSM 20021 ^T
	COLLINS et al. (1989)	NCIMB 6375 ^T (= NCDO 243 ^T)
<i>L. zeae</i>	DICKS et al. (1996)	ATCC 15820 ^T ; DSM 20178 ^T
		NCIMB 9537 ^T

Anerkannt zu *L. paracasei* wurden die beiden Subspezies *L. paracasei* subsp. *paracasei*^T (ATCC 25302^T; DSM 5622^T, NCIMB 700151^T, ehemals NCDO 151^T) und *L. paracasei* subsp. *tolerans*^T (ATCC 25599^T; DSM 20258^T, NCIMB 9709^T, ehemals NCDO 2774^T).

L. reuteri

Von BEIJERINCK wurde bereits 1901 als *L. fermenti* eine eigene Spezies beschrieben, die später nomenklatorisch korrekt als *L. fermentum* bezeichnet wurde.

Ein Stamm des zuerst von LERCHE und REUTER (1962) isolierten Biotyps von *L. fermentum* (Biotyp IIB) wurde von HANSEN (1962) als Referenzstamm definiert und bei der ATCC, später auch der DSM hinterlegt. Nach DNA-DNA-Homologiestudien wurde dieser Biotyp als neue Spezies in *L. reuteri* umbenannt (KANDLER et al. 1980).

Sowohl die Spezies *L. reuteri* als auch *L. fermentum* werden als Probiotika eingesetzt (KLEIN 1998).

Tabelle 4: *L. reuteri*-Gruppe, Erstbeschreibung, weitere Einordnungen und Typstämme

Spezies	Autoren	Typstämme
<i>L. reuteri</i>	KANDLER et al. (1980)	ATCC 23272 ^T ; DSM 20016 ^T
<i>L. fermentum</i>	BEIJERINCK (1901); DELLAGIO (2004)	ATCC 14931 ^T ; DSM 20052 ^T

2.1.2.2 *Bifidobacterium* spp.

TISSIER isolierte 1900 aus der Faeces von Neugeborenen ein Gram-positives, gespaltenes, teilweise verzweigtes Stäbchenbakterium, welches er aufgrund der Morphologie nach dem lateinischen Wort *bifidus* für zweigespalten oder geteilt *Bacillus bifidus communis* nannte.

Kurz danach integrierte ein anderer am Pasteur-Institut arbeitender Biologe, der spätere Nobelpreisträger METCHNIKOFF (1907) das entdeckte Bakterium in seine Theorie, dass ein Zusammenspiel von „guten“ Bakterien in Sauermilcherzeugnissen die allgemeine Gesundheit sowie die Lebenserwartung steigert.

Der Genus *Bifidobacterium* wurde erstmals 1924 von ORLA-JENSEN beschrieben. Danach wurden diese zu den verschiedensten Genera gezählt: *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bacterium*, *Bifidobacterium*, *Tissiera*, *Nocardia*, *Lactobacillus*, *Actinomyces* und *Corynebacterium* (MITSUOKA 1984). Als Unterscheidungs- bzw. Gleichstellungsmerkmale wurden u.a. Zellmorphologie, Zellwandkomposition, DNA-Aufbau, Katalase- und Indolaktivität, Nitratreduktion, Säuerungsvermögen und Säuretoleranz herangezogen (GASSER u.

MANDEL 1968, KANDLER 1970, POUPARD et al. 1973, STACKEBRANDT u. WOESE 1981, DESJARDINS et al. 1990).

Erst in der 8ten Ausgabe von Bergey's Manual ordnete ROGOSA (1974) die Bifidobakterien in die Familie der *Actinomycetaceae* ein. SCARDOVI (1986) stellte in der 9ten Ausgabe von Bergey's Manual diese phänotypisch und morphologisch eingehend dar und beschrieb als weitere Eigenart der von ihm in 24 Spezies unterteilten Bifidobakterien ihren Abbauweg von Kohlenhydraten, den sogenannten Fruktose-6-Phosphat-Weg, welchen er bereits 1965 mit TROVATELLI zusammen entdeckte. Dieser unterscheidet sich deutlich von den Stoffwechselwegen anderer Milchsäurebakterien, was auch DE VRIES und STOUTHAMER 1967 publizierten. Als Schlüsselenzym gilt dabei die Fructose-6-Phosphat Photoketolase, welche zur Identifizierung des Genus *Bifidobacterium* herangezogen wird.

Augenblicklich sind 29 Bifidobakterienspezies und 9 Subspezies beschrieben (siehe Tab. 5). Als wichtige Voraussetzung für den Einsatz als Probiotikum gilt unter anderem die technologische Eignung einzelner Spezies, wozu eine relative Sauerstofftoleranz, passende Temperatur- und pH-Optima zählen (siehe Kap. 2.1.6).

Nach DE VRIES und STOUTHAMER (1968) wachsen Bifidobakterien keinesfalls unter aeroben Bedingungen, variieren aber stammabhängig in ihrer Toleranz einem mikroaerophilen Klima gegenüber, so dass nicht alle Stämme als strikt anaerob anzusehen sind. Der überwiegende Teil der Bifidobakterien ist nicht in der Lage, das durch Luftsauerstoff und Kohlendioxid entstehende Wasserstoffperoxid durch Katalase zu spalten (SEBALD et al. 1965). Die weniger sauerstoffempfindlichen Stämme weisen eine geringe Restaktivität des Enzyms Katalase auf, welches Spuren von Wasserstoffperoxid auflösen kann. Der schädigende Einfluß dieser Substanz wird auf die Inaktivierung der für den Kohlenhydratstoffwechsel essentiellen, bereits oben erwähnten Fructose-6-Phosphat Photoketolase zurückgeführt.

Als Temperaturoptima werden Werte zwischen 37 °C und 43 °C angegeben, wobei Wachstum auch zwischen 25 °C und 45 °C möglich ist (SCARDOVI 1986). Der gleiche Autor beschreibt als optimalen pH-Wert eine Spanne zwischen 6,5-7,0, zögerliches oder fehlendes Wachstum ist zwischen pH 5,0-8,0 zu beobachten.

Tabelle 5: *Bifidobacterium* spp., Erstbeschreibung, weitere Einordnungen und Typstämme

Spezies	Autoren	Typstämme
<i>B. adolescentis</i>	REUTER (1963)	ATCC 15703 ^T ; DSM 20083 ^T
<i>B. angulatum</i>	SCARDOVI u. CROCIANI (1974)	ATCC 27535 ^T ; DSM 20098 ^T
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	MITSUOKA (1969); SCARDOVI u. TROVATELLI (1974); MASCO et al. (2004)	ATCC 25527 ^T ; DSM 20104 ^T
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	MEILE et al. (1997); MASCO et al. (2004)	LMG 18314 ^T ; DSM 20140 ^T
<i>B. aster-oides</i>	SCARDOVI u. TROVATELLI (1969)	ATCC 25910 ^T ; DSM 20089 ^T
<i>B. bifidum</i>	TISSIER (1900); ORLA-JENSEN (1924)	ATCC 29521 ^T ; DSM 20456 ^T
<i>B. boum</i>	SCARDOVI et al. (1979)	ATCC 27917 ^T ; DSM 20432 ^T
<i>B. breve</i>	REUTER (1963)	ATCC 15700 ^T ; DSM 20213 ^T
<i>B. catenulatum</i>	SCARDOVI u. CROCIANI (1974)	ATCC 27539 ^T ; DSM 20103 ^T
<i>B. choerinum</i>	SCARDOVI et al. (1979)	ATCC 27686 ^T ; DSM 20434 ^T
<i>B. coryneforme</i>	SCARDOVI u. TROVATELLI (1969); BIAVATI et al. (1982)	ATCC 25911 ^T ; DSM 20216 ^T
<i>B. crudilactis</i>	DELCSERIE et al. (2007)	LMG 23609 ^T
<i>B. cuniculi</i>	SCARDOVI et al. (1979)	ATCC 27916 ^T ; DSM 20435 ^T
<i>B. dentium</i>	SCARDOVI u. CROCIANI (1974)	ATCC 27534 ^T ; DSM 20436 ^T
<i>B. gallicum</i>	LAUER (1990)	ATCC 49850 ^T ; DSM 20093 ^T
<i>B. gallinarum</i>	WATABE et al. (1983)	ATCC 33777 ^T ; DSM 20670 ^T
<i>B. indicum</i>	SCARDOVI u. TROVATELLI (1969)	ATCC 25912 ^T ; DSM 20214 ^T
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	REUTER (1963); SAKATA et al. (2002)	ATCC 15707 ^T ; DSM 20219 ^T

Fortsetzung Tab. 5: *Bifidobacterium* spp., Erstbeschreibung, weitere Einordnung und Typstämme

Spezies	Autoren	Typstämme
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	REUTER (1963); SAKATA et al. (2002)	ATCC 15697 ^T ; DSM 20088 ^T
<i>B. longum</i> subsp. <i>suvis</i>	MATTEUZI et al. (1971); SAKATA et al. (2002)	ATCC 27533 ^T ; DSM 20211 ^T
<i>B. magnum</i>	SCARDOVI u. ZANI (1974)	ATCC 27540 ^T ; DSM 20222 ^T
<i>B. merycicum</i>	BIAVATI u. MATTARELLI (1991)	ATCC 49391 ^T ; DSM 6492 ^T
<i>B. minimum</i>	BIAVATI et al. (1982)	ATCC 27538 ^T ; DSM 20102 ^T
<i>B. pseudocatemulatum</i>	SCARDOVI et al. (1979)	ATCC 27919 ^T ; DSM 20438 ^T
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	SCARDOVI et al. (1969); BIAVATI et al. (1982); YAESHIMA et al. (1992)	ATCC 25865 ^T ; DSM 20092 ^T
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	MITSUOKA et al. (1969); YAESHIMA et al. (1992)	ATCC 25526 ^T ; DSM 20099 ^T
<i>B. psychraerophilum</i>	SIMPSON et al. (2004)	NCIMB 13940 ^T ; LMG 21775 ^T
<i>B. pullorum</i>	TROVATELLI et al. (1974)	ATCC 2768 ^T ; DSM 20433 ^T
<i>B. ruminantium</i>	BIAVATI u. MATTARELLI (1991)	ATCC 49390 ^T ; DSM 6489 ^T
<i>B. saeculare</i>	BIAVATI et al. (1992)	ATCC 49392 ^T ; DSM 6531 ^T
<i>B. subtile</i>	BIAVATI et al. (1982)	ATCC 27537 ^T ; DSM 20096 ^T
<i>B. thermacidophilum</i> subsp.	DONG et al. (2000); ZHU et al. (2003)	CCUG 12282 ^T
<i>thermacidophilum</i>		
<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>	ZHU et al. (2003)	LMG 21689 ^T
<i>B. thermophilum</i>	MITSUOKA (1969)	ATCC 25525 ^T ; DSM 20210 ^T

2.1.2.3 Andere Spezies

Neben den bereits erwähnten Bakterien finden auch weitere Milchsäurebakterien wie *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* Verwendung als Probiotika (KLEIN 1998). Nicht zu den probiotischen Bakterien, aber zu den Milchsäurebakterien zählen *Lactococcus (L.) lactis* und *Streptococcus (S.) thermophilus* (KLEIN 1998), die teilweise in Kombination mit probiotischen Bakterien eingesetzt und deshalb im Folgenden besprochen werden. Als Nicht-Milchsäurebakterien werden einzelne Spezies von *Escherichia (E.) coli*, aber auch *Bacillus*-Stämme (*Bacillus cereus* var. *toyoi*)- oftmals als Sporen- und Hefen wie *Saccharomyces (S.) cerevisiae boulardii* eingesetzt (HOLZAPFEL et al. 1998). Anders als die Milchsäurebakterien werden zuletzt genannte nicht in Milchprodukten, sondern vor allem als pharmazeutische Zubereitungen angeboten.

Eine Auflistung verschiedener Milchsäurebakterien sowie deren Einsatzgebiete sind in Kap. 2.1.5.1, Tab. 10 zu finden. Im Folgenden werden nur die für vorliegende Arbeit bedeutsamen weiteren Bakterienarten näher besprochen.

E. coli Nissle 1917

Die meisten *E. coli*-Spezies sind als Lebensmittelpathogene bekannt. So wird zwischen entero-pathogenen, -hämorrhagischen, -invasiven, -toxischen und -aggregativen Spezies unterschieden, wobei als bekanntester und mit den meisten Krankheitsausbrüchen assoziierter Stamm der enterohämorrhagische Stamm O157:H7 gelten kann. Die ersten mit dem Verzehr infizierter Lebensmittel in Verbindung gebrachten Ausbrüche unter Beteiligung von Serotypen mit dem H7-Antigen wurden schon 1940 beschrieben (ROBINSON et al. 2000).

Einige Stämme werden aber auch probiotisch genutzt, wie z.B. der Stamm *E. coli* Nissle 1917. Benannt wurde dieser Stamm nach seinem Entdecker Alfred NISSLE (1916), der die protektive Wirkung faekaler Bakterienstämme erkannte und an Diarrhoe erkrankte Soldaten mit *E. coli*-Präparationen behandelte. Diese hatte er von Militärpersonal isoliert, welche gegen Durchfallerkrankungen resistent erschienen. *E. coli* Nissle 1917 zählt zur Serogruppe O6:K5:H1 und besitzt aufgrund von Typ 1-, F1C-, Curli-Adhäsinen und Flagellen ein gutes Adhäsionsvermögen. Die Adhäsionsfaktoren F4- oder F6-Fimbrien fehlen (BLUM et al. 1995, HINRICHS 2005).

Ein Unterschied zu anderen *E. coli*-Stämmen ist die hohe Mutationsresistenz von *E. coli* Nissle 1917, dies stellt eine Voraussetzung für den Einsatz als Probiotikum dar.

Lactococcus lactis

Erst 1985 fassten SCHLEIFER et al. aufgrund 16s rRNA-Sequenzierung verschiedene Spezies wie *Sc. lactis*, *Sc. raffinolactis*, *L. hordniae* aus der Lancefieldgruppe N und *L. xylosum* zum Genus *Lactococcus* zusammen. Der Genus *Lactococcus* beinhaltet die fünf Spezies *Lactococcus garvieae* (ehemals *E. serolicida*), *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus raffinolactis* (ehemals *Sc. raffinolactis*) und *Lactococcus lactis*. Letztgenannter wurde in die Subspezies *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* (ehemals *L. hordniae*) sowie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (ehemals *L. xylosum*, *S. lactis*) unterteilt (CASALTA u. MONTEL 2007).

Laktokokken sind generell auf Pflanzen (*Lactococcus plantarum*) und der Haut von Tieren zu finden, so z.B. auf Lachsen (*Lactococcus piscium*). Die aus Rohmilch, Käse und anderen Milcherzeugnissen isolierten Spezies sind oftmals *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sowie subsp. *cremoris* (WILLIAMS et al. 1990, CASALTA u. MONTEL 2007). Das Temperaturoptimum der homofermentativen Bakterien liegt bei 30 °C, wobei Wachstum auch bei 10 °C möglich ist, allerdings nicht bei 45 °C sowie bei einer Salzkonzentration von 0,5 % Natriumchlorid. Bei dem fermentativen Hexoseabbau bilden sie hauptsächlich Milchsäure.

Tabelle 6: *Lactococcus* spp., Erstbeschreibung, weitere Einordnungen und Typstämme

Spezies	Autoren	Typstämme
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ORLA-JENSEN (1919), SCHLEIFER et al. (1985), SCHLEIFER u. KILLPER-BÄLZ (1987), COLLINS et al. (1989)	ATCC 19435 ^T ; DSM 20481 ^T
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	SCHLEIFER et al. (1985); SCHLEIFER u. KILLPER-BÄLZ (1987), COLLINS et al. (1989)	ATCC 19257 ^T ; DSM 20069 ^T

S. thermophilus

S. thermophilus ist mit *Lactococcus lactis* verwandt, phylogenetisch aber näher an der *S. viridans*-Gruppe angesiedelt. Die Streptokokken ohne obligat vorhandene Gruppenantigene

zeigen vergürnende oder keine Hämolyse und kommen natürlicherweise in der Mundhöhle vor. *S. thermophilus* wird außerdem von Milchprodukten und aus der Umgebung von Milcherzeugern sowie von Pflanzenmaterial isoliert (MICHAYLOVA et al. 2002).

Man unterscheidet bei den nicht beta-hämolysierenden Streptokokken die Gruppen: *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. anginosus*, *S. bovis* und *S. salivarius* (SHERMAN 1937), wobei zuletzt genannte Gruppe die Spezies *S. salivarius*, *S. vestibularis* und *S. thermophilus* beinhaltet (FACKLAM 2002). Neben den Kommensalen und opportunistisch pathogenen Streptokokken ist *S. thermophilus* die einzige in Lebensmitteln eingesetzte Spezies und besitzt den GRAS (generally-recognized-as-safe)-Status (DELORME 2007). Nachdem *S. thermophilus* lange Jahre als Subspezies zu *S. salivarius* geführt wurde (SHERMAN 1937, FARROW u. COLLINS 1984) beschrieben SCHLEIFER et al. (1991) aufgrund von DNA-Studien *S. thermophilus* als eine eigenständige Spezies. Das thermophile Milchsäurebakterium wird im großen Umfang als Starterkultur in der Milchwirtschaft eingesetzt und gilt als zweitwichtigste Starterkultur nach *Lactococcus lactis* (HOLS et al. 2005). Nachdem Eigenschaften wie anaerobes oder aerotolerantes Wachstum oberhalb von 10 °C und unterhalb von pH 9,6 sowie bei einer Natriumchloridkonzentration <6,5 % kennzeichnend für das Genus *Streptococcus* ist, findet eine Identifizierung von *S. thermophilus* über Hydrolyse von Arginin, Äsculin und Säurebildung bei der Fermentation von Inulin, Cellobiose, Amygdalin, Maltose, N-Acetylglucosamin sowie Wachstum bei 45 °C statt (MOSCHETTI et al. 1998, FACKLAM 2002).

2.1.3 Natürliches Vorkommen

Probiotische Bakterien sind fast ubiquitär anzutreffen. Physiologischer Weise kommen sie im Intestinaltrakt von Mensch und Tier vor, wo sie maßgeblich zur Aufrechterhaltung des mikroökologischen Gleichgewichtes beitragen.

Der bei der Geburt sterile Darmtrakt wird erst post-partum von Mikroorganismen besiedelt, wobei sowohl der Geburtsvorgang (Normalgeburt vs. Sectio caesarea, CHEN et al. 2007) als auch die folgende Ernährung Einfluss auf die Zusammensetzung der juvenilen Intestinalflora haben. So sind bei gestillten Kleinkindern vor allem *Bifidobacterium* spp. zu finden, während bei flaschengefütterten Neonaten *L. acidophilus* überwiegt. In 70 % aller Stuhlproben von

gestillten Säuglingen ist *B. bifidum* zu finden, während bei flaschengefütterten Individuen der Anteil bei nur 23 % liegt (MITSUOKA 1984).

Die humane Darmflora Adulter besteht aus 400-500 verschiedenen Spezies und Subspezies, die gemeinsam eine Keimzahl von etwa 10^{14} ausmachen. Mit 10^{10} - 10^{12} KBE/g ist der überwiegende Teil der Mikroorganismen im Colon angesiedelt, wo nichtsporenbildende anaerobe Vertreter der Gattung *Bacteroides*, *Bifidobacterium* und *Eubacterium* dominieren (GIBSON u. MACFARLANE 1995). Laktobazillen machen im Gegensatz dazu im Colon nur 0,1-1 % aus, während sie in Magen, Jejunum und Ileum die vorherrschende Bakterienspezies bilden. *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. reuteri* sowie *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum* und *B. breve* sind als originäre Darmbewohner anzusehen (LERCHE u. REUTER 1962). Neben dieser autochthonen Bakterienflora sind passagere Bakterien wie Laktobazillen und Bifidobakterien zu nennen, die sich nach der Aufnahme über die Nahrung vorübergehend in großer Zahl an der Mukosa des Verdauungstraktes anheften können. Hierzu zählen *L. plantarum*, *L. casei* und *L. fermentum* (REUTER 1965, HAMMES et al. 1992). Die meisten Laktobazillen und Bifidobakterien gehören nicht nur zur autochthonen Mikroflora des humanen Intestinaltraktes und der Vagina, sondern sind darüber hinaus ebenfalls im Verdauungstrakt der meisten Nutztiere physiologischerweise anzutreffen.

Bei den natürlicherweise in Fleisch- und Fleischwaren wie z.B. Rohwurst vorkommenden *Lactobacillus* spp. handelt es sich bei der dominierenden Flora zum überwiegenden Teil um atypische Streptobakterien (REUTER 1967) wie *L. sakei* und *L. curvatus*, welche positive technologische Eigenschaften besitzen. Streptobakterien sind auch in Pökellake und Schinken, frischem Fleisch, Brüh- und Kochwürsten zu finden, wobei sie in zuletzt genannten Produkten für Verderbniserscheinungen verantwortlich sind.

In Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs wie Sauergemüse (z.B. Saure Gurken, Sauerkraut) kommen vorwiegend *L. brevis*, häufig *L. plantarum* und selten *L. buchneri* sowie vereinzelt *L. fermentum* vor (REUTER 1965).

2.1.4 Wirkungsmechanismen

Eine positive, „probiotische“ Wirkung von Bakterien sowohl in Lebens- als auch Arzneimitteln ist schon lange bekannt. So werden fermentierte Milchprodukte sowie Zubereitungen aus Fäkalkeimen seit Jahrhunderten in der traditionellen Medizin eingesetzt

(ROLFE 2000, GÖRKE u. LIEBLER-TENORIO 2001). Obgleich seit Jahren intensiv geforscht wird, auf welche Weise probiotische Mikroorganismen auf ihren Wirtsorganismus wirken, sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht abschließend geklärt.

Wechselwirkungen mit anderen Keimen

1907 untersuchte Elias METCHNIKOFF erstmals wissenschaftlich den positiven Effekt von Sauermilch auf den menschlichen Organismus. Hinter der hohen Lebenserwartung der bulgarischen Landbevölkerung vermutete er den Einfluß von Milchsäurebakterien. Er benannte ein von ihm aus Kefir isoliertes Bakterium als „*Bacillus bulgaricus*“ (heute: *L. acidophilus*, SIMON et al. 2001) und schrieb diesem als „guten“ Keim die Fähigkeit zu, „schädliche“ Keime aus dem Darmtrakt zu verdrängen (FULLER 1991).

Bereits in den 70er Jahren untersuchten RANTALA und NURMI (1973) frisch geschlüpfte Küken, bei denen es nach Verabreichung intestinaler Bakterienkulturen adulter Tiere zu einer schnelleren Ausreifung und Stabilisierung der sich entwickelten Darmflora kam und für einen begrenzten Zeitraum eine Besiedelung mit Salmonellen verhindert wurde. Unter dem Begriff der „kompetativen Verdrängung“ wurden dabei drei Wirkungsmechanismen zusammengefasst:

- Konkurrenz um Nährstoffe
- Konkurrenz um Anheftungszellen an der Darmschleimhaut
- Produktion antibakterieller Substanzen wie flüchtige Fettsäuren und Bakteriozine

FULLER (1989) ergänzt diese Auflistung noch um Immunstimulierung und den Eingriff in die Stoffwechselleistung anderer Bakterien.

Sowohl pathogene als auch probiotische Mikroorganismen sind im Darm auf Nährsubstrate angewiesen, um Wachstum und Aktivität zeigen zu können. Der Einsatz von Probiotika soll nun eine Konkurrenz zwischen den verschiedenen Keimarten hervorrufen, wodurch den schädlichen Keimen Nährstoffe entzogen werden sollen (FOX 1989, FULLER 1989, ROLFE 2000).

Nach oraler Verabreichung von Probiotika stabilisieren diese die Darmflora, indem sie durch Stoffwechselaktivitäten ein für die pathogenen Mikroorganismen ungünstiges Milieu schaffen (NOGOSSEK 2001). So führt die Produktion von Laktat und anderen organischen Säuren zu

einer pH-Wert-Senkung, welche der Vermehrung und Toxinbildung pathogener Keime wie z.B. *E. coli* entgegenwirkt (AUDISIO et al. 1999, COLLINS u. GIBSON 1999).

Großen Einfluß auf die Scheidengesundheit und die Abwehr von pathogenen Mikroorganismen nimmt die Zusammensetzung der Vaginalflora, erstmals von DÖDERLEIN (1892) als *Bacillus vaginalis* beschrieben. Diese Mischflora enthält unter anderem Laktobazillenstämme, die über die Synthese von Wasserstoffperoxid andere Mikroorganismen in ihrer Ausbreitung eindämmen können (RENONDO-LOPEZ et al 1990). Einige Stoffwechselprodukte von Milchsäurebakterien und deren antimikrobielles Potential sind in Tabelle 7 aufgelistet (ROBINSON et al. 2000). Auch VANDENBERGH (1993) beschreibt den Einsatz von Milchsäurebakterien in Lebensmitteln, um durch deren Stoffwechselprodukte das Wachstum unerwünschter Bakterien zu verhindern.

Tabelle 7: Antimikrobielle Eigenschaften von Milchsäurebakterien (ROBINSON et al. 2000)

Produkt	Hauptzielorganismus
Milchsäure/Laktat	Fäulnis- und Gram-negative Bakterien, einige Pilze
Essigsäure/Azetat	Fäulniserreger, Clostridien, einige Hefen und Pilze
Wasserstoffperoxid	Pathogene und Verderbniserreger, besonders in proteinreichen Nahrungsmitteln
Laktoperoxidase	Pathogene und Verderbniserreger (Milch und Milchprodukte)
Diazetyl	Gram-negative Bakterien
Bakteriozide → Nisin	Sporenbildende Gram-positive Bakterien

BERNET et al. (1994) zeigten bei dem humanen *L. acidophilus*-Stamm LA1 *in vitro* die calciumabhängige Fähigkeit zur Adhäsion an menschlichen Enterozyten wie Caco-2-Zellen, wodurch sowohl das Anlagern von enteropathogenen *E. coli* und *Salmonella typhimurium* als auch die Invasion der genannten Keime sowie *Yersinia pseudotuberculosis* inhibiert werden konnte. Effektiv war vor allem die gleichzeitige oder vorgezogene Verabreichung von *L. acidophilus*, während die nachträgliche Gabe von *L. acidophilus* kaum Wirkung zeigte.

BERNET-CAMARD et al. (1997) zeigten, dass sich die oben beschriebenen Mechanismen auch *in vivo* beobachten lassen, indem sie Mäusen *L. acidophilus* LA1 verabreichten und dann mit *Salmonella typhimurium* infizierten. 100 % der Kontrollgruppe verstarb binnen 10

Tagen, während die mit Probiotika gefütterte Gruppe bis zu 30 Tagen überlebte. *In vitro* beobachtete die Arbeitsgruppe einen antimikrobiellen Effekt von *L. acidophilus* LA1 auch gegen Pathogene wie *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter cloacae*. Die Arbeitsgruppe hielt sowohl eine bislang unbekannte antibiotisch wirkende Substanz als auch eine kompetitive Verdrängung für möglich.

JUNTUNEN et al. (2001) sahen in der Kombination von Stämmen wie *B. lactis* BB 12 und *L. rhamnosus* GG, welche sich in ihren Hafteigenschaften unabhängig vom Vorliegen einer Durchfallerkrankung spezifisch verstärken, eine Möglichkeit der Prävention von Rota-Virus-Diarrhoen.

Die orale Gabe von *B. lactis* BB12 zeigte bei Neugeborenen mit atopischen Ekzem in einer randomisierten Studie eine Abnahme von *E. coli* im Stuhl und des Serum- IgE-Spiegels, woraus KIRJAVAINEN et al. (2002) schlussfolgerten, dass durch die Gabe von *B. lactis* BB12 eine Modifizierung der Darmflora und Linderung der allergischen Inflammation erfolgen kann.

Direkte Wirtsbeeinflussung

Neben physikalischen und nicht-immunologischen Abwehrmechanismen bestehen die unspezifische oder konstitutionelle Immunität mit Komplement, Lysozym, Interferonen, Phagozyten und natürlichen Killerzellen sowie die spezifische bzw. erworbene Immunität mit spezifischen Antikörpern, Immunglobulinen, Lymphozyten, Makrophagen und zellvermittelter Immunabwehr zum Schutz des Organismus.

Besonders Milchsäurebakterien beeinflussen das Immunsystem (GAUFFIN CANO u. PERDIGON 2003). Eine Übersicht über gesicherte und potentielle immunmodulatorische Wirkungen gibt Tabelle 8. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind allerdings noch unklar (ERICKSON u. HUBBARD 2000). Ferner sind immunmodulatorische Wirkungen stammspezifisch, so dass keine Rückschlüsse auf gesamte Bakterienspezies gezogen werden sollten (RECHKEMMER 2000). Auch können Starterkulturen und andere Nahrungsbestandteile ebenfalls immunmodulierend wirken (DE VRESE u. SCHREZENMEIR 2000). Da probiotische Bakterien im Gegensatz zu pathogenen Keimen nicht in die Zellen des Darmepithels eindringen können, man aber innerhalb der Zellen kleine

antigene Bakterienpartikel nachweisen konnte, vermuten GALDEANO und PERIGON (2004), dass nur diese Bestandteile direkt mit den Immunzellen interagieren. KNEIFEL (2005) geht davon aus, dass nicht nur aktive, vitale Mikroorganismen, sondern auch deren einzelne Bestandteile immunologische Effekte hervorrufen.

Tabelle 8: Immunmodulatorische Effekte von Probiotika (nach DE VRESE u. SCHREZENMEIR 2000)

Beeinflussung von Parametern der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr:	Genera bzw. Spezies, denen diese Eigenschaften zugeschrieben werden¹⁾
• Anregung der Zellteilung in Organen des Lymphsystems	• <i>Bifidobacterium</i> sp., <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> Shirota
• Steigerung der Aktivität von Phagozyten/ Makrophagen und/oder Lymphozyten und/oder natürlichen Killerzellen	• <i>B. bifidum</i> , <i>B. lactis</i> HNO19, <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG
• Anregung der Produktion spezifischer und unspezifischer Immunglobuline	• <i>B. breve</i> , <i>B. lactis</i> BB12, <i>B. longum</i> , <i>Bifidobacterium</i> sp., <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG
• Freisetzung von nicht pro-inflammatorischen Zytokinen, Interleukinen, Interferonen und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α	• <i>B. lactis</i> HNO19, <i>L. acidophilus</i> LAFTI L10, <i>L. casei</i> , <i>L. casei</i> Shirota, <i>L. paracasei</i> LAFTI L26
• Senkung der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (IL-5, IL-6, IFN- γ)	• <i>E. coli</i> Nissle 1917, <i>L. rhamnosus</i> GG
Beeinflussung von Immunantworten auf verschiedene Antigene:	
• Anregung der Produktion spez. Antikörper (IgA, IgG) gegen mitverabreichte Viren, Bakterien und Bakterientoxine	• <i>B. breve</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG,

Fortsetzung Tab. 8: Immunmodulatorische Effekte von Probiotika

- Erhöhte Widerstandskraft und – im • *L. acidophilus* LA1, *L. casei*,
Tierversuch- längeres Überleben bei viralen *L. rhamnosus* GG
und bakteriellen Infektionen

- Möglicher Einsatz als Adjuvans bei Impfungen • *B. breve*, *L. acidophilus*, *L. casei*,
L. casei Shirota, *L. fermentum*,
L. plantarum, *L. rhamnosus* GG

- Förderung der Entwicklung von oraler • *B. lactis* BB12, *L. rhamnosus* GG
Toleranz; Abschwächung allergischer
Reaktionen

Wirkungen bei verschiedenen Erkrankungen:

- Weniger Dickdarmentzündungen und • *B. lactis* HNO19
gesteigerte Immunität bei Älteren

- Geringere Anfälligkeit gegen Vaginosen und • *L. acidophilus*, *L. casei*,
Candida-Infektionen *L. fermentum*, *L. rhamnosus*

- Weniger und spätere Rückfälle bei operativ • *L. casei* Shirota
entferntem Harnblasenkrebs

- Bei Atopikern keine Verschlechterung • *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GG
immunologischer Reaktionen durch
Joghurtverzehr

- Weniger klinische Symptome und erniedrigtes • *B. lactis* BB12, *L. reuteri*,
TNF- α bei Kindern mit atopischer Dermatitis *L. rhamnosus* GG

¹⁾ Literatur zusammengestellt aus: ASO 1995, ARUNACHALAM et al. 2000, GILL et al. 2001, SCHULTZ et al. 2004, BRUCE et al. 1992, CHIN et al. 2000, HILTON et al. 1992, TAKAHASHI et al. 1993, YASUI et al. 1994, BERNET-CAMARD et al. 1997, KALLIOMÄKI et al. 2001, 2003, KAILA et al. 1992, KIRJAVAINEN et al. 2002, LINK-AMSTER et al. 1994, MATSUZAKI 1998, MATSUZAKI u. CHIN 2000, PERDIGON et al. 1991, PERDIGON et al. 1995, PATURI et al. 2007, PELTO et al. 1998, PESTKA et al. 2001, POUWELS et al. 1998, MAJAMAA u. ISOLAURI 1997, MEYER et al. 2007, MONTES et al. 1995, NADER DE MACIAS et al. 1992, GAUFFIN CANO u. PERDIGON 2003, ROSENFELDT et al. 2003, SCHIFFRIN et al. 1995

Andere Stoffwechselprodukte wie Enzyme sollen der Bildung von Tumoren entgegenwirken (FULLER 1989, GOLDIN 1998, ROLFE 2000). REDDY (1998) beobachtete bei Ratten, denen ein karzinogenes Amin verfüttert wurde und die gleichzeitig lyophilisierte *B. longum*-Kulturen erhielten, eine signifikante Abnahme der Darmtumoren. Bei oraler Verabreichung von *L. casei* beobachteten PERDIGON et al. (1995) eine Zunahme der IgA-Antikörper, T-Zellen und Makrophagen, welche das Wachstum von intestinalen Tumoren verhinderten.

SCHULTZ et al. (2004) konnten nachweisen, dass nur bei Mäusen mit chronischer Colitis, aber nicht bei der gesunden Kontrollgruppe eine Durchwanderung von sowohl residenten als auch probiotischen *E. coli*-Stämmen in die mesenterialen Lymphknoten stattfand.

Anhand von intestinalen Human- und Mäuseepithelzellen konnten UKENA et al. (2005) *in vitro* nach Zugabe von *E. coli* Nissle 1917 eine Zunahme der Expression von spezifischen proinflammatorischen Genen und Proteinen nachweisen.

Nach oraler Verabreichung von *L. acidophilus* LAFTI L10 und *L. paracasei* LAFTI L26 konnte eine Zunahme von Cytokinen wie IL-10 und IFN- α und deren produzierende Zellen, sowie Ig-A produzierenden Zellen gemessen werden. PATURI et al. (2007) schlossen daraus, dass die beiden Bakterienstämme die darmspezifische und die systemische Immunantwort bei Mäusen steigern können.

Nach der Gabe von *B. lactis* an ältere Personen konnten GILL et al. (2001) einen Anstieg von CD4⁺ T-Helferzellen, CD25⁺ T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen in Blut feststellen, so dass sie die Verabreichung des Stammes als Möglichkeit zur Förderung einiger Aspekte des Immunsystems bei Älteren sahen.

PESTKA et al. (2001) konnten bei Mäusen nach Verfütterung eines Joghurts mit Bifidobakterien und *L. acidophilus* einen signifikanten Anstieg der CD4⁺ T-Helferzellen in der Milz feststellen, allerdings nicht in den Peyerschen Platten. Joghurts ohne probiotische Bakterien wiesen diesen Effekt nicht auf, auch konnte keine Veränderung des Gehaltes an zytotoxischen CD8⁺ Zellen oder B-Zellen festgestellt werden.

Nach Gabe von einem Joghurt mit *L. delbrueckii* und *S. thermophilus*, dem für die Verum-Gruppe noch der probiotische Stamm *L. casei* zugesetzt war, konnten MEYER et al. (2007) für beide Gruppen eine signifikante Zunahme von Zytokinen messen.

COMMANE et al. (2005) kommen in einem Review-Artikel zu dem Schluss, dass einige probiotische Bakterien stammspezifisch die Eigenschaft besitzen, antikanzerogen zu wirken, wobei die Mechanismen noch schwer erklärbar sind.

Tabelle 9 zeigt in einer Zusammenstellung nach GERLACH (2007) postulierte antimutagene und antikanzerogene Wirkmechanismen.

Tabelle 9: Postulierte antimutagene/antikanzerogene Wirkmechanismen (GERLACH 2007)

-
- Wachstumshemmung intestinaler Keime, die mutmaßliche Karzinogene und Promotoren bilden
 - Bindung/Hemmung potentieller Karzinogene
 - Produktion von Antitumor- oder antimutagenen Verbindungen im Kolon
 - Modifikation physikalischer Bedingungen im Kolon (z.B. pH-Wert)
 - Beeinflussung der metabolischen Aktivität der Darmflora (z.B. Enzymhemmung)
 - Beeinflussung der Wirkung von Gallensäuren (z.B. durch Ausfällung, Akkumulation)
 - Quantitative u./o. qualitative Veränderungen der Gallensäure-abbauenden Bakterien
 - Förderung der Immunantwort des Wirtsorganismus
-

2.1.5 Anwendungsgebiete

2.1.5.1 Lebensmittel und Futtermittel

In fermentierten Lebens- und Futtermitteln werden Mikroorganismen wie Milchsäurebakterien aus verschiedenen Gründen eingesetzt. Dazu zählen Geschmacksbildung und Texturgebung, Steigerung des Nährwertes, Vernichtung unerwünschter Komponenten, Steigerung der Verdaulichkeit und Haltbarmachung der Lebensmittel ebenso wie der Nutzen probiotischer Effekte.

Starterkulturen werden eingesetzt, um einen Reifungsprozess zu ermöglichen, anzustoßen oder zu beschleunigen. Einige Starterkulturen können zudem noch Lebensmittel vor ungünstigen Umwelteinflüssen oder Kontamination bewahren.

Tabelle 10: Wichtige wirtschaftlich genutzte Genera und Stämme der Milchsäurebakterien und ihre Anwendungsgebiete (modifiziert nach KLEIN 1998)

Genus	Spezies	Anwendung ¹⁾				
		P	S	M	F	H
<i>Lactobacillus</i>	<u><i>L. acidophilus</i>-Gruppe :</u> (<i>L. acidophilus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. johnsonii</i>)	•	•	•		•
	<u><i>L. casei</i>-Gruppe :</u> (<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>)	•	•	•		•
	<i>L. reuteri</i> / <i>L. fermentum</i>	•	•	•	•	•
	<i>L. sakei</i> / <i>L. curvatus</i>				•	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. breve</i>	•	•	•		•
<i>Enterococcus</i>	<i>Ec. faecium</i> , <i>Ec. faecalis</i>	•	•	•		•
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		•	•		
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. dammosus</i> ,		•		•	
	<i>P. pentosaceus</i>					
<i>Leuconostoc</i>	<i>Lc. mesenteroides</i> , <i>Lc. lactis</i>		•	•		
<i>Streptococcus</i>	<i>Sc. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>		•	•		
<i>Carnobacterium</i>	<i>C. piscicola</i>		•			

¹⁾ = hauptsächlichlicher Anwendungsbereich F = Fleischtechnologie H = Humanmedizin
M = Milchtechnologie P = Probiotikum S = Starterkultur

Probiotische Bakterien werden in der humanen Ernährung meist in Milchprodukte wie Joghurts, fermentierte Getränke aber auch Käse eingebracht. Hier sind vom Genus *Bifidobacterium* v.a. *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* und *B. animalis* von Bedeutung (ANONYM 1999c), während vom Genus *Lactobacillus* vor allem die *L. acidophilus*-, *L. casei*- und *L. reuteri*- Gruppe eingesetzt werden (KLEIN 1998). Einen Überblick über die Anwendungsgebiete der wichtigen wirtschaftlich genutzten Genera und Stämme bietet Tabelle 10.

Für den bevorzugten Einsatz in Milchprodukten gibt es verschiedene Gründe (HELLER 2001):

- Fermentierte Milchprodukte wie Joghurt haben gemeinhin den Ruf, gesundheitsförderlich zu sein
- Konsumenten sind mit der Tatsache vertraut, dass fermentierte Lebensmittel lebende Bakterien enthalten
- Probiotische Bakterien als fermentierende Mikroorganismen kombinieren das positive Ansehen von probiotischen und fermentierenden Bakterien
- Das Ansehen joghurtähnlicher Produkte als gesundes Nahrungsmittel erleichtern die Empfehlung des täglichen Verzehr von Probiotika

Probiotische Bakterien werden aber ebenfalls in Rohwürsten, Schokolade, Kaugummi, Fruchtsäften, Müsli und Eis verarbeitet.

Hier sollten sie, um im menschlichen Organismus physiologische Leistung erbringen zu können, im Produkt in einer Konzentration von 10^6 KBE/ml bzw. g beinhaltet sein, die tägliche Dosis sollte bei 10^8 - 10^9 KBE/ml bzw. g liegen (ANONYM 1999a).

Das Überleben und die spätere Aktivität von probiotischen Bakterien hängen von verschiedenen Faktoren ab. Abhängig vom physiologischen Status scheinen Bakterien während der logarithmischen Vermehrungsphase stressanfälliger als während der stationären Phase zu sein (KOLTER et al. 1993). Physikalische Lagerungsbedingungen nehmen Einfluss, so wirkt sich eine kühle Umgebungstemperatur positiv auf das Überleben der probiotischen Bakterien aus (SHAH et al. 1995, DAVE u. SHAH 1997). Chemische Eigenschaften des Produktes wie pH-Wert, Sauerstoff- und Kohlenhydratgehalt nehmen ebenso wie mögliche Interaktionen mit Starterkulturen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit und das Wirkungspotential der probiotischen Bakterien (RADKE-MITCHELL u. SANDINE 1986, PEREZ et al. 1991).

Milchprodukte

Klassischer Joghurt wird per definitionem durch den Starterkultureneinsatz von *S. thermophilus*, und *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* hergestellt, welche sich gegenseitig im Wachstum fördern, was innerhalb weniger Stunden zu einer pH-Wert Absenkung unter 4,0 führt. Ein Initialwachstum von *S. thermophilus* in Milch bildet die ersten Wachstumsreize für *L. bulgaricus*, welcher seinerseits Proteolysate sezerniert, die das Streptokokkenwachstum fördern. Milder Joghurt enthält ebenfalls *S. thermophilus*, aber als Laktobazillus-Spezies zumeist *L. acidophilus*, so dass die Säuerung etwa 6-8 Stunden dauert und der pH-Wert des Produktes meist höher als 4,0 ist.

Der beste Zeitpunkt für den Zusatz von probiotischen Bakterien für Joghurtprodukte ist nach dem Rühren oder vor dem Verpacken, wobei der Zusatz bei stichfestem Joghurt bereits vor der Fermentation erfolgen muss, um die produkttypische Textur zu bewahren. Bei mildem Joghurt können probiotische Bakterien auch als Starterkulturen genutzt werden, allerdings ist die Herstellung ein Kompromiss zwischen der vollen Entfaltung des probiotischen Potentials und der technologischen Eignung der Bakterien. In der Frischkäseherstellung behindert der Prozess des Brennens, also des Erhitzen der Gallerte, den frühen Einsatz von probiotischen Bakterien, da die Überlebensfähigkeit bei Temperaturen von ≥ 50 °C fraglich ist. Ferner würde durch die Trennung von Molke und Käsebruch ein unkalkulierbarer Verlust von probiotischen Bakterien auftreten, so dass keine Mindestanzahl garantiert werden kann. Besser ist die nachträgliche Zugabe zum Koagulum mit der Sahne. In gereiften Käse werden kaum probiotische Stämme eingebracht, da wegen der langen Reifungszeit einerseits die Überlebensfähigkeit der Bakterien, andererseits die Beeinflussung ihrer Funktionalität bisher nicht ausreichend geklärt ist (HELLER 2001, HELLER et al. 2004).

Fleischprodukte

Milchsäurebakterien wie Laktobazillen und Pediokokken, aber auch ausgesuchte Hefen, Schimmelpilze und Staphylokokken werden als Starter- und Schutzkulturen zur Herstellung und Reifung von Fleischwaren eingesetzt. Genutzte technologische Eigenschaften sind z.B. Laktatbildung und daraus resultierende pH-Wert-Absenkung sowie die antagonistische Wirkung gegen unerwünschte Begleitflora. Vor allem bei der Herstellung von Rohwürsten

nutzt man die schnellere Nitratreduzierung und –abbau als Folge des raschen niedrigen pH-Wertes (CORETTI 1977).

Anders als bei Milchprodukten wurde bisher wenig auf das probiotische Potential von Fleischwaren geachtet (ARIHARA 2004).

TYÖPPÖNEN et al. (2003) sind der Ansicht, dass in Fleischprodukten Milchsäurebakterien sowohl als bioprotektive Kulturen und fermentierte Substanzen als auch als Probiotika eingesetzt werden können.

2.1.5.2 Pharmazeutische Präparate

Als pharmazeutische Präparate werden probiotische Bakterien in galenischer Formulierung als Tütchen oder Kapseln mit lyophilisiertem Bakterienpulver, gepressten Tabletten, wässrige oder ölige Lösungen mit lebenden Bakterien oder deren Bestandteilen sowie Vaginalzäpfchen vertrieben.

Probiotische Therapeutika werden bei durch Antibiotikatherapie oder durch pathogene Mikroorganismen bedingten Entgleisungen der gastrontestinalen Mikroflora ebenso eingesetzt wie zur Behebung einer Dysbakteriose der Vagina oder der Stimulation des Immunsystems (TUOHY et al. 2003, SARTOR 2004, SCHULTZ et al. 2004, PODGORSKII et al. 2006).

Als Voraussetzung für den therapeutischen Einsatz ist die Auswahl geeigneter Präparate und eine entsprechende Dosierung zu sehen sowie die laufende bakteriologische Kontrolle bei Drogen mit lebensfähigen Bakterienarten (REUTER 1969).

2.1.6 Anforderungen

Für den Einsatz von probiotischen Bakterien gibt es verschiedene Auswahlkriterien. Grundsätzlich darf keine Toxizität oder Pathogenität bestehen, vielmehr sollen gesundheitsbegünstigende Leistungen messbar sein. Gleichzeitig muss sich der Stamm für eine technologische Massenproduktion eignen, seine erwünschten Eigenschaften müssen während der Kultivierung und Lagerung bis zum Verzehr stabil sein und es darf keine Beeinträchtigung des Lebensmittels stattfinden (KULLEN u. KLAENHAMMER 2000). Einen Überblick über die Auswahlkriterien bietet die folgende Tabelle 11.

Tabelle 11: Auswahlkriterien für den Einsatz probiotischer Stämme in Lebensmitteln (nach ANONYM 1999a, KULLEN u. KLAENHAMMER 2000, GOLDBERG 2002)

Grundsätzliche Kriterien:

- Korrekte taxonomische Identifizierung
- Spezies muss physiologisch beim Zielorganismus vorkommen
- Keine Toxizität und Pathogenität (GRAS-Status)
- Genetische Stabilität

Kriterien, die einer Unbedenklichkeitsüberprüfung bedürfen:

- Bildung von biogenen Aminen (insbes. Tyramin, Histamin, Phenylethylamin)
- Aktivierung von Prokanzerogenen (mit Hilfe von Azoreduktase, Nitroreduktase, β -Glucuronidase)
- Induktion bzw. Abbau von Thromben mit Hilfe spezifischer Hydrolasen
- Aktivierung der Thrombozytenaggregation
- Bindung an Fibrinogen und Fibronectin
- Mucinabbau (wurde in bestimmten Bifidobakterien nachgewiesen und kann als Voraussetzung für eine Invasionstätigkeit der Mikroorganismen gewertet werden)
- Hämolytische Aktivität
- Übertragbare Antibiotikaresistenzen

Technologische Eigenschaften:

- Zur Massenproduktion und -lagerung geeignet (geeignetes Wachstumsverhalten)
- Lebensfähigkeit in großen Populationen
- Stabilität gewünschter Eigenschaften während Kultivierung, Lagerung und Auslieferung
- Erzeugung erwünschter organoleptischer Qualitäten (bzw. keine unerwünschten Qualitäten) nach Einbringen in Lebensmittel bzw. in Fermentationsprozesse

Kompetitive Fähigkeiten (Konkurrenzfähigkeit):

- Gallensaft- und Säureresistenz
 - Fähigkeit am Zielort zu überleben, sich zu vermehren und metabolische Leistung zu erbringen
 - Vorzugsweise Adhärenz- und Kolonisierungsfähigkeit
 - Durchsetzungsfähigkeit gegen die normale Mikroflora und gegen Vertreter der eigenen oder ähnlichen Spezies, potentielle Resistenz gegen Bakteriozine, Säuren und andere von der residenten Mikroflora gebildeten antimikrobiellen Substanzen
-

Fortsetzung Tab. 11: Auswahlkriterien für den Einsatz probiotischer Stämme in Lebensmitteln

Leistung/Wirkung/Funktionalität:

- Fähigkeit, eine oder mehrere klinisch dokumentierte gesundheitsbegünstigende Leistungen zu erbringen („health benefit“)
 - Antagonismus gegen pathogene/toxinogene Bakterien
 - Produktion antimikrobiell wirksamer Substanzen (Bakteriozine, H₂O₂, organische Säuren)
 - Immunstimulation, anti-mutagene und anti-karzinogene Wirkung
 - Bildung bioaktiver Komponenten (Enzyme, Peptide)
-

Die Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) und die World Health Organization (WHO) (ANONYM 2002a) fordern zusätzlich eine Hinterlegung der Stämme bei einer internationalen Stammsammlung, funktionale Charakterisierung und Sicherheitsprüfung durch *in vitro*-Tests und Tierversuche. In humanen Studien (doppelblind, randomisiert, placebo-kontrolliert) soll die Wirksamkeit belegt und die Versuchsergebnisse reproduziert werden. Weiter werden detaillierte Verpackungsangaben über den verwendeten Stamm, die Mindestkonzentration am Ende des Mindesthaltbarkeitsdatums, Lagerungshinweise sowie eine Kontaktadresse für Fragen gefordert.

Potentielle Pathogenität

Für Laktobazillen und Bifidobakterien gilt der GRAS (generally-recognized-as-safe)-Status (SALMINEN et al. 1999), d.h. durch den teilweise jahrhundertelangen Einsatz dieser Mikroorganismen in der Lebensmittelherstellung kann von ihrer Unbedenklichkeit ausgegangen werden (DE VRESE u. SCHREZENMEIR 2000). Darüber hinaus fordert die Arbeitsgruppe „Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln“ des BgVV (jetzt: BfR, 1999) eine Beurteilung nach „sicher“ und „nicht sicher“ auf Stamm- und nicht auf Speziesebene (ANONYM 1999a).

In einem gesunden Organismus stellen zudem die intakten Schleimhäute des Verdauungstraktes eine für Milchsäurebakterien unüberwindbare Barriere dar. So ist eine durch Nahrungsaufnahme hervorgerufene Infektion nach dem gegenwärtigen Stand der Technik nicht möglich (ADAMS u. MARTEAU 1995). BORRIELLO et al. (2003) setzten das Risiko einer Infektion mit probiotischen Bifidobakterien oder Laktobazillen dem einer

Infektion mit kommensalen Bakterien gleich und sehen den Verzehr von probiotischen Produkten als unbedeutendes Risiko, auch für den immunsupprimierten Verbraucher.

Gesetzlich wird der Umgang mit Mikroorganismen durch die Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA 466) (ANONYM 2006b) und die Biostoffverordnung (ANONYM 1999b) geregelt. In Paragraph 3 der Biostoffverordnung werden vier Risikogruppen für Biologisches Arbeiten unterschieden (1. kein Risiko, 2. geringes Risiko, 3. mäßiges Risiko, 4. hohes Risiko). Die TRBA 466 enthält eine Auflistung und Einteilung aller Bakterien nach diesen Risikogruppen. Die Genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* und *Lactococcus* sind bis auf wenige Ausnahmen in die Risikogruppe 1 eingeordnet. Die Spezies *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. scardovi*, *B. inopatum* sowie *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. vaginalis* und *Lactococcus. lactis* subsp. *lactis* sind zusätzlich mit einem Stern versehen, d.h. sie sind in Einzelfällen als Krankheitserreger nachgewiesen oder vermutet. Allerdings waren die Betroffenen Personen, bei denen für eine Infektion prädisponierende Faktoren wie höheres Lebensalter, Immunsuppression, eine schwere Grunderkrankung oder ein chronisches Leiden vorlag. Die Identifizierung der Art war dabei oft nicht zuverlässig. So sind Laktobazillen aus Krankheitsgeschehen wie Endokarditiden, Septikämien, rheumatischen Gefäßerkrankungen oder Zahnfäule isoliert worden (HARTY et al. 1994, KLEIN 1998, BOYLE et al. 2006, BESSELINK et al. 2008).

Lediglich *B. dentium*, *L. catuiformis*, *L. psittaci*, *L. rhamnosus*, *L. garvieae* und *E. coli* (ausgenommen enterohämorrhagische *E. coli*) werden als Risikogruppe 2 klassifiziert, wobei *L. psittaci* zwar als wirbeltier- aber nicht humanpathogen eingestuft wird. *L. rhamnosus* sowie *E. coli* werden als langjährig sicher in der technischen Anwendung eingestuft und fallen damit nach den Einstufungskriterien wieder in die Risikogruppe 1. Dennoch sollten neu eingesetzte Stämme besonders auf die in Tabelle 11 aufgeführten Eigenschaften hin untersucht werden.

Auf Ebene der Europäischen Union hat die European Food Safety Authority (EFSA) ein Konzept zur „Qualifizierten Sicherheitsannahme“ (Qualified Presumption of Safety, QPS) entwickelt, welches vor dem Inverkehrbringen zur Sicherheitsbewertung von Mikroorganismen herangezogen werden soll. Basierend auf den Punkten

- Sichere Identifizierung der Art des Mikroorganismus
- Vorhandenes Wissen
- Mögliche Pathogenität

- Endverwendungszweck

können taxonomische Gruppen beurteilt werden und – wenn keine Sicherheitsbedenken bestehen oder diese ausgeräumt werden können – den QPS-Status zuerkannt bekommen, wodurch sich weitere Sicherheitsbewertungen erübrigen würden. Ferner ließen sich durch ein einheitlich definiertes Vorgehen die verschiedenen wissenschaftlichen Gremien der EFSA besser harmonisieren. Es wurde eine Einteilung der Mikroorganismen in vier Gruppen vorgenommen: 1. Gram-positive nicht sporenbildende Bakterien, 2. *Bacillus*-Spezies, 3. Hefen, 4. Fadenpilze. Zur Gruppe 1 zählend wurden unter anderem die Genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* und *Streptococcus* (*S. thermophilus*) zur vorläufigen Abschätzung ihrer Eignung für den QSP-Status ausgesucht.

Für den QPS-Status wurden *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. longum*, *B. breve* und *B. bifidum* vorgeschlagen, andere *Bifidobacterium*-Spezies könnten im Anschluss an ihre industrielle Nutzung mit aufgenommen werden. Ausgeschlossen ist die mit Karies assoziierte Spezies *B. dentium*, welche auch wie oben beschrieben in der TRBA 466 eine Ausnahmestellung innehat.

Von den über 100 *Lactobacillus*-Spezies sind folgende für den QPS-Status vorgeschlagen worden: *L. acidophilus*, *L. amylolyticus*, *L. amylovorus*, *L. alimentarius*, *L. aviaries*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. farciminis*, *L. fermentum*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. hilgardii*, *L. johnsonii*, *L. kefirifaciens*, *L. kefiri*, *L. mucosa*, *L. panis*, *L. paracasei*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. pontis*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *L. sanfranciscensis* und *L. zeae*.

Die milchtechnologisch relevanten Spezies *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* mit dem Biovar *diacetylactis* und *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* wurden aufgrund des traditionellen Einsatzes als Starterkulturen und der hervorragenden Dokumentation für den QPS-Status vorgeschlagen. Gleiches gilt für *S. thermophilus*. Als Voraussetzung für den QPS-Status gilt außerdem das Fehlen von erworbenen Antibiotikaresistenzen.

Bei Einführung dieses Systems wäre eine jährliche Aktualisierung, kontinuierliche Überprüfung und möglicherweise Modifizierung der Liste der Mikroorganismen mit zuerkanntem QPS-Status erforderlich (ANONYM 2007a). Mit dieser Einteilung und den „qualifizierten Sicherheitsannahmen“ befindet sich die EFSA im Einklang mit den zuvor

besprochenen Forderungen anderer Gruppen. Die angestrebte Harmonisierung und Vereinfachung der Bewertungssysteme würde eine Einsparung von Kosten und Zeit bedeuten. Das QPS-Schema hat bislang nur für den Futtermittel- und Pflanzenschutzbereich Relevanz, kann aber auf Mikroorganismen für den Einsatz in Lebensmitteln einfach übertragen werden.

2.1.7 Wirksamkeit

Um fundierte Aussagen über die Wirkungen von Probiotika tätigen zu können fordert die FAO und die WHO (ANONYM 2002a, REID et al. 2003) neben *in vitro*-Tests und Tierversuchen auch Studien zu Wirksamkeit *in vivo* am Menschen (doppelblind, randomisiert, placebo-kontrolliert) mit reproduzierbaren Ergebnissen. Aussagen lassen sich demzufolge nur stammspezifisch und für die jeweils eingesetzte Dosis mit Verabreichungsintervall, den untersuchten Zeitraum sowie die eingesetzte galenische Formulierung (Pulver, Kapsel, Trägerstoff etc.) und Verabreichungsart treffen. Auch werden differenzierte Aussagen über die Wirksamkeit der Bakterien gefordert, so etwa „reduziert die Inzidenz und Schwere von Rotavirus-Diarrhoe bei Infantilen“ statt „hilft der Darmgesundheit“ (REID et al. 2003).

Als gesicherte Wirkungen gelten nach DE VRESE und SCHREZENMEIR (2000) eine geringere Häufigkeit und Dauer verschiedener Durchfallerkrankungen, die Förderung der Laktoseverdauung bei Laktosemalabsorbern, die Immunmodulation sowie die Senkung der Konzentration gesundheitsschädlicher Stoffwechselprodukte und krebspromovierender Enzyme im Dickdarm. Als mögliche Effekte nennen sie die Förderung oder Erhaltung einer optimalen Darmflora, die Motilitätsregulierung bei Obstipationen, die Senkung des Cholesterolspiegels, eine Beeinflussung des Lipidstoffwechsels, die Steigerung der Mineralstoffresorption und Osteoporoseprävention. Auch halten sie die Stärkung des Immunsystems, die Verhinderung von Infektionskrankheiten, Reduktion von Allergien und Autoimmunerkrankungen durch den Einsatz von Pre- und Probiotika für möglich.

Diese Wirkungen sind in klinischen Studien umfassend dokumentiert worden, wobei die meisten als wirksam eingestuft probiotischen Bakterien zu den Laktobazillen oder Bifidobakterien gehören, die natürlicher Weise im humanen Intestinaltrakt gefunden werden (VAUGHAN 1999).

In Kindertagesstätten konnten HATAKKA et al. (2001) in einer doppelblinden, randomisierten Langzeitstudie zeigen, dass bei täglichem Verzehr von *L. rhamnosus* GG die

krankheitsbedingten Fehltagen, die respiratorischen Erkrankungen und der Einsatz von Antibiotika verkürzt waren.

In einer doppelblinden, randomisierten und placebokontrollierten Studie verabreichten HICKSON et al. (2007) während einer Antibiotikatherapie den Patienten (Durchschnittsalter 74 Jahre) gleichzeitig eine Mischkultur aus *L. casei*, *L. bulgaricus* und *S. thermophilus* bis eine Woche nach Therapieende. Während in der Verum-Gruppe 12 % an antibiotikaassoziiierter Diarrhoe erkrankten waren es aus der Placebo-Gruppe 34 %. Bei 17 % der letztgenannten Gruppe wurde *Clostridium difficile* nachgewiesen. Der Arbeitsgruppe zufolge kann einerseits die Inzidenz von antibiotikaassoziiierter Diarrhoe, andererseits aber auch die Morbidität und die Krankenhauskosten bei routinemäßigem Einsatz von probiotischen Mischgetränken bei älteren Patienten reduziert werden.

Die Effekte eines probiotischen Milchproduktes mit *L. casei* Shirota untersuchten MATSUMOTO et al. (2006) in einer randomisierten, placebokontrollierten, doppelblinden Cross-Over-Studie. Die Teilnehmer der Verum-Gruppe verzeichneten eine signifikant erhöhte Stuhlfrequenz mit weicherer Stuhlkonsistenz bei vorausgegangener Obstipation, die Anzahl der Bifidobakterien sowie ihr prozentualer Anteil im Kot stiegen signifikant an.

In einer Meta-Analyse (randomisierte, blinde, placebokontrollierte Studien) über Laktobazillus-Therapie bei akuten Durchfallerkrankungen von Kindern konnten VAN NIEL et al. (2002) diese als sicher und effektiv herausarbeiten.

In einer randomisierten, kontrollierten klinischen Feldstudie konnte MALCHOW (1997) bei Patienten mit Morbus Crohn zeigen, dass die mit Glukokortikoiden und inkapsulierten *E. coli* Nissle 1917 versorgten Patienten weniger Rückfälle hatten und weniger Glukokortikoide benötigten als die Kontrollgruppe, welche nur das Steroid und ein Placebo bekommen hatte.

FEMIA et al. (2002) konnten anhand eines Rattenmodells durch Verfütterung einer Kombination von prebiotischem Inulin und Oligofruktose sowie probiotischen *L. rhamnosus* GG und *B. lactis* BB12 die azoxymethaninduzierte Krebsentstehung signifikant senken.

Der Einsatz von *L. casei* Shirota zeigte nach oraler Gabe im Mausmodell eine signifikante Reduktion des Gehaltes an *Helicobacter pylori* sowie gleichzeitig eine signifikante Abnahme der chronischen und akuten Magenschleimhautentzündung (SGOURAS et al. 2004).

Es gibt aber auch Indikationen, in denen der Einsatz von probiotischen Bakterien nicht ratsam erscheint.

In einer doppelblinden, randomisierten und placebokontrollierten Studie verabreichten BESSELINK et al. (2008) Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis über 28 Tage eine Präparation aus *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. salivarius*, *Lactococcus lactis*, *B. bifidum* und *B. lactis*. Die Verumgruppe zeigte keine Verringerung des Infektionsrisikos, sondern eine Zunahme der Mortalität. Die Autoren empfehlen bei dieser Indikation die Anwendung von Probiotika zu unterlassen und sehen sie im Zusammenhang mit schwerer akuter Pankeatitis als unsicher.

In einem Review-Artikel stellten BOYLE et al. (2006) die Risiken des Probiotikaeinsatzes in der klinischen Praxis zusammen. In 7 dokumentierten Fällen kam es nach Anwendung von *L. rhamnosus* GG bei Risikopatienten (Diabetes mellitus, Mitralklappeninsuffizienz, Frühgeburt, Cerebralparäse) zu einer Sepsis in Form von Bakteriämie, Endocarditis oder Leberabszess. In 5 Fällen konnte nach Verabreichung von *Bacillus subtilis* dieser aus einer Bakteriämie isoliert werden. Die meisten Komplikationen (Fungemie) waren bei der Verabreichung von *Saccharomyces boulardii* zu beobachten. Die Patienten wiesen ausnahmslos verschiedene Risikofaktoren auf. BOYLE et al. (2006) fordern besonderes Abwägen bei der Anwendung von Probiotika bei Risikopatienten und weisen auf die Gefahr einer Sepsis hin.

In der Tierernährung halten verschiedene Autoren Probiotika für eine wirksame Alternative zum Einsatz antibiotischer Leistungsförderer (FOX 1988, FULLER 1989, ROLFE 2000, JEROCH et al. 2004). So hält ROLFE (2000) sowohl den prophylaktischen als auch den therapeutischen Einsatz von probiotischen Kulturen für sinnvoll, da Anzahl und Aktivität von Mikroorganismen mit gesundheitsfördernden Eigenschaften gefördert werden.

Nach MOLITOR (2001) werden Probiotika in der Nutztierhaltung vor allem verfüttert, um eine Leistungssteigerung wie verbesserte Lebendmassezunahme, bessere Futterverwertung oder auch Reduktion von durchfallbedingten Jungtierverlusten zu bewirken. NOGOSSEK (2001) nennt als weitere Indikationen die Stabilisierung der Intestinalflora bei Stressbelastung und die unterstützende therapeutische Maßnahme bei Antibiotikatherapie oder der Behandlung von Infektionskrankheiten. Die Dosierung liegt hierbei meist zwischen 10^7 - 10^9 KbE pro kg Trockenfutter (KAMPHUES et al. 2004), ferner sollte das Probiotikum während der gesamten Mastperiode zugesetzt werden (GUILLOT 2000). Probiotika als Futtermittelzusatzstoffe haben Antibiotika gegenüber den Vorteilen, keine Rückstände im

Lebensmittel tierischen Ursprungs zu hinterlassen, wodurch eine Wartezeit entfällt, außerdem ist die Gefahr der Resistenzausbildung geringer. Die Europäische Union (ANONYM 2003a) hat verschiedene Probiotikapräparationen als Futtermittelzusatzstoffe mit Mono- oder Mischkulturen von *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* und *Saccharomyces*, zugelassen. Eine Übersicht über probiotische Mikroorganismen als Futteradditiva, die nach der Richtlinie 70/524/EWG zugelassen und in der VO (EG) Nr. 1831/2003 aufgelistet sind (ANONYM 2003b, letzte Aktualisierung 25. Februar 2008) bietet die Tabelle 12.

Tabelle 12: Probiotika in der Tierernährung (Stand Februar 2008)

Genus	Spezies	Spezifikation ²⁾
<i>Aspergillus</i>	<i>A. oryzae</i>	
<i>Bacillus</i> (<i>Bc.</i>)	<i>Bc. cereus</i> var. <i>toyoi</i> ¹⁾ , <i>Bc. coagulans</i> , <i>Bc. lentus</i> , <i>Bc. licheniformis</i> , <i>Bc. pumilis</i> , <i>Bc. subtilis</i> ¹⁾	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>B. longum</i>	
<i>Candida</i>	<i>C. glabrata</i>	
<i>Clostridium</i> (<i>Cl.</i>)	<i>Cl. sporogenes phage</i> , <i>Cl. tyrobutyricum phage</i>	
<i>Enterococcus</i> (<i>Ec.</i>)	<i>Ec. faecium</i> ¹⁾ , <i>Ec. mundtii</i>	<i>Ec. faecium</i> DSM 7134 für Sauen und Mastschweine, <i>Ec. faecium</i> DSM 10663 für Truthahnmast und Hunde
<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. marxianus</i> var. <i>lactis</i> , <i>K. marxianus fragilis</i>	

Fortsetzung Tab. 12: Probiotika in der Tierernährung (Stand Februar 2008)

Genus	Spezies	Spezifikation ²⁾
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. amylolyticus</i> , <i>L. amylovorans</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. cellobiosus</i> , <i>L. collinoides</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. mucosae</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. salivarius</i>	<i>L. acidophilus</i> D2 CECT 4529 für Legehennen
<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	
<i>Leuconostoc</i> (Lc.)	<i>Lc. mesenteroides</i> , <i>Lc. oeno</i> , <i>Lc. pseudomesenteroides</i>	
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>	
<i>Propionibacterium</i> (Pb.)	<i>Pb. acidipropionici</i> , <i>Pb. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> , <i>Pb. globosum</i>	
<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>R. palustris</i>	
<i>Saccharomyces</i> (Sc.)	<i>Sc. cerevisiae</i> ¹⁾	MUCL 39885 für Milchkühe, NCYC Sc 47 für Milchschafe, Milchziegen und Pferde
<i>Serratia</i>	<i>Serratia rubidaea</i>	
<i>Streptococcus</i>	<i>S. cremoris</i> , <i>S. faecium</i> , <i>S. thermophilus</i>	

¹⁾ = einzelne Stämme sind als Stabilisatoren für die Darmflora subklassifiziert²⁾ = nur hier explizite Auflistung der Zielorganismen

2.2 Qualitativer und quantitativer Nachweis von probiotischen Mikroorganismen

2.2.1 Kulturelle Keimzahlbestimmung

Die kulturelle Keimzahlbestimmung besteht aus Bakterienanzucht auf verschiedenen Elektiv- und Selektivnährböden, Beurteilung der Koloniemorphologie in Hinsicht auf Form, Größe, Farbe und Oberflächenbeschaffenheit, mikroskopische Beurteilung nach Form, Größe und Färbeverhalten sowie bei Bedarf weiteren physiologischen und biochemischen Tests.

Entsprechend der speziellen Ansprüche einzelner Bakteriengenus oder –spezies werden Nährmedien mit selektiv (z.B. Vitamine, Blut, Milch) oder elektiv (z.B. Antibiotika) wirkenden Substraten versetzt, die gezielt einzelne Bakterien fördern oder hemmen und so eine Differenzierung oder Identifizierung erlauben. Anhand von Fermentationsmustern, Hemmstoffen, verschiedener Inkubationstemperaturen, -zeiten, -konditionen und Nährmedien können Isolationsschritte für einzelne Bakterien erarbeitet werden. So sind Medien zur spezifischen Bestimmung von Bifidobakterien durch Substanzen gekennzeichnet, die das Redox-Potential senken (z.B. Cystein, Cystin, Ascorbinsäure) Antibiotika und/oder eine einzelne Kohlenstoffquelle (carbon source) als selektives Agens enthalten, um andere Milchsäurebakterien zu hemmen. Unterstützend kann Pferde- oder Schafblut supplementiert werden (RASIC 1990).

2.2.1.1 *Lactobacillus* spp. Nachweis

MRS (deMan, Rogosa, Sharpe)-Agar (DE MAN et al. 1960) wird in vielen Variationen für die Anzucht von Laktobazillen empfohlen. Mit einem pH-Wert von 5,2 und bei Bebrütung von 45 °C für mindestens 72 h dient er zum Nachweis von *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Zur Selektion von *L. acidophilus* kann er modifiziert als MRS-Salicin (HULL u. ROBERTS 1984) oder MRS-Sorbitol-Agar eingesetzt werden. Zur Keimzahlbestimmung sowohl von *L. acidophilus* als auch von Bifidobakterien ist MRS-Maltose-Agar (COKER u. MARTLEY 1982, HULL u. ROBERTS 1984) zu bevorzugen (DAVE u. SHAH 1996). Durch Zusatz von Vancomycin (MRS-V) kann *L. casei* elektiv nachgewiesen werden (SAXELIN 1996, BONAPARTE et al. 2000, THARMARJA u. SHAH 2003). Bei Mischkulturen von *L. casei* und *L. rhamnosus* kann der Anteil von *L. rhamnosus* auf MRS-V bei 43 °C für 72 Stunden unter anaeroben Bedingungen bestimmt und dann von der Gesamtzahl des auf MRS-V bei

37 °C für 72 Stunden anaerob bebrüteten Keimgehaltes subtrahiert werden, so dass die verbleibende Keimzahl *L. casei* zuzurechnen ist (THARMARJA u. SHAH 2003).

Die International Dairy Federation (IDF) empfiehlt in ihrem Standard 149A:1997 zur Identifikation von Milchsäurebakterien (ANONYM 1997a) zur Enumeration von Enterokokken, Pediokokken und Laktobazillen MRS-Agar (pH 6,0-6,4). Zum Nachweis von *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ist der pH-Wert auf 5,4 einzustellen (IDF Standard 117A:1988, ANONYM 1988). Zur Differenzierung von *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* und *L. acidophilus* aus Mischkulturen soll für ersteren eine anaerobe Bebrütung von 72 h bei 45 ±1 °C erfolgen, während *L. acidophilus* aerob für 72 h bei 37 ±1 °C inkubiert wird.

Einige Autoren beschreiben RCM (Reinforced Clostridial Medium)-Agar zum Nachweis von *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (DAVIDSON et al. 2000, DAVE u. SHAH 1996), wobei DAVE und SHAH einen pH-Wert von 5,3 und eine Bebrütungsdauer von wenigstens 72 h bei 45 °C fordern.

X-Glu-Agar (Chromogener Agar mit 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Glucopyranoside) eignet sich zur Identifizierung von *L. acidophilus*. Aufgrund der spezifischen Enzymaktivität dieser Spezies präzipitiert sich der blaue Indigofarbstoff X-Glu an seine Kolonien, die dann mittel- bis dunkelblau mit deutlich blauem Hof erscheinen. Andere Bakterien wie *S. thermophilus* und *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* erscheinen weiß (KNEIFEL u. PACHER 1993, PACHER u. KNEIFEL 1996, BONAPARTE et al. 2000).

2.2.1.2 Bifidobacterium spp. Nachweis

RCM als Nährmedium – mit einem pH-Wert von 5,9 - wird bei einer Bebrütung von mindestens 48 h bei 37 °C für Bifidobakterien empfohlen (SCHULER et al. 1968). Durch Zusatz von Mupirocin (MUP-Agar) erhält man einen Nährboden zum selektiven Nachweis von Bifidobakterien, der die gleiche Produktivität wie RCM aufweist (KOPEINIG et al. 2002). Der auf MRS-Agar basierende „Bif“-Agar, dem elektive (L-Cystein-HCL, Schafsblutserum, wasserlösliche Vitamine, Laktulosesirup, Molkepulver von Humanmilch) und selektive (Antibiotika) Stoffe zugesetzt wurden, eignet sich zur Isolation von Bifidobakterien aus fermentierter Milch, Joghurt und Weichkäse (PACHER u. KNEIFEL 1996).

MRS-NNLP (Nalixinsäure, Neomycinsulfat, Lithiumchlorid, Paramomycinsulfat)- Agar (LAROIA u. MARTIN 1991) eignet sich zur Anzucht von Bifidobakterien, obgleich einige

Stämme nur verhaltend wachsen, so dass DAVE und SHAH (1996) MRS-Maltose-Agar (COKER u. MARTLEY 1982; HULL u. ROBERTS 1984) bevorzugen.

Um Bifidobakterien aus fermentierten Milchprodukten zu isolieren und zu quantifizieren verglich BONAPARTE (1997) BEE-Agar (BEERENS, 1991, auch „Modifizierter Columbia“), DIC-Agar (SOZZI et al. 1990, Basismedium TPY oder MRS mit Zusatz von Dicloxacillin) und den selbstentwickelten DP (Columbia-Agar mit Dicloxacillin und Propionsäure). Die Selektivität von DIC-Agar war nicht vollständig und erlaubte Wachstum von *L. acidophilus*, während auf BEE-Agar unerwünscht *L. bulgaricus* wuchs. Zur selektiven Isolation von Bifidobakterien aus joghurtähnlichen Produkten eignete sich DP-Agar am besten.

Die Eignung verschiedener Medien zum quantitativen Nachweis von probiotischen Bakterien aus Milchprodukten untersuchten BONAPARTE et al. (2001) in einem Laborvergleichstest. Zum Einsatz kamen für Bifidobakterien die Medien DP, Bif und INDIB, für *L. acidophilus* Biogarde, X-Glu und Rogosa, für *L. casei* MRS, MRS-V und Rogosa, hinsichtlich ihrer Produktivität unterschieden sich die Nährböden nicht. MRS, RCM, MGRCA (maltose, galactose reinforced clostridial medium) und M-17 wurden von DAVIDSON et al. (2000) eingesetzt, um probiotische Bakterien und Joghurtstarterkulturen aus Eiscreme zu isolieren. Eine Übersicht über diese und weitere Differentialnährmedien für Laktobazillen und Bifidobakterien bietet Tabelle 13.

Tabelle 13: Differentialmedien zur Detektion und Enumeration von potentiell probiotischen *Lactobacillus*- und *Bifidobacterium*-Spezies

Genus	Agarmedium	Referenzen
<i>Lactobacillus</i>	EC	VON HUNGER (1986), LAPIERRE (1990)
	MRS	DE MAN et al. (1960)
	MRS-Galle	PEDERSEN (1993)
	MRS-Maltose	COKER u. MARTLEY (1982); HULL u. ROBERTS (1984)
	MRS-Salicin	HULL u. ROBERTS (1984)
	MRS-Sorbitol	
	MRS-Trehalose	LAPIERRE (1990)
	MRS-V	SAXELIN (1996)

Fortsetzung Tab. 13: Differentialmedien zur Detektion und Enumeration von potentiell probiotischen *Lactobacillus*- und *Bifidobacterium*-Spezies

Genus	Agarmedium	Referenzen
	Rogosa	ROGOSA et al. (1951)
	TPPY	BRACQUART (1981)
	X-Glu	KNEIFEL u. PACHER (1993)
	andere	IDF (1993); CHENG u. NAGASAWA (1983)
<i>Bifidobacterium</i>	BEE (mod. Columbia)	BEERENS (1991)
	Bif	PACHER u. KNEIFEL (1996)
	Bifidobacterium	LAUER u. KANDLER (1976)
	BL-OG	LIM et al. (1995)
	BS I u. II	MITSUOKA et al. (1965)
	DIC	SOZZI et al. (1990)
	DP	BONAPARTE (1997)
	INDIB	HACK (1999)
	LP	LAPIERRE (1992)
	M17	TERZAGHI u. SANDINE (1975)
	MBGA	ARANY et al. (1995)
	MGLP	TERAGUCHI et al. (1982)
	MGRCA	DAVIDSON et al. (2000)
	Modifizierter NPNL	TERAGUCHI et al. (1978)
	Modifizierter NPNL	CHAPON u. KISS (1991)
	Modifizierter NPNL (MGA)	CHENG u. NAGASAWA (1983)
	Modifizierter selective Rogosa	SHIMADA et al. (1977)
	MRS-Dicloxacillin	ZACCONI et al. (1990)
	MRS-Nafcilin	SOZZI (1985)
	MRS-NNLP	LARROIA u. MARTIN (1991)
	MUP-Agar	KOPEINIG et al. (2002)

Fortsetzung Tab. 13: Differentialmedien zur Detektion und Enumeration von potentiell probiotischen *Lactobacillus*- und *Bifidobacterium*-Spezies

Genus	Agarmedium	Referenzen
	NPNL	TERAGUCHI et al. (1978); LAROIA u. MARTIN (1991); MODLER u. VILLAGARCIA (1993)
	RCM	SCHULER et al. (1968)
	RCPB	VAN DER WEIL-KORSTANJE u. WINKLER (1970)
	TOS	SONOIKE et al. (1986)
	TOS-NPNL	WIJSMAN et al. (1989)
	Wasserblau	REUTER (1963)
	YN-17	MARA u. ORAGNI (1983)
	YN-6	RESNICK u. LEVIN (1981)
	andere	MUNOA u. PARES (1988); TANAKA u. MUTAI (1980)
beide Genera	BCP	SHIMADA et al. (1977); OGIHARA et al. (1983)
	HHD	MCDONALD et al. (1987)
	LA	KLUPSCH (1984)
	Modifizierter HHD	ZÚÑIGA et al. (1993)
	Modifizierter TPPY	GHODDUSI u. ROBINSON (1996)

BCP = blood-free egg yolk medium
 BL-OG = blood-glucose-liver- oxgall- gentamicin
 BS = sodium propionate, lithium chloride, paromomycinsulphate, neomycinsulphate
 DIC = TPY / MRS, Dicloxacillin
 DP = Columbia, Dicloxacillin, Propionsäure
 EC = Esculin-Cellobiose
 HHD = homofermentative-heterofermentative differential medium
 INDIB = Xylose, Bromkresolpurpur
 LA = modified bifidus-blood agar
 LP = lithium chloride-sodium propionate
 MGRCA = maltose, galactose, reinforced clostridial medium

MBGA = modified bifid glucose agar
 MRS = deMan, Rogosa, Sharpe
 NPNL = TOS und Neomycinsulfat, Paromomycinsulfat, Nalidixinsäure, Lithiumsalz
 RCM = Reinforced Clostridial Medium
 RCPB = Reinforced clostridial prussion blue
 TOS = transgalactosylated oligosaccharides (Humanmilchzuckerfraktion ähnliche Oligosaccharidmischung)
 TPPY = Tryptose-proteose-peptone-yeast extract-eriochrome T
 X-Glu = 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucopyranoside
 YN = Yeast extract, nalidixid acid, neomycin sulfat

2.2.1.3 Nährböden für andere Spezies

Zur Isolation von *S. thermophilus* dient *S. thermophilus*-Agar (DAVE u. SHAH 1996, THARMARJA u. SHAH 2003), wobei DAVE und SHAH eine aerobe Bebrütung von 24 h bei 37 °C beschreiben.

Ferner kann M-17-Agar ebenfalls zum Nachweis von *S. thermophilus* genutzt werden (PACHER u. KNEIFEL 1996, DAVIDSON et al. 2000).

Wird M-17-Agar zur Enumeration von Enterokokken und *S. thermophilus* eingesetzt, sind diese durch verschiedene Kultivierung zu trennen. Statt unter aeroben Konditionen für 48 h bei 37 ± 1 °C bebrütet zu werden, kann eine Temperatur von 45 ± 1 °C für 48 h für *S. thermophilus* angewandt werden (IDF Standard 149A:1997).

Zur Enumeration von Enterokokken und Pediokokken empfiehlt die IDF in ihrem Standard 149A:1997 zur Identifikation von Milchsäurebakterien (ANONYM 1997a) MRS-Agar mit einem pH-Wert von 6,0-6,4.

Zur Selektion von *Lactococcus* subsp. kann M-17-Agar aerob 5 Tage bei 20 ± 1 °C inkubiert werden statt für 72 h bei 30 ± 1 °C (ANONYM 1997a).

Morphologie

Die Morphologie ist nicht nur vom Bakterium, sondern auch von der Wahl des Mediums und den Kulturbedingungen abhängig. So stellen sich Bifidobakterien auf RCM-Agar als weiße bis grauweiße, glatt-glänzende undurchsichtige („porzellanfarbige“) flache oder erhabene Kolonien mit einem Durchmesser von ein bis zwei Millimeter dar. Die in mattgrauen, 2-3 mm großen Kolonien wachsenden Hefen sind leicht abzugrenzen. Streptokokken hingegen als kleine, durchsichtige Kolonien lassen sich wie auch Sporenbildner mikroskopisch gut abgrenzen (SCHULER et al. 1968, KOPEINIG et al. 2002).

Mikroskopisch zeigen Bifidobakterien besonders bei nicht optimalen Kulturbedingungen sowohl in festen als auch in flüssigem Medium pleomorphe Wuchsformen („bifide Formen“), d.h. Ausbildungen von Verzweigungen, Keulen oder Späroblasten. Optimale Kultivierung sowie Anzucht in Milch und mehrfaches Überimpfen führen zu einem Rückgang der Vielgestaltigkeit. Keime in älteren Kulturen sowie in Subkulturen hingegen zeigen oft gramlabiles Färbeverhalten, Subkultivierung erschwert auch die Anfärbarkeit mit sauren oder basischen Farbstoffen. Die teils sehr ausgeprägte Granulierung kann zu Verwechslung

mit Kokken führen. Während für die Primärkultur strikt anaerobes Wachstum beschrieben wird, nimmt bei späteren Kulturen die Sauerstofftoleranz zu, was allerdings kaum zu aeroben Wachstum auf festem Medium führt (SCHULER et al. 1968). VENTLING und MISTRY (1993) hingegen beschreiben *B. bifidum* und *B. longum* nach Anzucht im MRS-Bouillon oder Milch als typisch gespaltene Stäbchen und Y-Formen. Kultivierung in ultrafiltrierter und Magermilch bringt kurze, kollabierte Zellen in Ketten hervor, die an der Proteinmatrix des Mediums angelagert sind.

Als Einflussgrößen auf die Koloniemorphologie (rau, glatt, intermediär) für *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. lactis* und *L. helveticus* gelten die Bebrütungstemperatur und -dauer und die Anzahl der Subkultivierungen (BARBER u. FRAZIER 1945). Die *L. reuteri*-Gruppe wächst auf MRS-Agar als stecknadelkopfgroße, glatte, grau-weiße, erhabene Kolonien, in der Gram-Färbung werden sie als kokkoid, einzeln oder in Ketten beschrieben (KLEIN et al. 1998).

2.2.2 Durchflusszytometrie

Die qualitative und quantitative Bestimmung des bakteriellen Keimgehaltes von probiotischen Erzeugnissen erfolgt klassischer Weise über Anzucht auf elektiven und selektiven Nährböden in einem Zeitraum von 48 Stunden bis 7 Tagen. Der alternative Einsatz eines Durchflusszytometers könnte eine schnelle Bestimmung des Verhältnisses von toten und lebenden Bakterien durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen ermöglichen. Allerdings existiert hierfür keine - wie in der Zellzahlbestimmung übliche – Routinemethode.

2.2.2.1 Prinzip

Durchflusszytometrie oder FACS-(Fluorescence-activated-cell-sorting)-Analyse ist ein Verfahren zur (Einzel-)Zellanalyse. Probenpartikel werden in einer Trägerflüssigkeit gelöst und während der hydrodynamischen Fokussierung durch den Druck des äußeren Hüllstromes („sheath“) im Probenführungssystem vereinzelt, so dass sie hintereinander den Strahl einer Lasereinheit passieren. Die Probenpartikel streuen das Licht in Richtung des Strahls (Vorwärtsstreulicht, Forward Scatter, FSC) und im 90° Winkel (Seitwärtsstreulicht, Side Scatter, SSC), welches in ein elektronisches Signal umgewandelt und analog an die angeschlossene Computereinheit weitergeleitet wird. Größe und Refraktionsindex des Partikels beeinflussen

die Streuung beim Vorwärtsstreulicht, die Komplexität (Oberflächenbeschaffenheit und Granularität) beeinflusst die Ablenkung des Seitwärtsstreulichtes (ROTHE 2007).

2.2.2.2 Einsatzmöglichkeiten

Zu Beginn standen vor allem somatische Zellen im Fokus, so war eines der ersten Aufgabengebiete die Leukozytenphänotypisierung (VALET 2007).

Grundsätzlich sind Bakterien oder sogar Viruspartikel durchflusszytometrisch ebenso zu messen wie eukaryontische Zellen, allerdings machen die Parameter Größe, Masse, Nukleinsäure- und Proteingehalt von Bakterien nur etwa 1/1000 der entsprechenden Parameter von Säugetierzellen aus. Um bei den auf größere Zellen ausgelegten Durchflusszytometern für kleine Partikel dennoch gute Messergebnisse zu erhalten, muss besonders sorgfältig und entsprechend langsam gemessen werden und auf eine gute Abgrenzung des Untersuchungsgutes gegen Debris geachtet werden (SHAPIRO 1988). Auf dem Gebiet der Zellbiologie werden Durchflusszytometer für verschiedene Messungen eingesetzt (Tab. 14).

Tabelle 14: Einsatzmöglichkeiten der Durchflusszytometrie in der Zellbiologie (LINDL 2002)

-
- Größe, Oberfläche und Struktur von Zellen
 - Oberflächenbindungen
 - Rezeptorbindungen
 - Membrantransport (intrazelluläre Aufnahme)
 - Enzymkinetiken
 - Quantitative Protein- und DNA-Messungen an der lebenden Zelle
 - Stadien der Proliferation (z.B. bei Krebsdiagnostik, immunologischen Untersuchungen)
 - Kinetik des Zellzyklus
 - Messung des Membranpotentials, interne pH-Messung
 - Mitochondriale Aktivität
 - Calciumeinstrom und Calciumausstrom
 - Messung und Sortierung von Chromosomen
 - Klonierung von Zellen
 - Quantitative Vermessung von Zellorganellen, Bakterien und anderen Partikeln
-

ÁLVAREZ-BARRIENTOS et al. (2000) beschrieben als Einsatzgebiete in der klinischen Mikrobiologie die direkte Diagnostik, Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung, Serum-Antikörperdetektion, Bakterienidentifizierung, die parallele Analyse verschiedenster Zellfunktionen, die Überprüfung des Therapieerfolges, das Aufspüren resistenter Krankheitserreger und die Sterilitätsüberprüfung von Flüssigkeiten.

Viele Wissenschaftler nutzen Durchflusszytometer nicht nur für Studien mit somatischen Zellen, sondern auch für bakteriologische Untersuchungen.

So beschrieben FERRARI et al. (2004) das Durchflusszytometer als wichtiges Instrument zur Isolation von Bakterien, die schwer oder gar nicht kultivierbar sind, auch aus komplexen mikrobiellen Gemeinschaften aus Wasser- oder Bodenproben. Nach dem Sortieren von Zellen genügten ihnen 100-1000 Bakterienzellen, um zuverlässige, reproduzierbare PCR-Analysen durchzuführen.

Verschiedene Autoren nutzten das Durchflusszytometer für die Analyse des Bakterioplanktons aus Wasserproben (LEBARON et al. 1998, GASOL et al. 1999, ZUBKOV et al. 1999, BIEGALA et al. 2003, SEKAR et al. 2004).

BERNANDER et al. (1998) testeten die am häufigsten zur Bakterienmessung eingesetzten Durchflusszytometer Argus100 (Skarton, Lier, Norwegen) und FACStar+ (Becton-Dickinson, San Jose, Kalifornien). Anhand eines *E. coli*-Stammes zeigten sie, dass sich mit beiden Geräten eine exakte und zuverlässige DNA-Messung durchführen lässt und sie schlussfolgern, dass dies auch mit anderen Durchflusszytometern gleicher Bauart machbar sei.

2.2.2.3 Farbstoffe

Im biotechnologischen Einsatz hilft die direkte Analyse mit Fluoreszenzfarbstoffen wichtige physiologische Informationen auf Einzelzellebene zu generieren, mit einer - beachtet man auch die Geschwindigkeit und Automatisierungsmöglichkeit - in anderen Methoden unerreichten Effizienz. So lassen sich durch den Einsatz von Nukleinsäurefarbstoffen Artefakte ausschließen, grundlegende Zellfunktionen wie Reproduktionsvermögen, Metabolismus und Membranintegrität lassen Schlüsse auf den physiologischen Status und die Vitalität von Zellen zu. Sortierfunktionen können Zellfraktionen auf Objektträger, in Petrischalen oder Multiwellplatten ausbringen, um die beobachtete Vitalität mit Wachstum zu korrelieren (NEBE-VON-CARON et al. 2000).

Voraussetzung für eine optimale Zellanalyse ist neben der Probenvorbereitung die Auswahl geeigneter Farbstoffe und deren Kombination. Neben den technischen Gegebenheiten wie z.B. der Laserspezifikation (Anzahl, Wellenlänge, Leistung) ist bei der Farbstoffwahl der experimentelle Ansatz ausschlaggebend. Es ist möglich, durch spezielle Fluorochrome fixierte oder unfixierte Proben zu untersuchen, Oberflächen- oder intrazelluläre Färbungen vorzunehmen, DNA/RNA, spezifische Stoffwechselprodukte, physiologische Parameter oder - nach Kopplung an Antikörper - Antigene sichtbar zu machen.

So erlaubten Gensonden durch den Einsatz von 16S rRNA Markierungen in Kombination mit speziellen Fluoreszenzfarbstoffen und der Durchflusszytometrie die genaue Differenzierung und Identifizierung von verschiedenen Bakterien, auch wenn diese serologisch Kreuzreaktionen zeigten oder in Mischkulturen eingebracht waren (AMANN et al. 1990, FUCHS et al. 1998, FERNÁNDEZ-LAGO et al. 2000). Bei der Untersuchung von Schmutzwasserproben auf Bakterien mittels des DNA-spezifischen Farbstoffes Hoechst 33342 konnten ähnliche Ergebnisse bei der *in situ* Identifikation von rRNA-markierten Proben und der Mikroskopie erzielt werden (WALLNER et al. 1995).

Über die fluoreszenzoptische Messung der intrazellulären β -Galaktosidase-Aktivität als spezifisches Stoffwechselprodukt konnten verschiedene Gruppen Wildstämme und Mutanten von Bakterien auf Einzelzellebene differenzieren und sehen in dieser Methode eine Möglichkeit, Aussagen über Proteinexpression, Promoterfunktion und Zellzyklusregulation zu treffen (NOLAN et al. 1988, EITZMAN et al. 1989, CHUNG et al. 1995).

Mit Hilfe von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern im Durchflusszytometer konnten nicht nur alle Pneumokokken-Serotypen aus Vakzinen, sondern auch über 90 % aller klinischen Isolate identifizieren werden (YU et al. 2005).

Eine andere wichtige Anwendung für Farbstoffe ist die Lebend/Totdiskriminierung.

Vitalfarbstoffe, die für nicht-fixierte Proben geeigneter sind, gelangen entweder durch Diffusion, aktiven oder trägervermittelten Transport in die Zelle. Meist handelt es sich bei den Farbstoffen um kleine, fettlösliche Moleküle mit positiver oder neutraler Ladung. Tote und apoptotische Zellen lassen die Färbelösung aus dem wässrigen Medium ins Zellinnere, wo positiv geladene Farbstoffe an die negativ geladenen Zellkomponenten wie Nukleinsäure oder Glukosaminoglykane binden. In lebenden Zellen wirkt der elektrische Gradient dem Einwandern und Binden der Farbstoffe entgegen (SCHIEMANN u. BUSCH 2007).

Die Farbstoffe differieren in ihren Spektralcharakteristika und ihrer Fähigkeit, Zellen zu penetrieren. Sie sind basenpaarunspezifisch und zeigen eine vielfache Emissionsverstärkung nach Bindung an Nukleinsäure. In Kombination ermöglichen sie durch die Konkurrenz um DNA-Bindungsstellen eine gezielte Kenntlichmachung toter und vitaler Zellen.

Zur schnellen Vitalitätsbestimmung von *Bacillus* subsp., *Salmonella* subsp., *E. coli* subsp., *S. aureus* und *Aeromonas* subsp. im Durchflusszytometer setzten DIAPER et al. (1992) die drei Vitalfarbstoffe DiOC₆(3), FDA und Rh123 ein. Zur prozentualen Bestimmung der vitalen Bakterien eignete sich Rh123 am besten, wobei die Untersuchenden stammabhängig eine unterschiedliche Eignung der Farbstoffe beschreiben.

Der Durchflusszytometrie-Farbstoff Tinopal CBS-X wurde von einigen Gruppen als sehr geeignet zur Färbung von sowohl vegetativen als auch sporulierten Gram-positiven Bakterien beschrieben (DAVEY u. KELL 1996, 1997, DAVEY et al. 1999), allerdings wurde auch das Problem der Verklumpung von Bakterienzellen und dadurch falsch niedrige Gehalte angesprochen.

Propidiumjodid (PJ) wurde als DNA/RNA-Farbstoff beschrieben, der zur Vitalitätsbestimmung, DNA-Quantifizierung und zu Zellzyklusstudien verwendet wird (ÁLVAREZ-BARRIENTOS et al. 2000).

Durchflusszytometrie, Luminometrie und konventionelle Plattenzählmethode wurden von VIRTA et al. (1998) eingesetzt, um komplementvermitteltes Töten des angeborenen Immunsystems von Bakterienzellen zu messen. Für die Durchflusszytometrie wurde LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit (molecular probes, Leiden, Niederlande) eingesetzt, das die Farbstoffe SYTO[®]9 und Propidiumjodid enthielt. Die drei Messmethoden ergaben die gleiche Absterberate, woraus die Autoren schlossen, dass die bakteriolytische Aktivität des Serumkomplements schnell und konventionell mittels Durchflusszytometer bestimmt werden kann und prinzipiell jeder Vitalitätsfarbstoff zur Bakterienfärbung und durchflusszytometrischen Analyse genutzt werden kann.

SAARELA et al. (2004) konnten stammsspezifische Unterschiede für die Überlebensfähigkeit von Laktobazillen und Bifidobakterien in Fermentern herausarbeiten, indem sie nach Anfärbung mit SYTO[®]9 und PJ die Vitalität der Zellen unter einem Epifluoreszenzmikroskop beurteilten.

In einer Studie zum Nachweis von Bakterien aus Wasser testeten LEBARON et al. (1998) verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, wobei sich SYTO[®]9 für Süßwasseruntersuchungen besser als z.B. SYTO[®]13 und SYTO[®]11 eignete und tote sowie lebende Bakterien anfärbte, während SYBR-II für Salzwasser geeigneter war.

Auch SAKAMOTO et al. (2005) setzten SYBR Green II und TO-PRO[®]-3 zur Färbung von Bakterien aus Kulturen und Umweltproben ein.

Bei durchflusszytometrischen Studien mit SYTO[®]13 gefärbten *E. coli* zeigten sich abhängig von der Topologie Unterschiede in der Fluoreszenz. GUINDULAIN und VIVES-REGO (2002) folgerten, dass Fluoreszenz nicht nur durch den Nukleinsäuregehalt bestimmt werden kann.

Drei nukleinsäurebindende Fluoreszenzfarbstoffe - PJ, TO-PRO[®]-1, SYTOX green - wurden von MORTIMER et al. (2000) auf ihre Fähigkeit hin untersucht, nach Antibiotikaeinsatz zwischen *E. coli*-Zellen mit intakter oder beschädigter Membran zu unterscheiden, was alle Farbstoffe vermochten. Allerdings zeigten die antibiotikabehandelten Zellen im Durchflusszytometer nicht in gleichem Maße einen Vitalitätsverlust, wie er auf Platte zu verzeichnen war. Die Autoren sahen darin ein fundamentales Problem, wenn die Antibiotikasensibilitätstestung nur aufgrund von Koloniewachstum erfolgte.

BUNTHOF et al. (2001a) untersuchten Milchsäurebakterien durch den Einsatz von Carboxyfluoreszein Diacetat (cFDA) als Lebendfarbstoff, TOTO-1 und PJ als Totfarbstoff sowie SYTO[®]9 als Fluoreszenzfarbstoff für lebende und tote Bakterien. Bei Kombination von SYTO[®]9 und PJ verdrängte PJ wegen seiner höheren Affinität zu DNA SYTO[®]9 aus Zellen mit beschädigter Membran, so dass SYTO[®]9 lebende und PJ tote Zellen anfärbte. Im Vergleich lieferte TOTO-1 ein klareres Ergebnis als PJ. Die Autoren sahen Fluorochromfärbung im FACS als Chance, die Vitalität von Starterkulturen, deren Überleben nach Herstellung und Lagerung, aber auch die Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber Antibiotika zu testen.

2.2.2.4 Partikelzählung

Zum Zählen von Bakterien mittels Durchflusszytometrie kann zum einen ein festes Volumen gemessen werden, wie es z.B. in den meisten Hämatologie-Analysegeräten der Fall ist. Elektronische Totzeiten, kleine Probenvolumina und Fehlerstellen im System sind hierbei Schwachstellen. Zum anderen kann über die Einbeziehung der Zeit bei konstantem

Volumenfluss mittels Pumpeneinsatz und so bekanntem Probenfluß eine Quantifizierung vorgenommen werden. Hierbei können Probleme durch Leistungsschwankungen der Pumpe, Probenverschleppung und Viskositätsänderungen u.a. aufgrund von Temperaturschwankungen entstehen. Die radiometrische Zählung über den Einsatz von Referenzpartikeln („Beads“), also dem Mischen eines bekannten Volumens mit einer bekannten Partikelzahl zu einer unbekanntem Anzahl Probenpartikel in einem definierten Volumen, ermöglicht über Dreisatzrechnung eine sichere Bestimmung der Probenpartikelzahl. Die Methode kann bei jedem Zytometer angewandt werden und ist unempfindlich gegen die oben angesprochenen Einflüsse. Über den Referenzpartikelfluss kann gleichzeitig die Probenflussrate kontrolliert werden, falls es bei Umweltproben zu Verstopfungen des Leitungssystems kommen sollte. Radiometrische Zählung erlaubt auch das Unterlassen von Wasch- und Verdünnungsschritten (NEBE-VON-CARON 2003).

Um Zählfehler zu minimieren sollten über 5000 Ereignisse (events) gemessen werden, so dass die Variation unter 1% liegt. Eine Eventrate von $\leq 1000/\text{sec.}$ minimiert die Möglichkeit der Koinzidenz und verfeinert die Auflösung der Darstellung. Bei hohen Eventraten kann entweder weiter verdünnt oder die Messgeschwindigkeit angepasst werden.

Um zuverlässige Aussagen über die Konzentration treffen zu können, sollten wenigstens 1000 Beads gemessen werden. Bei zu niedriger Bakterienkonzentration wird das störende Hintergrundrauschen prominenter (ANONYM 2001 u. 2002b).

GEOFFROY et al. (2000) konnten mittels Beads *L. plantarum* durchflusszytometrisch zählen und sortieren, wobei parallele Keimzahlbestimmungen auf Platte übereinstimmende Ergebnisse lieferten.

SAKAMOTO et al. (2005) untersuchten erfolgreich mit SYBR Green II und TO-PRO[®]-3 gefärbte Bakterien aus Kulturen und Umweltproben qualitativ und quantitativ durch Zugabe von fluoreszierenden Beads (Fluoresbrite YG Microspheres, Polyscience). Aus Mischkulturen konnten sie durch den Einsatz von Antikörpern *E. coli* separieren. Durch Erstellung einer Standardkurve konnten sie auf die Zugabe von Beads zu jeder Probe verzichten.

Weitere Autoren nutzen die Zugabe einer definierten Menge von Beads, um den Gehalt an Bakterien zu berechnen (NOVO et al. 2000, BUNTHOF u. ABEE 2002, MOHR et al. 2006). BUNTHOF und ABEE (2002) ermittelten für Joghurtstarterkulturen und probiotische Produkte die KbE/ml-Werte durch das Plattenzählverfahren und parallel dazu im FACS durch

Zugabe von Beads (PC Red Beads, 1,75 μm , Polyscience, Deutschland). Ab einem Mindestgehalt von 10^5 KbE/ml zeigten die Werte beider Methoden eine große Übereinstimmung.

MOHR et al. (2006) setzten Durchflusszytometrie zur Sterilitätsprüfung von buffy coat Thrombozyten-Konzentraten ein und definierten die Nachweisgrenze für Bakterien mittels Beads ebenfalls bei 10^5 KbE/ml. Ab dieser Konzentration waren die Ergebnisse von Plattenzählverfahren und FACS sehr gut vergleichbar.

GUNASEKERA et al. (2003) zogen eine Grenze bei 10^4 KbE/ml für SYTO[®]9 -gefärbte Proben und gaben an, mittels FISH-Markierung auch niedrigere Gehalte detektieren zu können.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

Es wurde eine institutseigene Stammsammlung von probiotischen Mikroorganismen angelegt (siehe Anh.: 9.5).

Sie beinhaltet sowohl Stämme, die von anderen Instituten zur Verfügung gestellt wurden, der Kultursammlung der ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA), der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland) und der LMG (Laboratorium voor Microbiologie, Gent, Belgien) als auch Eigenisolate. Letztere wurden aus fermentierten Milchprodukten und pharmazeutischen Präparaten gewonnen. Es wurden 10 Stämme der Gattung *Lactobacillus*, 7 Stämme der Gattung *Bifidobacterium* und 1 Stamm der Spezies *E. coli* verwendet. Die Stämme mit Stammhaltungsnummer und ihre Herkunft sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 15: Eingesetzte Bakterienstämme

Stammnummer	Genus ¹⁾	Spezies ²⁾	Subspezies	Erhalten von ³⁾	Synonym	Ursprung
S-6	<i>B.</i>	<i>animalis</i>		Wien	DSM 20105, ATCC 27536,	Hühnerfäeces
S-10	<i>B.</i>	<i>bifidum</i> [†]		Wien	DSM 20456, ATCC 29521	Kot gestillter Säuglinge
S-9	<i>B.</i>	<i>breve</i> [†]		Wien	ATCC 15700,	Darm, adult
S-8	<i>B.</i>	<i>infantis</i>		Wien	DSM 20088, ATCC 15697	Darm, adult
S-1	<i>B.</i>	<i>lactis</i>		Wien	BB 12	fermentiertes Milchprodukt
S-7	<i>B.</i>	<i>longum</i> [†]		Wien	DSM 20219, ATCC 15707	Darm, adult
S-11	<i>B.</i>	<i>longum</i>		Wien	BB 536	fermentiertes Milchprodukt
S-12	<i>L.</i>	<i>acidophilus</i> [†]		Wien	DSM 20079, ATCC 4356	Human
S-22	<i>L.</i>	<i>acidophilus</i>		Wien	La 74-2	fermentiertes Milchprodukt
S-16	<i>L.</i>	<i>casei</i> [†]		Wien	DSM 20011, ATCC 393	Käse
S-21	<i>L.</i>	<i>casei</i>	<i>paracasei</i>	Wien	Hansen 01	fermentiertes Milchprodukt
S-23	<i>L.</i>	<i>delbrueckii</i>	<i>bulgaricus</i> [†]	Wien	DSM 20081, ATCC 11842	fermentiertes Milchprodukt
S-14	<i>L.</i>	<i>johnsonii</i> [†]		Wien	DSM 10533, ATCC 33200	humanes Blut
S-26	<i>L.</i>	<i>paracasei</i>		Eigenisolat	<i>L. casei</i> Shirota	fermentiertes Getränk
S-18	<i>L.</i>	<i>paracasei</i>	<i>tolerans</i> [†]	Wien	DSM 20258, ATCC 25599	pasteurisierte Milch
S-15	<i>L.</i>	<i>reuteri</i> [†]		Wien	DSM 20016, ATCC 23272	Darm, adult, Human
S-17	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i> [†]		Wien	DSM 20021, ATCC 7469	nicht bekannt
S-46	<i>E.</i>	<i>coli</i>		Eigenisolat	<i>E. coli</i> Nissle 1917	Darm, adult

¹⁾ *B.* = *Bifidobacterium*

L. = *Lactobacillus*

E. = *Escherichia*

²⁾ † = Typstamm

³⁾ Wien = Universität für Bodenkultur
Gregor-Mendel-Str. 33
A-1180 Wien

3.1.2 Produkte

3.1.2.1 Milchlischerzeugnisse

Neben den in Reinkultur vorliegenden Bakterienstämmen der Stammsammlung wurden auch direkt aus Produkten isolierte Bakterien untersucht. Bei dem Großteil der mit probiotischen Bakterien versetzten Nahrungsmittel handelt es sich um fermentierte Milchprodukte, die sowohl in fester als auch in flüssiger Form und mit verschiedenen Fettgehaltsstufen im Handel sind. Enthalten sind laut Deklaration teils probiotische Monokulturen, teils neben den eingesetzten probiotischen Stämmen auch normale Joghurtstarterkulturen.

Produkt 1, 2, 3, 4 und 5 wurden zur Vitalitätsbestimmung im FACS genutzt, während Produkt 1, 2, 5, 7, 8, 9 und 10 in einem weiteren Versuch zusätzlich quantitativ untersucht wurden. Parallel dazu wurde für jedes Produkt die Keimzahl mittels Oberflächenspatelverfahren (OSV) bestimmt. Eine Übersicht der untersuchten Milchlischerzeugnisse und ausgelobten Bakterien bietet Tabelle 16.

Tabelle 16: Milchlischerzeugnisse und deklarierte Bakterien

Nr.	Deklaration als	deklarierte Bakterien	Fett %
1	Joghurt mild	<i>L. LC1</i>	3,5
2	Probiotischer Joghurt-Drink	<i>L. casei defensis</i>	1,6
3	Joghurt mild	<i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i>	3,7
4	Probiotischer Joghurt	<i>L. casei</i>	1,8
5	Fermentiertes Milchgetränk	<i>B. breve</i>	< 0,1
6	Joghurt mit spez. Bulgaricus-Kulturen	<i>L. bulgaricus</i>	3,5
7	Milchlischerzeugnis mit probiotischen Kulturen	<i>B. lactis</i> BB12 <i>L. acidophilus</i> LA5 <i>L. casei</i>	1,0
8	Fermentiertes Getränk mit Magermilch	<i>L. casei</i> Shirota	< 0,1
9	Joghurt mit probiotischen Kulturen	<i>B. lactis</i> BB12 <i>L. acidophilus</i> LA5	1,6
10	Probiotischer Joghurt-Drink	<i>B. lactis</i> BB12 <i>L. acidophilus</i> LA5	1,7

3.1.2.2 Andere Produkte

Außer Milchmischerzeugnissen werden auch zunehmend andere Produkte mit probiotischen Bakterien versehen. Dazu zählen verschiedene Arzneimittel, aber auch Kaugummi, Tropfen und Tabletten, in denen wahlweise eine Reinkultur (z.B. *E. coli* Nissle 1917, Produkt Nr. 11) oder auch Kombinationen aus verschiedenen probiotischen Bakterien (*L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. salivarius*, *B. bifidum*, *B. lactis*, *Lc. lactis*, Produkt Nr.13) eingesetzt werden. Tabelle 17 gibt einen Überblick über die untersuchten Produkte, die keine Milchmischerzeugnisse sind.

Tabelle 17: Probiotische Produkte ohne Milchzusatz und deklarierte Bakterien

Nr.	Deklaration als	deklarierte Bakterien	Sonstiges
11	mikrobielles Arzneimittel	<i>E. coli</i> Nissle 1917	Ampulle
12	mikrobielles Arzneimittel	<i>E. coli</i> Nissle 1917	Hartkapsel, pulvergefüllt
13	Nahrungsergänzungsmittel	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i>	Pulver

3.1.3 Nährmedien

Zur Anzucht der verschiedenen Spezies kamen unterschiedliche Medien zum Einsatz.

In MRS-Bouillon und auf MRS-Agar wurden Laktobazillen angezüchtet, zur näheren Identifizierung und bei Mischkulturen wurden MRS-V (MRS-Agar mit Vancomycin, [SAXELIN 1996]) und X-Glu (Chromogener Agar mit 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucopyranoside, [KNEIFEL et al. 1993]) eingesetzt. Der Einsatz von MRS-V erlaubte eine Identifizierung von *L. casei*, X-Glu von *L. acidophilus*.

Zur Anzucht von Bifidobakterien diente RCM-Bouillon und RCM-Agar sowie MUP (RCM mit Mupirocin, [KOPEINIG et al. 2002]) als Selektiv-Agar.

M 17 Agar diente zur Anzucht von Streptokokken, insbesondere *S. thermophilus*.

E. coli wurden auf PC-Agar angezüchtet. Eingesetzte Nährmedien und das Wachstum der verschiedenen Spezies sind Tabelle 18 zu entnehmen.

Tabelle 18: Nährböden und Bouillon zur Bakterienanzucht

Medium	Hersteller ¹⁾	nachgewiesene Bakterien
MRS- Bouillon	Oxoid (CM0359)	<i>Lactobacillus</i> spp.
MRS-Agar	Oxoid (CM0361)	<i>Lactobacillus</i> spp.
MRS-V-Agar	Eigene Herstellung (nach SAXELIN 1996)	<i>L. casei</i>
MUP-Agar	Eigene Herstellung (nach KOPEINIG et al. 2002)	<i>Bifidobacterium</i> spp.
M 17-Agar	Oxoid (CM0785)	<i>S. thermophilus</i>
Plate Count Agar	Oxoid (CM0325)	<i>E. coli</i>
RCM-Bouillon	Difco (218081)	<i>Bifidobacterium</i> spp.
X-Glu-Agar	Eigene Herstellung (nach KNEIFEL et al. 1993)	<i>L. acidophilus</i>

¹⁾ Oxoid = Hampshire, England

Difco = Becton-Dickinson, Heidelberg- Wieblingen

Eine detaillierte Beschreibung und Zusammensetzung der Nährmedien ist im Anhang aufgelistet (Anh.: 9.1).

3.1.4 Durchflusszytometrie

Eingesetzt wurde ein Fluoreszenz-Durchflusszytometer, Modell FACSCalibur[®] (Becton Dickinson, Heidelberg) mit angeschlossener Computereinheit.

Als Farbstoffe zur Unterscheidung zwischen toten und vitalen Bakterienzellen wurden 3 Substanzen (SYTO[®] 9, TO-PRO[®]-3, PJ) eingesetzt.

SYTO[®] 9 ist ein grüner DNA-Farbstoff mit einer Anregung bei 488 nm und einer Emission bei 500 nm, der sowohl tote als auch lebende Bakterien anfärbt und besonders gut in Kanal FI-2 und FI-3 sichtbar ist.

TO-PRO[®]-3 ist ein roter DNA-Totfarbstoff, der von allen Zellen aufgenommen wird, aber nur in toten Zellen mit geschädigter Membran bestehen bleibt. TO-PRO[®]-3 wird bei 640 nm angeregt, emittiert bei 660 nm und ist in FI-4 sichtbar.

PJ ist ein ebenfalls rot fluoreszierender DNA-Totfarbstoff (Anregungswellenlänge bei ca. 535 nm, Emission bei ca. 617 nm), der nur defekte Zellen anfärbt und in Fluoreszenzkanal 3 ausgewertet wird.

Zur Quantifizierung wurden Beads (PeakFlowTMOrange flow cytometry reference beads 2,5 µm, $1,2 \times 10^8$) zugegeben. Diese aus Polystyrol bestehenden Mikrosphären haben eine Absorption von 570 nm und eine Emission von 575 nm, der Fluoreszenzfarbstoff ist in den Partikel eingebracht. Im Lösungsmedium sind Aqua dest., 0,05 Tween[®] 20 und 2 mM Salzsäure enthalten, so dass die Beads in ein genügend großes Probenvolumen eingebracht werden müssen, um Wechselwirkungen mit den Bakterien zu vermeiden.

Eine Liste der verwendeten Reagenzien befindet sich im Anhang (Anh.: 9.2).

3.1.5 Technische Geräte

Eine detaillierte Auflistung der technischen Geräte, Glas- und Einmalartikel befindet sich im Anhang (Anh.: 9.2.3).

3.2 Methoden

3.2.1 Kulturelle Nachweisverfahren

3.2.1.1 Reinkulturen

Anzucht und Lagerung

Aus der Stammsammlung wurden 12 Reinkulturen (6 Bifidobakterien: *B. animalis* [S-6], *B. lactis* [S-1], *B. bifidum* [S-10], *B. infantis* [S-8], *B. longum* [S-7], *B. breve* [S-9] und 6 Laktobazillen: *L. casei* [S-16], *L. rhamnosus* [S-17], *L. reuteri* [S-15], *L. acidophilus* [S-12], *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* [S-23], *L. johnsonii* [S-14]) als Kügelchen dem Mikrobank™-System entnommen und in vorgewärmter RCM- bzw. MRS-Bouillon anaerob für 24 ± 1 h bei $37 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ bebrütet. Die Reinheit der Proben wurde mikroskopisch überprüft.

Die Proben wurden anaerob bei $4 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ gelagert, an Tag 1, Tag 21 und Tag 42 untersucht und sofort nach der sterilen Probenentnahme wieder unter diesen Bedingungen verwahrt.

Je drei Bifidobakterienstämme (*B. lactis* [S-1], *B. longum* [S-7], *B. breve* [S-9]) und Laktobazillenstämme (*L. acidophilus* [S-12], *L. johnsonii* [S-14], *L. casei* [S-16]) wurden wie oben beschrieben in Bouillon kultiviert. Nach makroskopischer Beurteilung des Wachstums über die Trübung der Bouillon und mikroskopischer Überprüfung auf das Vorliegen einer Reinkultur wurden je Stamm dreimal je 2 ml der Bouillon in ein 50 ml Falcon- Röhren überbracht (Röhren 1,2,3).

Röhren 1 wurde mit 18 ml ¼-starker Ringerlösung aufgefüllt, so dass das Endvolumen 20 ml betrug.

Um die Zusammensetzung eines fermentierten Getränkes mit Magermilch (Produkt 8) zu simulieren wurden Röhren 2 und 3 mit 30 % Milchanteil versetzt.

Röhren 2 wurde mit 2 ml bewachsener Bouillon, 5 ml 0,3 % fetthaltiger H-Milch und 13 ml ¼-starker Ringerlösung befüllt.

Röhren 3 wurde mit 2 ml bewachsener Bouillon, 5 ml 3,5 % fetthaltiger H-Milch und ebenfalls 13 ml ¼-starker Ringerlösung befüllt.

Tabelle 19 zeigt die detaillierte Zusammensetzung im Überblick.

Tabelle 19: Detaillierte Zusammensetzung der einzelnen Probenansätze

	Bakterien [ml]	¼-starke Ringer- lösung [ml]	0,3%-fetthaltige H-Milch [ml]	3,5%-fetthaltige H-Milch [ml]
Probe 1	2	18		
Probe 2	2	13	5	
Probe 3	2	13		5

Die Falcon-Röhrchen, deren Untersuchung zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 21 und Tag 42 stattfand, wurden mit halb zugeschraubten Deckel in einem Anaerobiotopf bei $4\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ gelagert und sofort nach der sterilen Probenentnahme wieder unter diesen Bedingungen verwahrt.

Die konventionelle Keimzahlbestimmung erfolgte über das Anlegen von Verdünnungsreihen und die Beimpfung von RCM- bzw. MRS-Agarplatten mittels Oberflächenspatelverfahren (siehe unten).

Zur Validierung der Ergebnisse wurde der Versuch 2 x wiederholt ($n = 3$).

Es wurde auch *E. coli* als Reinkultur in Form von zwei pharmazeutischen Präparaten (Probe 11 und 12) untersucht. Diese wurden bei $4\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ gelagert und im monatlichen Abstand vor und nach dem Mindesthaltbarkeitsdatum (MHD) mittels OSV und FACS untersucht.

Ansatz mit Oberflächenspatelverfahren (OSV)

Die Bestimmung der KbE (**K**olonie**b**ildenden **E**inheiten) pro Gramm bzw. Milliliter erfolgte über das Ansetzen von dekadischen Verdünnungsreihen. Die Kultivierung der Laktobazillen erfolgte in Anlehnung an die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren (BVL 2005) nach der in § 64 LFGB vorgeschriebenen Methode (L 06.00-35).

Nach oben beschriebener Probenvorbereitung wurde 1 ml Probenvolumen in 9 ml Verdünnungsmedium überbracht. Nach ca. 3 Sekunden vortexen wurde 1 ml mittels 1 ml Glasauslaufpipette der nächsthöheren Verdünnungsstufe zugeführt und durch vortexen homogenisiert. Je 0,1 ml der Probe wurden auf jeweils zwei vorgetrocknete Agarplatten

(Doppelansatz) ausgebracht und mit einem sterilen Einmalspatel gleichmäßig verteilt. Dies wurde bis zur Verdünnungsstufe 10^{-8} praktiziert.

Als Verdünnungsflüssigkeit diente sterile $\frac{1}{4}$ -starke Ringer-Lösung (Laktobazillen und Bifidobakterien; 1 Tablette in 500 ml A. dest., autoklaviert) oder sterile 0,85 %ige Natriumchlorid-Lösung (*E. coli*, 8,5 g Natriumchlorid in 1 l A. dest., autoklaviert).

Bifidobakterien wurden auf RCM-Agar, Laktobazillen auf MRS-Agar und *E. coli* auf PC-Agar kultiviert. Bifidobakterien und Laktobazillen wurden anaerob bebrütet. Zum Einsatz kamen Anaerobiertöpfe mit verschiedenem Volumen und AnaeroGen™ - Beutel (Oxoid), welche eine Atmosphäre mit 0,9 % O₂, 10 % CO₂ und 89,1 % N₂ erzeugten.

Die Bebrütungsdauer lag stammespezifisch zwischen 48 ± 2 h und 72 ± 2 h bei 37 °C.

Makroskopie

Die makroskopische Differenzierung der Keime erfolgte anhand ihres Wachstums auf den verschiedenen Elektiv- und Selektivmedien sowie über die mit bloßem Auge zu diagnostizierende Koloniemorphologie.

Hierbei wurden Größe, Farbe, Form und Oberflächenbeschaffenheit abhängig vom Nährboden beurteilt (Tab. 20).

Mikroskopie

Zur Bakteriendifferenzierung und Bestätigung kamen verschiedene mikroskopische Techniken zum Einsatz.

Gramfärbung

Zur Erstellung eines Bakterienpräparates wurde eine Öse Bouillon auf einen Objektträger aufgebracht oder eine Bakterienkolonie in einen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung auf einem Objektträger verrieben.

Nach Hitzefixierung erfolgte eine Färbung nach Gram.

Toluidinblaufärbung

Direktausstriche von Produkten wurden über Nacht luftgetrocknet, für 10 sec. in Toluidinblau (2mg/ml) getaucht und der Objektträger luftgetrocknet.

Nativpräparate

Eine Öse Bouillon oder eine in einen Tropfen Natriumchloridlösung (8,5 mg/ml) eingeriebene Kolonie wurden mit einem Deckgläschen abgedeckt.

Nach Trocknung des Ausstriches wurde unter dem Lichtmikroskop mit 1000-facher Vergrößerung unter Ölimmersion die Morphologie der Mikroorganismen wie Größe, Form, Granularität und Färbeverhalten beurteilt.

Die Nativpräparate wurden mit Phasenkontrast-3 und 1000-facher Vergrößerung unter Ölimmersion betrachtet und die Morphologie der Bakterien hinsichtlich Größe, Form und Granularität beurteilt.

Auswertung

Nach makroskopischer und mikroskopischer Beurteilung der Bakterienkolonien erfolgte die Zählung ≥ 5 und ≤ 300 Kolonien/Platte. Die Berechnung des gewogenen arithmetischen Mittelwertes (\bar{c}) erfolgte anhand der Farmiloe'schen Formel.

Farmiloe'sche Formel:

$$\bar{c} = \frac{\sum c}{n_1 \times 1 + n_2 \times 0,1} \times d$$

\bar{c} = gewogener Mittelwert, Anzahl der KbE/ml

$\sum c$ = Summe der KbE aller Platten, die zur Berechnung herangezogen werden (niedrigste und nächsthöhere auswertbare Verdünnungsstufe)

n_1 = Anzahl der Platten der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe, die zur Berechnung herangezogen werden (höhere Koloniezahl)

n_2 = Anzahl der Platten der nächsthöheren Verdünnungsstufe

d = Faktor der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe (n_1)

Das Ergebnis wurde auf eine Dezimalstelle hinter dem Komma aufgerundet.

Zu einer anschaulicheren Darstellung der Ergebnisse wurden die ermittelten Keimzahlen (KbE/ml oder KbE/g) zur Basis Zehn logarithmiert (\lg KbE/ml oder \lg KbE/g) und auf zwei Dezimalstellen hinter dem Komma gerundet.

Die Nachweisgrenze lag bei $1,00 \times 10^2$ KbE/ml = 2,00 \lg KbE/ml. Für Keimzahlen unterhalb der Nachweisgrenze wurde mit $5,00 \times 10^1$ KbE/ml = 1,7 \lg KbE/ml die halbe Nachweisgrenze festgelegt.

Die Resultate mikrobiologischer Keimzählverfahren sind - wie alle Analysenergebnisse - mit Messunsicherheiten behaftet (HILDEBRANDT u. WICHMANN-SCHAUER 2005), wobei die Messunsicherheit für die Präzision einer Analyse steht.

Als eindeutige, methodenunabhängige Abweichungen bei eigenen Untersuchungen galten Keimzahldifferenzen von mindestens $|\Delta KZ| = 0,70 \lg \text{KbE/ml}$.

Für die Festlegung dieses Wertes wurden Präzisionsdaten aus Ringversuchen herangezogen, die in der Methode L 00.00-88 „Horizontales Verfahren für die Zählung von Mikroorganismen“ der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren (BVL 2005) nach § 64 LFGB (= Norm DIN EN ISO 4833) dargelegt sind.

Präzisionsdaten sind von der Zusammensetzung der Keimflora und der Matrix des Untersuchungsgutes abhängig. Die in der genannten Methode vorgelegten Daten wurden aus Ringversuchen abgeleitet und für Rohmilch und pasteurisierte Milch validiert und dürfen als Schätzwerte für andere Produkte verwendet werden.

Die Wiederholpräzision bezeichnet die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen voneinander unabhängigen Untersuchungsergebnissen, welche der gleiche Bearbeiter mit den gleichen Verfahren an identischem Untersuchungsmaterial im gleichen Labor mit der gleichen Geräteausstattung innerhalb einer kurzen Zeitspanne erhält. Als Grenzwert für die Wiederholpräzision wird in der oben beschriebenen Methode $r = 0,25 \lg \text{KbE/ml}$ angegeben.

Die Vergleichspräzision beschreibt die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen, voneinander unabhängigen Untersuchungsergebnissen, die verschiedene Bearbeiter mit dem gleichen Verfahren an identischem Untersuchungsmaterial in verschiedenen Laboren mit unterschiedlicher Geräteausstattung erhalten. Der hier nach der oben genannten Methode anzunehmende Wert der Vergleichspräzision ist $R = 0,45 \lg \text{KbE/ml}$.

Addiert man die genannten Werte für Wiederholpräzision und Vergleichspräzision (r und R), ergibt sich ein Wert $r (0,25) + R (0,45) = 0,70 \lg \text{KbE/ml}$. So konnte sichergestellt werden, dass Keimzahldifferenzen von $|\Delta KZ| = 0,70 \lg \text{KbE/ml}$ der eigenen Untersuchungen auf eindeutigen, methodenunabhängigen Abweichungen beruhen. Obgleich alle Untersuchungen von einer Person durchgeführt wurden, fand der Personen-Methodenfehler (Wiederholpräzision r) und der Interlabor-Methodenfehler (Vergleichspräzision R) Berücksichtigung.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte rein deskriptiv.

3.2.1.2 Mischkulturen

Milchprodukte wurden nach dem Erwerb bei $4\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ gelagert und zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 21 und Tag 42 untersucht, wobei der Tag 21 dem MHD entsprach.

Bei Milchmischprodukten wurde die erste Verdünnungsstufe aus 10 ml Produkt und 90 ml $\frac{1}{4}$ - starker Ringerlösung hergestellt.

Von Produkten in flüssiger Form wurde nach gründlicher Durchmischung je 1 ml als Ausgangsmaterial in die Verdünnungsreihe überführt.

Bei pulverförmigen Produkten erfolgte die Vorlage von 1 g durch Einwaage in ein Reagenzglasröhrchen und die Zugabe von 9 ml der entsprechenden Verdünnungslösung. Kapseln wurden zur Entnahme des enthaltenen Pulvers steril aufgebrochen und des Weiteren wie Pulver behandelt.

Weitere Verdünnungsschritte erfolgten durch Überbringen von 1 ml Probenverdünnung in 9 ml Verdünnungsmedium wie für die Reinkultur beschrieben.

Die Keimisolierung erfolgte durch den Einsatz von Elektiv- und Selektivmedien im Doppelansatz mittels OSV bei anaerober Bebrütung für $48-72 \pm 2\text{ h}$ bei $37 \pm 0,5\text{ °C}$.

E. coli wurde aerob für $24 \pm 1\text{ h}$ bei $37 \pm 0,5\text{ °C}$ bebrütet.

Die makroskopische Koloniebeurteilungen sowie die Bestätigung durch das mikroskopische Bild erlaubte eine zuverlässige Keimzahlbestimmung (Tab. 20).

Die Auswertung erfolgte wie für die Reinkultur beschrieben mit der Farmiloe'schen Formel in lg KbE/ml.

Tabelle 20: Phänotypisches Erscheinungsbild der eingesetzten Bakterien auf den verschiedenen Nährmedien

Genus/Spezies	Nährmedien						Mikroskopisches Bild
	MRS	MRS-V	RCM	MUP	M 17	X-Glu	
<i>L. acidophilus</i> -Gruppe	bis 3 mm, gräulich-weiße, rauhe (selten glatte) Kolonien	-	-	-	-	mittelgroße mattrauhe, taubenblaue, leicht gewölbte Kolonien	grampositive, mittellange gebogene „spaghettifähnliche“ Stäbchen, Kettenbildung
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	2-3 mm große, matt-graue fädig-rauhe, mittig erhabene Kolonien	-	-	-	-	weiße, rauhe Kolonien, leicht erhaben	grampositive, lange, spaghettiförmige Stäbchen mit Volutin-Granula
<i>L. casei</i> -Gruppe	2-4 mm große, strahlend weiße, glatt-glänzende, gewölbte Kolonien	-	-	-	-	siehe MRS	grampositive, gerade unifforme kurze Stäbchen
<i>Bifidobacterium</i> spp.	1 mm große, feine, wachsige, glatte, leicht gewölbte Kolonien	-	sehr feine bis 2 mm große, wachsige-beige bis milchig-weiße, glatt-glänzende, leicht gewölbte Kolonien	-	-	siehe MRS	grampositive kurze bis mittellange polymorphe Stäbchen (Knochen-, Keulen-, Y-Form)
<i>Streptococcus thermophilus</i>	-	-	-	-	bis 5 mm große, beige-graue, flache, glatt-glänzende Kolonien	-	grampositive große Kokken in Ketten, teil ovoid und rhomboid

3.2.2 Durchflusszytometer

3.2.2.1 FACSCalibur®

Im hier verwendeten FACSCalibur®-Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) wird ein Dual-Lasersystem eingesetzt. Die in einer Trägerflüssigkeit gelösten Probenpartikel werden durch den Druck des äußeren Hüllstromes im Probenführungssystem vereinzelnd und kreuzen hintereinander den Strahl der Lasereinheit.

Der Argonlaser erzeugt monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm, während der ihm zeitlich nachgeschaltete Diodenlaser Licht der Wellenlänge 635 nm generiert. Neben den Streulichtdetektoren gehören noch drei Fluoreszenzdetektoren (FL) zum Argonlaser: FL-1 registriert Licht im Bereich von 500-560 nm (Grünfluoreszenz), FL-2 detektiert Licht von 543-627 nm (Orangefluoreszenz) und FL-3 arbeitet im Bereich von ≥ 650 nm (Rotfluoreszenz). Der Detektor FL-4 ist dem Diodenlaser zugeordnet und erfasst Ereignisse, die Licht im Bereich von 645-676 nm (Rotfluoreszenz) emittieren und in einem definierten zeitlichem Abstand nach der Passage des Argonlasers auftreten. Kurzes Anregungslicht hebt hierbei Elektronen auf ein höheres Energieniveau des Atoms (äußere Schale), welche unter Photonenemission in den Grundzustand (innere Schale) zurückkehren, wobei sowohl die Anregungswellenlänge als auch die chemischen Eigenschaften des Farbstoffes Einfluß nehmen.

Je Partikel werden bis zu 6 Parameter (FSC, SSC, FL1-4) erfasst. Hierbei wird die Fluoreszenzintensität logarithmisch verstärkt und auf einer Skala mit 1024 Kanälen, die 4 Log-Dekaden entsprechen, dargestellt. Ein Messergebnis ist also abhängig von einer bestimmten Geräteeinstellung und den optischen Eigenschaften des den Laserstrahl passierenden Partikels. Die Kontrolle der Geräteeinstellungen sowie die Datenerfassung und Speicherung erfolgt über die dem FACS angeschlossene Computereinheit.

Die Auswertung der Messwerte erfolgt über die Programme CellquestPro® und WINMDI®.

Die Programme ermöglichen die Darstellung eines Parameters gegen die Zahl der gemessenen Ereignisse in Form eines Histogramms oder die Darstellung von zwei unterschiedlichen Parametern gegeneinander in Form eines Punktediagramms. Die Zahl der gemessenen Partikel, welche eine bestimmte Eigenschaft besitzen, lässt sich so erfassen und in prozentualen Anteilen zur Gesamtmenge der bestimmten Partikel ausdrücken.

Durch das Definieren von elektronischen Fenstern (gates) in Zwei-Parameter-Diagrammen lassen sich Untergruppen von Messereignissen einzeln analysieren. Auch können mehrere Fenster gleichzeitig gesetzt werden, wodurch sich die Anzahl bestimmter Messereignisse, der prozentuale Anteil einer Untergruppe an der Gesamtereignismenge oder der mittlere Wert eines Parameters für die Ereignisgruppe ermitteln lässt.

Um Proben im Durchflusszytometer messen zu können, müssen sie in dünnflüssiger Form vorliegen. Milchprodukte müssen verdünnt, feste Stoffe zerkleinert und gelöst werden, da sonst die empfindlichen Schlauchsysteme verstopfen oder der Laser keine Einzelpartikel, sondern Konglomerate misst.

Als Messgeschwindigkeit lässt sich manuell zwischen langsam („lo“)- mittel („med“) und schnell („hi“) wählen, was die Partikelkonzentration aber nur bedingt ausgleichen kann. Eine zu hoch konzentrierte Probe bewirkt eine zu große Anzahl an Messereignissen pro Sekunde (> 1.000/sec), wodurch die Messgenauigkeit eingeschränkt wird (Abgrenzung und Platzierung der Punktwolken). Eine grobe Anpassung der Partikelzahl pro ml durch Verdünnung ist sinnvoll.

3.2.2.2 Qualitativer Nachweis

Farbstoffe

Um eine Aussage über die Vitalität der untersuchten Bakterien treffen zu können, wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe (SYTO[®]9, TO-PRO[®]-3, PJ) einzeln und in Kombination eingesetzt.

Die Stocklösung von SYTO[®]9 mit einer Konzentration von 5 mmol/l wurde 1:1000 mit PBS verdünnt und in Aliquots bei -28°C gelagert. Zu jeder Probe wurden 50 µl der frisch aufgetauten Lösung gegeben (Endkonzentration 0,5 µmol/l).

Die Stocklösung von TO-PRO[®]-3 mit einer Konzentration von 1 mmol/l wurde 1:1000 mit PBS verdünnt und in Aliquots bei -28°C gelagert. Zu jeder Probe wurden 50 µl der frisch aufgetauten Lösung gegeben (Endkonzentration 0,1 µmol/l).

Aus der kristallinen Trockensubstanz von PJ wurde mit Hilfe von PBS eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100 µg/ml hergestellt. Diese wurde in 1 ml-Aliquots portioniert und bei -20°C eingefroren. Für die Durchflusszytometrie wurden 40 µl der Stammlösung in 1 ml

Sheath-fluid gelöst, so dass die Endkonzentration der Gebrauchslösung von Propidiumjodid 4 µg/ml betrug.

Die Farbstoffe differieren in ihren Spektralcharakteristika und ihrer Fähigkeit, Zellen zu penetrieren und zeigen eine vielfache Emissionsverstärkung nach Bindung an Nukleinsäure. In Kombination ermöglichen sie durch die Konkurrenz um DNA-Bindungsstellen eine gezielte Kenntlichmachung toter und vitaler Zellen. So verdrängen PJ und TO-PRO[®]-3 als Totfarbstoffe z.B. SYTO[®]9, welches dann nur noch in vitalen Zellen fluoresziert während PJ und TO-PRO[®]-3 an die toten Zellen binden.

Für die Untersuchung im FACSCalibur wurden 50 µl Bakteriensuspension (Reinkultur in Bouillon oder Produktproben) aus der dezimalen Verdünnungsreihe der kulturellen Keimzahlbestimmung (siehe Kap. 3.2.1) mit 50 µl Farbstoff (SYTO[®]9 und/oder TO-PRO[®]-3 und/oder PJ) und 400 bzw. 350 µl PBS versetzt, so dass das Endvolumen stets 500 µl ergab. Die Untersuchung erfolgte im Doppelansatz. Bis zum Messen der Proben wurden diese kühl (4 °C ± 0,5 °C) und dunkel mindestens 10 min. gelagert (Einwirkzeit der Farbstoffe), vor Messbeginn wurden die Proben kurz aufgeschüttelt (Heidolph[®] Reax top). Dann wurde das FACS-Probenröhrchen unter den Kipparm des FACS eingespannt, der Einsaugvorgang gestartet („run“) und nach 5 sec. die computergestützte Messung begonnen. Gemessen wurden 20.000 Ereignisse bei ca. 1.000 Ereignissen („events“) pro Sekunde.

Zur Auswertung wurden die Messkanäle Fl-1, Fl-2, Fl-3 und Fl-4 herangezogen. Tote, mit TO-PRO[®]-3 angefärbte Zellen zeigten in Fl-4 starke Fluoreszenz. Vitale Zellen fluoreszierten mit SYTO[®]9 besonders in Fl-3. Starke Fluoreszenz zeigte sich durch eine im Dotplot des entsprechenden Fluoreszenzkanals weit rechts sitzende Punktwolke.

3.2.2.3 Quantitativer Nachweis

Da die Aufnahme der Probenmenge pro Sekunde im FACSCalibur[®] nicht geeicht ist, sind über Routine-Messungen keine genauen Angaben über die Menge der gemessenen Partikel möglich. Die Messergebnisse können lediglich zueinander in Beziehung gesetzt und so eine Aussage über die prozentuale Verteilung getroffen werden.

Die Zugabe einer definierten Anzahl Partikel bzw. Beads bei bekannten Volumen ermöglicht es, diese mit der unbekannt Menge zu zählender Bakterien in ein Verhältnis zu setzen und so über Dreisätze zu berechnen.

Beads

Zur Quantifizierung wurden 25 µl Beads (PeakFlow™Orange flow cytometry reference beads 2,5 µm, $1,2 \times 10^8$) je Probe zugegeben.

Vor der Zugabe der Beads zur Probe wurden diese 5 Minuten in einem kalten Ultraschallbad gelöst und ebenso wie vor Messbeginn vorgetext.

Die Messungen zur Quantifizierung wurden stets im Dreifachansatz durchgeführt.

Wie bei der qualitativen Bestimmung wurde das Messtempo so gewählt, dass pro Sekunde bis zu 1.000 Ereignisse gemessen wurden, je Ansatz wurden 20.000 Ereignisse gemessen.

Nach jeder Messung von mit Beads versetzten Proben wurde das Probenleitsystem wenigstens 3 mal gegen die Sogrichtung gespült („geprimet“). Dann wurde mit 1 %iger Natriumhypochloridlösung und A. tridest. mindestens 5 min. nachgespült, bis keine Beads mehr im Meßsystem nachweisbar waren. Bei Leermessungen auf „Hi“ musste die Anzahl der Messereignisse unterhalb von 3.000 (pure 1 %ige Natriumhypochloridlösung) bzw. 6.000 (pures A. tridest.) events/sec. liegen.

Die quantitative Untersuchung von Reinkulturen mit und ohne Milchezusatz und Produkten erfolgte aus der Verdünnung 10^{-2} . Bei fettreichen Produkten wurde zusätzlich die Verdünnung 10^{-3} untersucht.

Die Zusammensetzung der einzelnen Ansätze sind Tabelle 21 zu entnehmen.

Tabelle 21: Befüllung der einzelnen FACS-Probenröhrchen

Ansatz	Bakterien-suspension [μl]	PBS [μl]	TO-PRO [μl]	SYTO [μl]	PJ [μl]	Beads [μl]
1	100	400				
2	100	350	50			
3	100	350		50		
4	100	225	50		100	
5	100	300			100	
6	100	275	50	50		25
7 ¹⁾	100	275	50	50		25

¹⁾ = Bakteriensuspension aus Verdünnung 10^{-3} (nur für Produkte und fetthaltige Proben)

3.2.2.4 Nachweisgrenze

Um die Nachweisgrenze der durchflusszytometrischen Methodik festlegen zu können, fand ein direkter Vergleich der aus einer Probe sowohl mit dem Durchflusszytometer, als auch mit kulturellen Nachweismethoden ermittelten Keimzahl statt.

Eingesetzt wurden Reinkulturen der Stämme *B. lactis* (S-1), *B. breve* (S-9), *L. casei* (S-16), *L. casei* Shirota (S-26), *L. acidophilus* (S-12), welche in RCM- bzw. MRS-Bouillon für 24 ± 1 h bei $37 \pm 0,5$ °C anaerob bebrütet wurden, sowie ein fermentiertes Milchmischgetränk, in welchem als einziges Bakterium ein *Lactobacillus* (*L. casei* Shirota) als Reinkultur zum Einsatz kam.

Der Versuch wurde mit *L. casei* (S-16) 3 mal durchgeführt, mit den anderen Bakterien 1 mal. Ausgehend von der ersten Verdünnungsreihe diente zusätzlich jede Verdünnungsstufe als Ursprung für eine weitere Verdünnungsreihe, um die jeweilige Keimzahl der einzelnen Verdünnungsschritte zu bestätigen.

Nach dem Anlegen einer dezimalen Verdünnungsreihe und Untersuchung mittels OSV (Kap. 3.2.1) erfolgte eine quantitative Bestimmung der Keimzahl im Durchflusszytometer.

Aus jeder Bouillon der Reinkultur sowie aus jedem Röhrchen der Verdünnungsstufen wurden 100 μl in ein FACS-Röhrchen überbracht, in dem schon 375 μl Gemisch (je 50 μl Farbstoff

TO-PRO und/oder SYTO und/oder PJ, aufgefüllt mit PBS) vorgelegt waren. Dann wurden zur Quantifizierung 25 µl Beads zugegeben, so dass jedes Röhrchen stets 500 µl Probenvolumen enthielt.

Nach dem Einwirken der Farbstoffe wurden die Proben aufgeschüttelt und im FACS gemessen (siehe Kap. 3.2.2.2). Das Spülen erfolgte wie unter Kap. 3.2.2.3 beschrieben.

3.2.2.5 Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit CellquestPro® und WINMDI® als Punktediagramm in SSC/FSC, Fl-1 bis Fl-4 sowie bei Bedarf in Fl-1/Fl-2, Fl-1/ Fl-3, Fl-2/Fl-3, Fl-3/Fl-4 und Fl-Fl-4.

Nach dem manuellen markieren („gaten“) der einzelnen Punktwolken – bei der tot/lebend Unterscheidung meist mittels Quadrantenkreuz, bei der quantitativen Auswertung mittels selbst eingezeichneter Regionen - wurden aus der Statistik die einzelnen Daten in Auswertungsprotokolle überführt. Zur besseren Auftrennung bei überlappenden Punktwolken wurde parallel in verschiedenen Fluoreszenzkanälen und Auftragsmodalitäten (z.B. SSC gegen Fl-1, Fl-1 gegen Fl-3) einer Messung gearbeitet.

Aus den als Bakterien identifizierten Messereignissen der drei Messungen pro Probenansatz wurde der Mittelwert berechnet. Dieser wurde mit dem Mittelwert der Beads-Anzahl in ein Excel-Programm eingepflegt. Das Programm berechnete wie folgt über Dreisätze die Anzahl der in der Probe vorliegenden Bakterien/ml.

Berechnungsformel:

$$\frac{\text{Anzahl Bakterien}}{\text{Anzahl Beads}} \times \frac{\text{Volumen Beads}}{\text{Volumen Bakterien}} \times \text{Konzentration Beads} = \text{Konzentration Bakterien}$$

Um die Anzahl der Bakterien in der Ausgangslösung zu bestimmen, wird die ermittelte Konzentration an Bakterien in der Probenlösung mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.

3 MATERIAL UND METHODE

4 ERGEBNISSE

Die Vitalitätsbestimmung und der quantitative Nachweis wurde sowohl mit dem Oberflächenspatelverfahren als auch mit dem Durchflusszytometer durchgeführt, wobei die mittels OSV gewonnenen Werte als Grundlage zur Beurteilung der FACS-Werte dienen. Zunächst wurden die Methoden anhand von Reinkulturen etabliert und standardisiert. Dann wurden die Methoden an Produkten angewandt.

4.1. Vitalitätsbestimmung

Um die Vitalität der Bakterienzellen im FACS bestimmen zu können, wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, die je nach Membranzustand eine Zelle als vital oder tot im entsprechenden Fluoreszenzkanal sichtbar werden lassen.

4.1.1 Reinkultur

Durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen (SYTO[®]9, TO-PRO[®]-3, PJ) wurden verschiedene Parameter (Kap. 3.1.4) messbar. Das Durchflusszytometer erlaubte die Trennung vitaler und toter Bakterien anhand ihres Färbeverhaltens sowie eine genaue Aussage über die prozentuale Verteilung dieser Parameter. Insbesondere die Farbstoffe TO-PRO[®] und PJ ließen eine Trennung zwischen tot und lebend erkennen. Als Beispiel sind in Abbildung 1 vitale und tote Bakterienwolken von *L. reuteri* im Dotplot dargestellt.

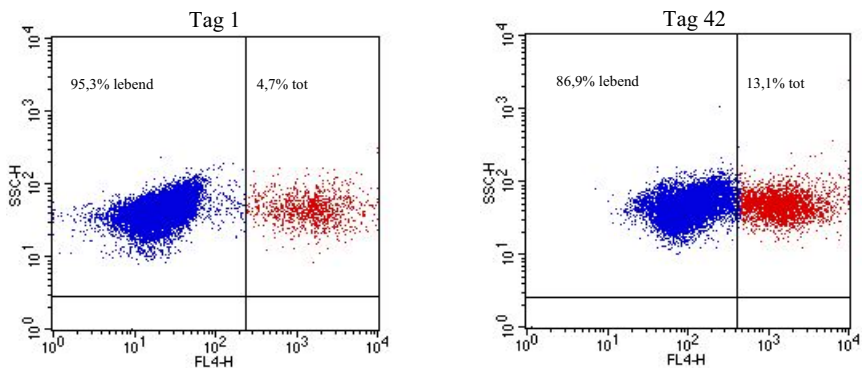


Abbildung 1: Dotplot von *L. reuteri* im Laufe der Lagerung

4 ERGEBNISSE

Bei der Messung der 12 Bakterien als Reinkulturen im Durchflusszytometer wiesen die Werte deutliche Parallelen zu den im Spatelverfahren ermittelten Keimzahlen auf (Tab. 22).

Der Vitalitätsunterschied war nur zwischen Tag 1 und Tag 42 signifikant. So nahm die Anzahl der toten Bakterien für *B. breve* um 67,3 %, für *B. longum* um 91,3 % und für *L. johnsonii* um 79,7 % zu. Anders als die *L. acidophilus*-Gruppe behielt die *L. casei*-Gruppe im Verlaufe der Lagerung gleichbleibende Keimzahlen. Ein ähnliches Bild bot sich bei der konventionellen Untersuchung auf RCM- bzw. MRS-Agar.

Die Keimzahlbestimmung der 12 Reinkulturen auf den verschiedenen Nährböden mittels OSV zeigte, dass die meisten Stämme während der 42tägigen Lagerung stabil blieben ($|\Delta \text{KZ}| = < 0,7 \text{ lg KbE/ml}$).

Lediglich 2 Stämme der Gattung *Bifidobacterium* und ein Stamm der Gattung *Lactobacillus* zeigten eine deutliche Abnahme ihrer Keimzahl, nämlich *B. breve* um 8,1 lg KbE/ml, *B. longum* um 6,8 lg KbE/ml und *L. johnsonii* um 3,7 KbE/ml. Die Ergebnisse beider Methoden sind in Tabelle 22 dargestellt.

4 ERGEBNISSE

Tabelle 22: Keimzahl der Bifidobakterien und Laktobazillen und der Anteil der toten Bakterien (T [%]) an Tag 1, 21 und 42 der Lagerung

Stamm ¹⁾	KZ ²⁾ 1	KZ 21	KZ 42	Δ KZ 1-21	Δ KZ 1-42	T ³⁾ 1	T 42	Absterbe Tendenz
<i>B. animalis</i> (S-4)	8,26	8,30	8,60	0,05	0,35	6,8	15,0	→
<i>B. lactis</i> (S-1)	9,43	9,28	9,42	0,15	0,02	6,0	18,8	→
<i>B. bifidum</i> ^T (S-10)	9,08	9,20	9,00	0,12	0,08	16,9	23,2	→
<i>B. infantis</i> ^T (S-8)	8,59	8,54	8,36	0,05	0,23	51,5	77,3	→
<i>B. longum</i> ^T (S-7)	7,85	1,70	1,70	6,85	6,84	3,5	94,8	↓↓
<i>B. breve</i> ^T (S-9)	9,08	2,40	1,70	6,68	8,08	19,3	86,6	↓↓
<i>L. casei</i> ^T (S-16)	8,73	9,11	8,98	0,38	0,35	1,8	4,5	→
<i>L. rhamnosus</i> ^T (S-17)	9,23	9,32	8,97	0,09	0,25	1,4	7,5	→
<i>L. reuteri</i> ^T (S-15)	8,79	8,64	7,99	0,14	0,79	4,8	13,4	↓
<i>L. acidophilus</i> ^T (S-12)	8,26	7,52	6,82	0,74	1,44	8,1	31,2	↓
<i>L. bulgaricus</i> ^T (S-23)*	8,51	7,80	7,00	0,71	1,51	0,5	26,1	↓
<i>L. johnsonii</i> ^T (S-14)	9,08	9,30	5,40	0,22	3,68	20,0	99,7	↓↓

¹⁾ T = Typstamm ²⁾ KZ = Keimzahl [lg KbE/ml] ³⁾ T = Anteil toter Bakterienzellen [%]

* = *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

4.1.2 Milchlischerzeugnisse

Eine Zuordnung der Bakterienwolken zu den verschiedenen Keimgruppen war anhand der Punktediagramme nur bei Monokulturen –wie in Abbildung 2 gezeigt- möglich. Teilweise konnten tote und lebende Anteile dargestellt werden, Fettpartikel und mehrere Bakterienwolken in einem Punktediagramm verhinderten aber eine nähere Spezifikation bei Mischkulturen, wie in Abbildung 3 zu sehen ist.

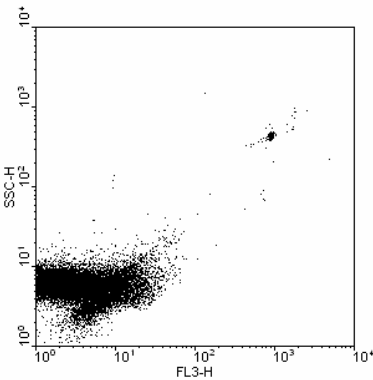


Abbildung 2: Produkt 8 mit Monokultur von *L. casei*

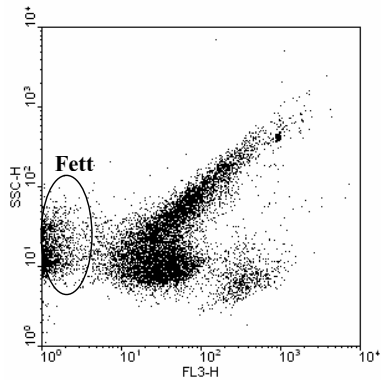


Abbildung 3: Produkt (4) mit Mischkultur

Im Gegensatz dazu zeigte die Untersuchung der 5 Milchprodukte mittels OSV einen signifikanten Einfluß der Lagerungszeit auf die Keimzahl für Stämme der *L. acidophilus*-Gruppe. Die ermittelten Keimgehalte waren bis zum MHD meist stabil, um dann abrupt abzunehmen (bis zu 4 lg KbE/ml). Alle anderen Stämme zeigten ein stabiles Lagerungsverhalten wie in Tabelle 23 ersichtlich. Eine Aufteilung in tote und lebende Bakterien, wie z.B. bei den pharmazeutischen Produkten (Kap. 4.1.3, Abb. 4, 6, 8), war hier durch überlappende Punktwolken und Fettpartikel nicht möglich.

4 ERGEBNISSE

Tabelle 23: Keimzahl der Bifidobakterien und Laktobazillen aus den Produkten an Tag 1, 21 (MHD). 42 der Lagerung

Produkt-Nummer Deklarierte Stämme	KZ1	KZ 21	KZ 42	KZ 1-21	KZ 1-42	Tendenz
1 <i>L. acidophilus</i>	7,89	7,32	3,18	0,58	4,72	↓↓
1 <i>S. thermophilus</i>	9,00	8,72	8,08	0,28	0,92	→
2 <i>L. casei</i>	8,58	8,41	8,28	0,17	0,30	→
2 <i>S. thermophilus</i>	8,56	8,60	8,11	-0,04	0,45	→
3 <i>Bifidobacterium</i> sp.	5,26	5,28	5,38	-0,02	-0,12	→
3 <i>L. acidophilus</i>	7,88	5,74	4,93	2,14	2,95	↓↓
3 <i>S. thermophilus</i>	8,54	8,56	7,92	-0,02	0,62	→
4 <i>Bifidobacterium</i> sp.	1,70	1,70	1,70	0,00	0,00	→
4 <i>L. casei</i>	6,67	6,69	6,88	-0,03	-0,20	→
4 <i>L. acidophilus</i>	7,79	7,46	4,72	0,32	3,06	↓↓
4 <i>S. thermophilus</i>	8,57	8,71	8,48	-0,14	0,09	→
6 <i>L. bulgaricus</i> ¹⁾	1,70	1,70	1,70	0,00	0,00	→
6 <i>Bifidobacterium</i> sp.	6,30	6,23	5,85	0,07	0,45	→
6 <i>L. acidophilus</i>	6,57	5,38	1,70	1,19	4,87	↓↓
6 <i>S. thermophilus</i>	8,41	8,84	8,26	-0,43	0,15	→

¹⁾ = *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

4.1.3 Pharmazeutische Präparate

Untersucht wurden drei verschiedene Präparate in jeweils anderer Darreichungsform: ein flüssiges Produkt (Nr. 11) sowie ein inkapsuliertes (Nr. 12) und ein loses pulverförmiges (Nr. 13) Produkt.

Produkt Nr. 11 (Suspension)

Im flüssigen Präparat ließen sich die Bakterien als gut abgegrenzte Punkt Wolke darstellen. Der Zusatz von TO-PRO erlaubte eine Auftrennung in vitale und tote Bakterien wie in Abbildung 4 ersichtlich. Die im FACS ermittelte Vitalität der *E. coli*-Bakterien sank im Laufe der 5monatigen Lagerung von 93 % auf 54 %. Mittels OSV wurde eine Keimzahl von 8,8 lg KbE/ml bestimmt, die im Laufe der Lagerung (8,2 lg KbE/ml am MHD) auf 7,8 lg KbE/ml zurückging. Die Abnahme der Vitalität von *E. coli* im FACS im Vergleich zu der mittels OSV bestimmten Keimzahl ist in Abbildung 5 dargestellt. Der Untersuchungszeitpunkt 3 entspricht dem MHD, das Untersuchungsintervall betrug einen Monat.

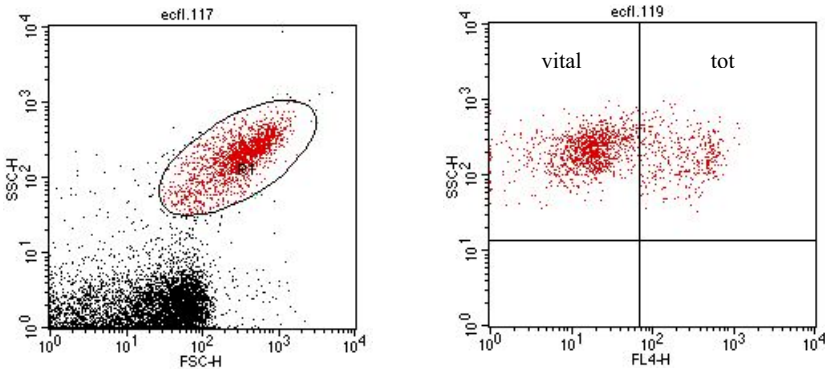


Abbildung 4: Dotplot des flüssigen Präparates mit Bakterienwolke (li.) und Vitalfarbstoffen (re.)

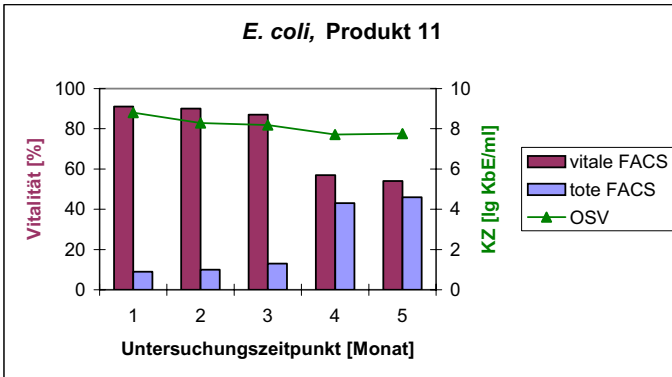


Abbildung 5: Vitalität [%] und Keimzahl [lg KbE/ml] von *E. coli* im FACS bzw. OSV

Produkt Nr. 12 (Kapsel)

Die Vitalität der enthaltenen Bakterien war geringer als die der Bakterien in Produkt 11.

Der Zusatz von TO-PRO erlaubte eine Auftrennung in vitale und tote Bakterien wie in Abbildung 6 ersichtlich. Die im FACS ermittelte Vitalität der *E. coli*-Bakterien sank im Laufe der Lagerung von 41 % auf 19 %. Mittels OSV wurde eine Keimzahl von 10,5 lg KbE/ml bestimmt, die im Laufe der Lagerung (> 9,0 lg KbE/ml am MHD) auf 8,3 lg KbE/ml zurückging. Die Abnahme der Vitalität von *E. coli* im FACS im Vergleich zu der mittels OSV bestimmten Keimzahl ist in Abbildung 7 dargestellt. Das MHD liegt zwischen dem Untersuchungszeitpunkt 3 und 4, das Untersuchungsintervall betrug einen Monat.

4 ERGEBNISSE

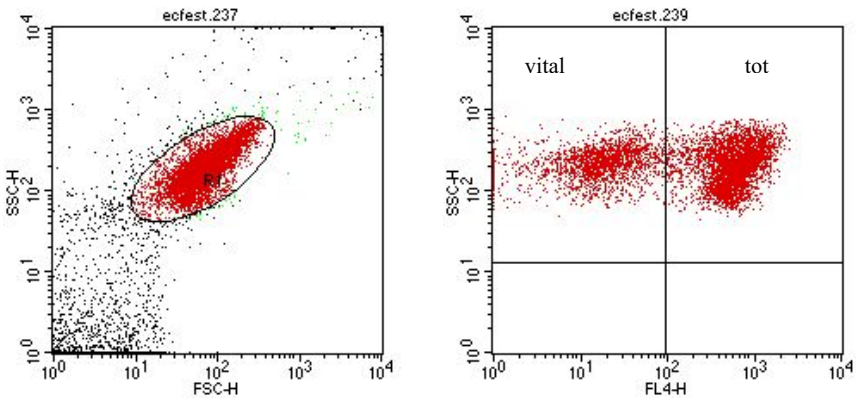


Abbildung 6: Dotplot des pulverförmigen Präparates mit Bakterienwolke

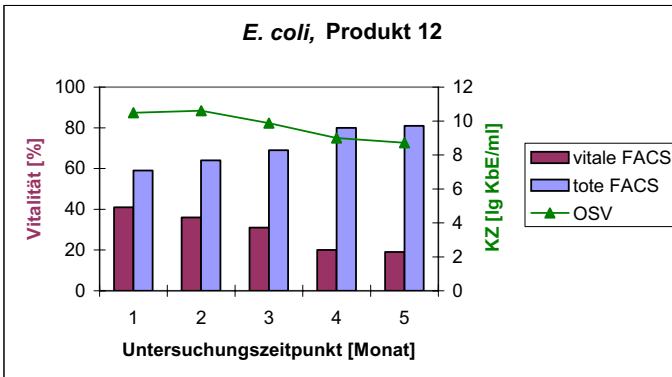


Abbildung 7: Vitalität [%] und Keimzahl [lg KbE/ml] von *E. coli* im FACS bzw. OSV

Produkt Nr. 13 (Pulver)

Im pulverförmigen Produkt ließ sich im FACS die Vitalität einzelner Bakterienwolken bestimmen, allerdings waren die einzelnen Wolken nicht einem bestimmten Bakterienstamm zuzuordnen. Durch Zusatz von TO-PRO lassen sich die DNA-haltigen Messereignisse in lebend und tot auftrennen. Die Vitalität der enthaltenen Bakterien lag bei 50,1 %.

Die Untersuchung mittels OSV ergab einen Gehalt von 8,58 lg KbE/ml *L. paracasei*, 8,28 lg KbE/ml *L. acidophilus*, 8,63 lg KbE/ml *Bifidobacterium* spp. (*B. bifidum*, *B. lactis*) und 9,29 lg KbE/ml *Lc. lactis*.

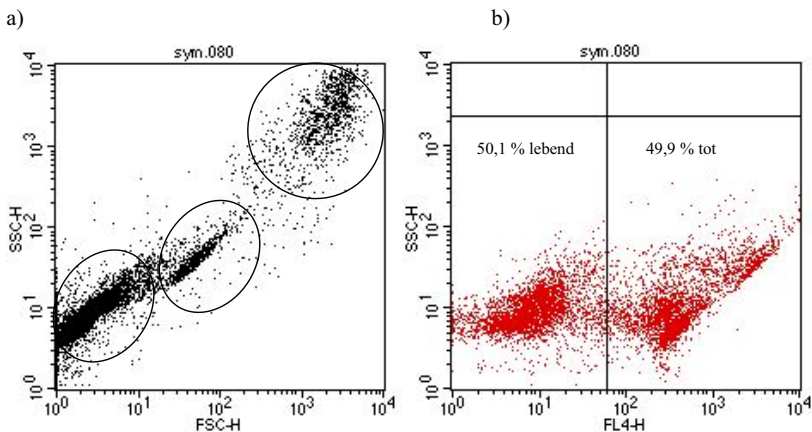


Abbildung 8: Im Dotplot lassen sich drei Wolken erkennen (a), sowie die Vitalität der Bakterien (b)

4.2 Keimzahlbestimmung

Um quantitative Aussagen mittels Durchflusszytometrie treffen zu können wurden Beads eingesetzt.

Diese waren als klar umgrenzte, zentrierte Wolke im Dotplot erkennbar wie Abbildung 9 zeigt.

4 ERGEBNISSE

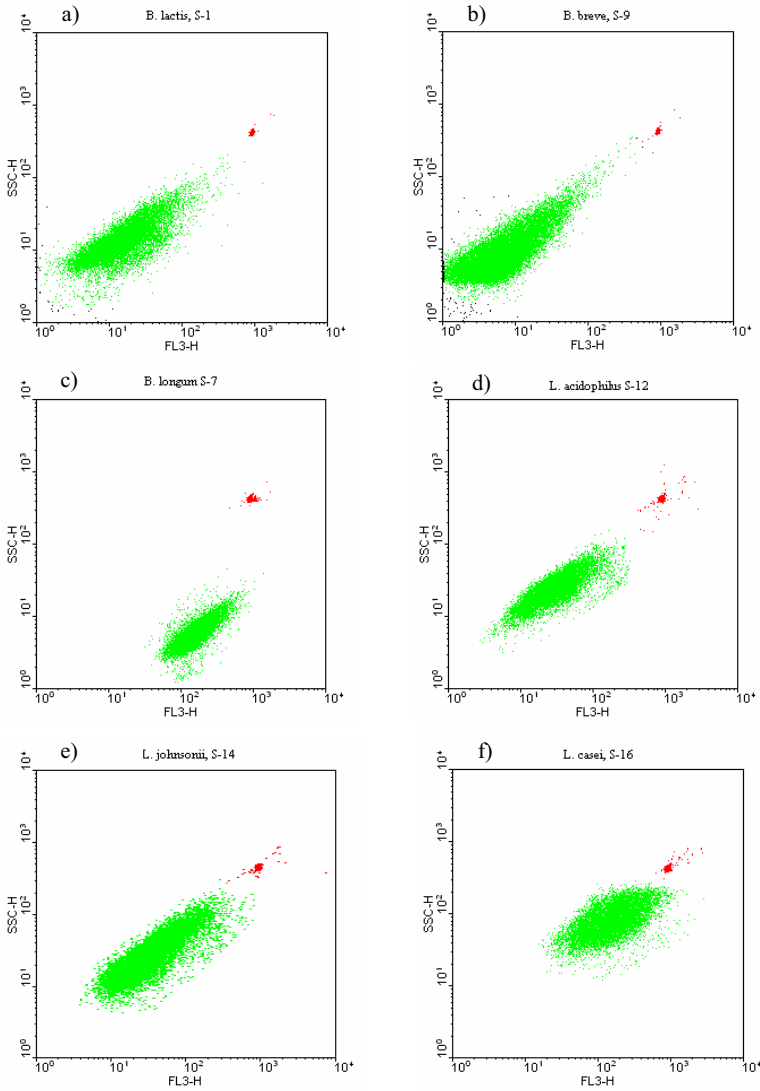


Abbildung 9: Dotplot von *B. lactis*, *B. longum*, *B. breve*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei* (grün) und Beads (rot)

4.2.1 Nachweisgrenze

Nach der Kenntlichmachung vitaler und toter Bakterien mittels Fluoreszenzfarbstoffen und der quantitativen Bestimmung der Bakterien und Beads im FACS erfolgte die rechnerische Bestimmung der Keimzahl.

Um die Nachweisgrenze der Bakterien im Durchflusszytometer zu ermitteln, fanden parallele Untersuchungen von Reinkulturen (*B. lactis*, *B. breve*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. casei* Shirota) und einer Monokultur (Produkt 8, *L. casei* Shirota) mittels OSV und FACS statt. Nach dem Erstellen einer dekadischen Verdünnungsreihe fand ein direkter Vergleich der ermittelten Kbe/ml statt.

B. lactis (S-1)

Abbildung 10 zeigt ein typisches Dotplot mit 6743 vitalen Bakterien (tote Bakterien sind ausgeblendet) und 12281 Beads, im Folgenden wird eine beispielhafte Berechnung durchgeführt.

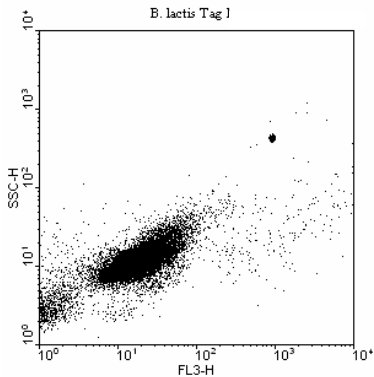


Abbildung 10: Dotplot von *B. lactis* mit 6743 Bakterien (große Wolke) und 12281 Beads (kleine Wolke)

4 ERGEBNISSE

Die Werte wurden in die in Material und Methoden beschriebene Formel eingeflegt:

$$\frac{6743 \text{ Bakterien}}{12281 \text{ Beads}} \times \frac{25 \mu\text{l Beads}}{100 \mu\text{l Bakterien}} \times 1,2 \times 10^5 \text{ Beads} = 1,65 \times 10^7 \text{ Bakterien}$$

Da eine verdünnte Bakterienlösung eingesetzt wurde, muss das berechnete Ergebnis noch mit 10 multipliziert werden. Daraus ergibt sich rechnerisch ein Gehalt von $1,65 \times 10^8$ oder 8,22 lg KbE/ml.

Annähernd gleiche Keimzahlen konnten im Größenbereich von 9,0-6,1 lg KbE/ml ermittelt werden, bei Keimgehalten $\leq 6,1$ lg KbE/ml war die Differenz signifikant ($|\Delta \text{KZ}| = > 0,7$ lg KbE/ml). Während die im FACS ermittelte Keimzahl bei 6,1 lg KbE/ml stagnierte, nahm im OSV die Keimzahl parallel zu der dekadischen Verdünnung der Probe ab, wie Abbildung 11 zeigt.

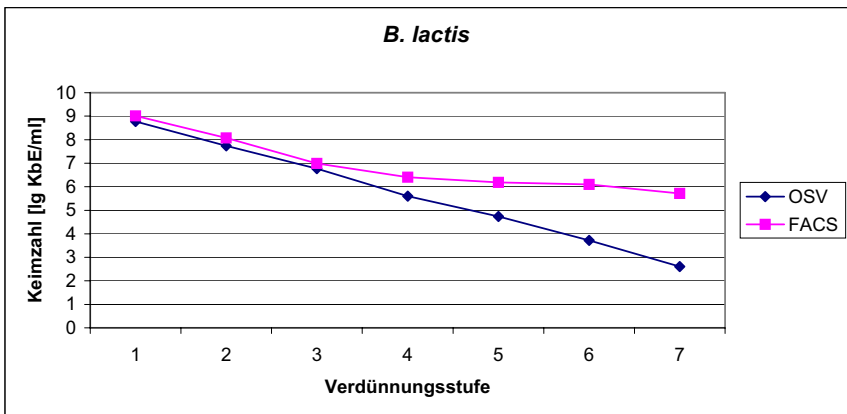


Abbildung 11: Quantifizierung [lg KbE/ml] von *B. lactis* im Oberflächenspatelverfahren und im Durchflusszytometer im Verlauf einer dekadischen Verdünnungsreihe

B. breve (S-9)

Der durch Durchflusszytometrie und OSV bestimmte Keimgehalt war im Bereich von 8,8-5,8 lg KbE/ml gleich, bei Werten $\leq 5,8$ lg KbE/ml zeigte sich ein signifikanter Unterschied. Die im Durchflusszytometer bestimmte Keimzahl sank trotz der dekadisch verdünnten Probe nicht unter 5,8 lg KbE/ml (Abb. 12).

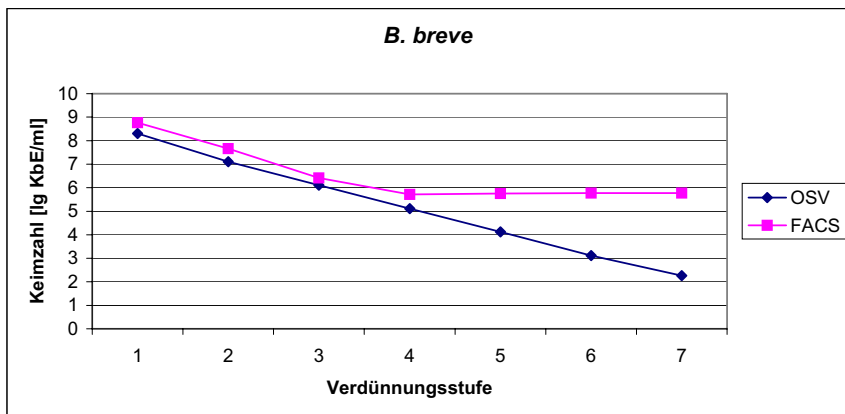


Abbildung 12: Quantifizierung [lg KbE/ml] von *B. breve* im Oberflächenspatelverfahren und im Durchflusszytometer im Verlauf einer dekadischen Verdünnungsreihe

L. johnsonii (S-14)

Nach Anzucht in Bouillon und Untersuchung durch OSV und FACS zeigten die ermittelten Keimgehalte im Bereich von 9,0-4,7 lg KbE/ml gleiche Ergebnisse. Bei Keimgehalten < 4,7 lg war die Differenz signifikant. Die im OSV ermittelten Werte nahmen wie zuvor parallel zu den eingesetzten Verdünnungen ab, die im FACS ermittelten Werte zeigten ab 4,7 lg KbE/ml eine – wie in Abbildung 13 ersichtlich- geringere Abnahme.

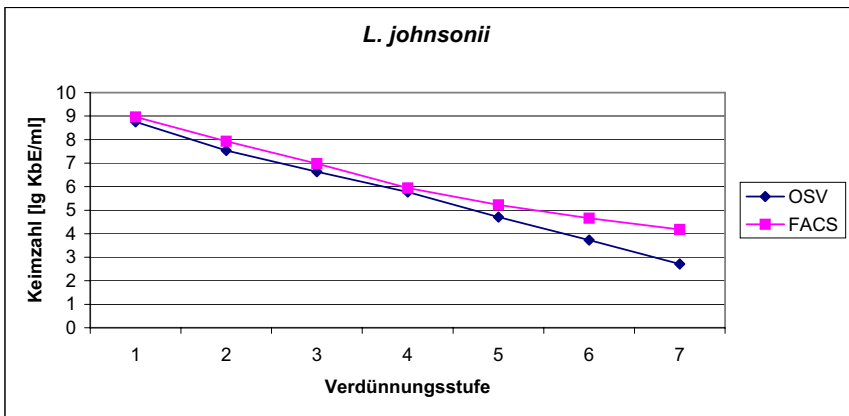


Abbildung 13: Quantifizierung [lg KbE/ml] von *L. johnsonii* im Oberflächenspatelverfahren und im Durchflusszytometer im Verlauf einer dekadischen Verdünnungsreihe

L. casei (S-16)

Die Ergebnisse waren in einem Größenbereich von 8,8-5,8 lg KbE/ml vergleichbar. Unterhalb von 5,8 lg KbE/ml war die Differenz der bestimmten Keimzahlen signifikant, wobei die Keimzahl der FACS-Messung bei Werten um 5,8 lg KbE/ml blieb und die mittels OSV bestimmte Keimzahl weiter abnahm (Abb. 14).

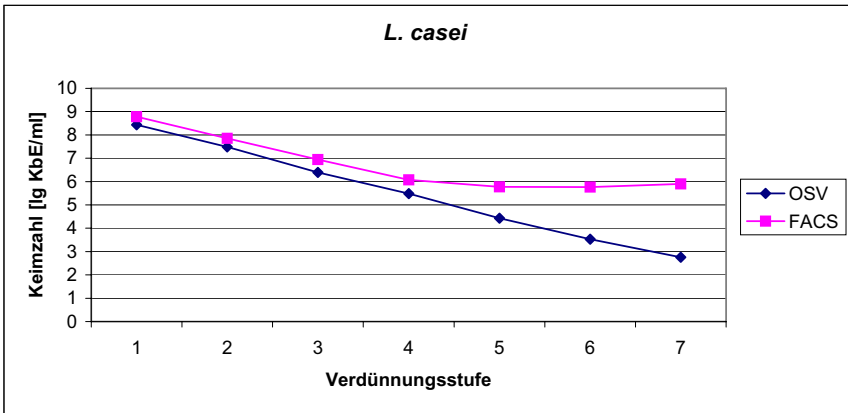


Abbildung 14: Quantifizierung [lg KbE/ml] von *L. casei* im Oberflächenspatelverfahren und im Durchflusszytometer im Verlauf einer dekadischen Verdünnungsreihe

L. casei Shirota (S-26)

Im Bereich von 9,2-6,2 lg KbE/ml waren die ermittelten Keimzahlen beider Nachweisverfahren identisch. Bei niedrigeren Keimzahlen blieben die im FACS ermittelten Werte bei etwa 5,2 lg KbE/ml, während sich die im OSV ermittelten Werte weiter um 1 lg KbE/ml pro dekadischen Verdünnungsschritt verringerten (Abb. 15).

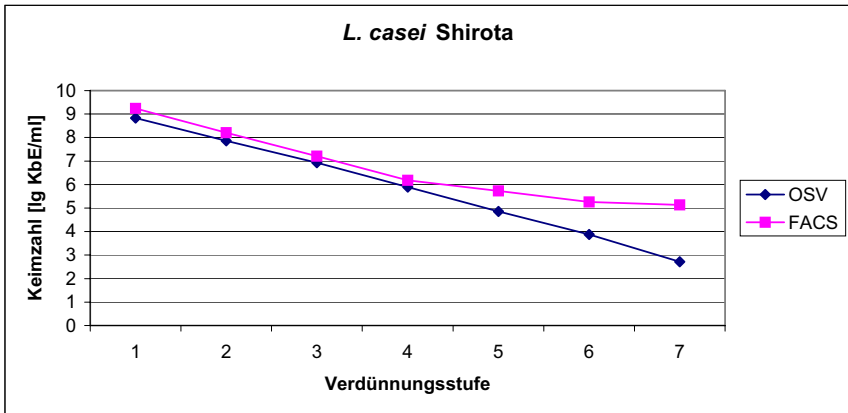


Abbildung 15: Quantifizierung [lg KbE/ml] von *L. casei* Shirota im Oberflächenspatelverfahren und im Durchflusszytometer im Verlauf einer dekadischen Verdünnungsreihe

Produkt 8

Die ermittelten Keimzahlen beider Nachweisverfahren verliefen parallel bei einem Anfangsgehalt von 8,4 lg KbE/ml (FACS) bzw. 7,2 lg KbE/ml (OSV), aber mit einer Differenz von etwa 1 lg KbE/ml. Bei niedrigeren Keimzahlen blieben die im FACS ermittelten Werte bei etwa 4,5 lg KbE/ml, während sich die im OSV ermittelten Werte weiter um 1 lg KbE/ml pro dekadischem Verdünnungsschritt verringerten, wie Abbildung 16 zeigt.

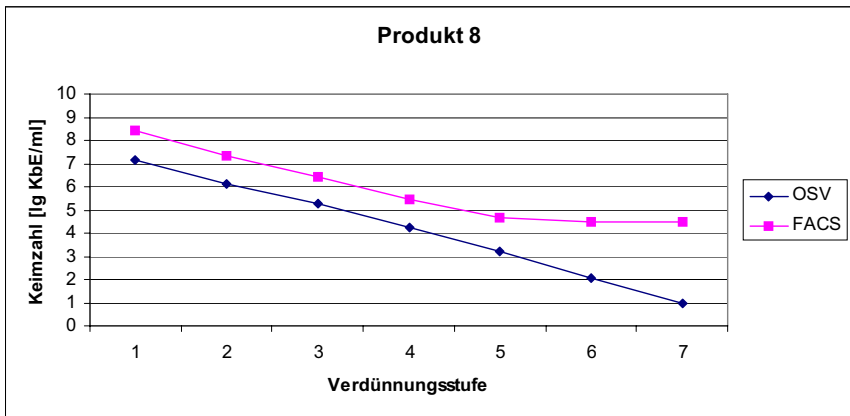


Abbildung 16: Quantifizierung [lg KbE/ml] von Produkt 8 im Oberflächenspatelverfahren und im Durchflusszytometer im Verlauf einer dekadischen Verdünnungsreihe

Die Nachweisgrenze im FACS lag zwischen 4,5 lg KbE/ml und 5,8 lg KbE/ml, wobei sich keine Unterschiede zwischen den Gattungen *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* feststellen ließen.

4.2.2 Reinkultur

Die im FACS durch Zugabe von Beads ermittelten Werte sind mit den im OSV ermittelten Werten in Tabelle 24 dargestellt.

Die Keimzahlbestimmung der Reinkulturen aus Bouillon (7 Stämme der Gattung *Bifidobacterium*, 8 Stämme der Gattung *Lactobacillus*) mit FACS und OSV zeigte nur bei *L. reuteri* (S-15) einen deutlichen Unterschied ($|\Delta \text{KZ}| = 0,83 \text{ lg KbE/ml}$), sonst ergab sich kein signifikanter Unterschied ($|\Delta \text{KZ}| = < 0,7 \text{ lg KbE/ml}$).

Tabelle 24: Keimzahl [lg KbE/ml] der Bifidobakterien- und Laktobazillen-Reinkulturen aus FACS und OSV

Stamm	FACS	OSV
<i>B. animalis</i> (S-6)	9,18	8,92
<i>B. lactis</i> (S-1)	9,07	8,77
<i>B. bifidum</i> ^T (S-10)	7,99	7,48
<i>B. infantis</i> ^T (S-8)	9,31	9,18
<i>B. longum</i> ^T (S-7)	8,02	7,60
<i>B. longum</i> (S-11)	8,98	8,40
<i>B. breve</i> ^T (S-9)	8,82	9,45
<i>L. casei</i> ^T (S-16)	8,84	8,65
<i>L. rhamnosus</i> ^T (S-17)	9,38	9,11
<i>L. reuteri</i> ^T (S-15)	9,34	8,51
<i>L. acidophilus</i> ^T (S-12)	8,51	8,54
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ^T (S-23)	8,56	8,63
<i>L. johnsonii</i> ^T (S-14)	8,96	9,20
<i>L. paracasei</i> ^T (S-26)	9,34	9,36
<i>L. paracasei tolerans</i> ^T (S-18)	7,48	7,36

4.2.3 Reinkultur mit Milchzusatz

Einfluß von Milchfett

Die in Kap. 3.2.1.1 beschriebene Probenzusammensetzung Bouillon mit Ringerlösung (Probe 1) sowie Zusatz von 0,3% (Probe 2) und 3,5 %-fetthaltiger (Probe 3) Milch wurde an Tag 1, Tag 21 und Tag 42 untersucht.

Wie die Abbildung 17 ohne und mit Milchzusatz zeigt, beeinträchtigten höherer Fettgehalte die Auswertung am FACS wegen störender Messereignisse, die eine Abgrenzung der Bakterienwolke erschwerten.

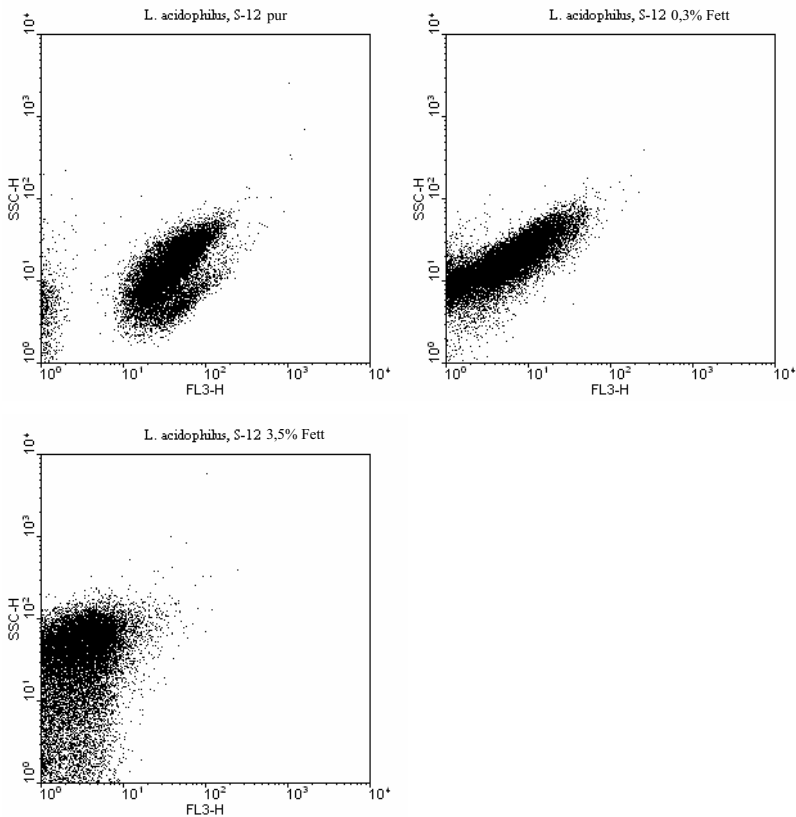


Abbildung 17: Dotplot von *L. acidophilus* (S-12) an Tag 1 mit jeweils gleicher Bakterienkonzentration ohne Milchzusatz, mit 0,3 %- und 3,5 %-fetthaltiger Milch

4 ERGEBNISSE

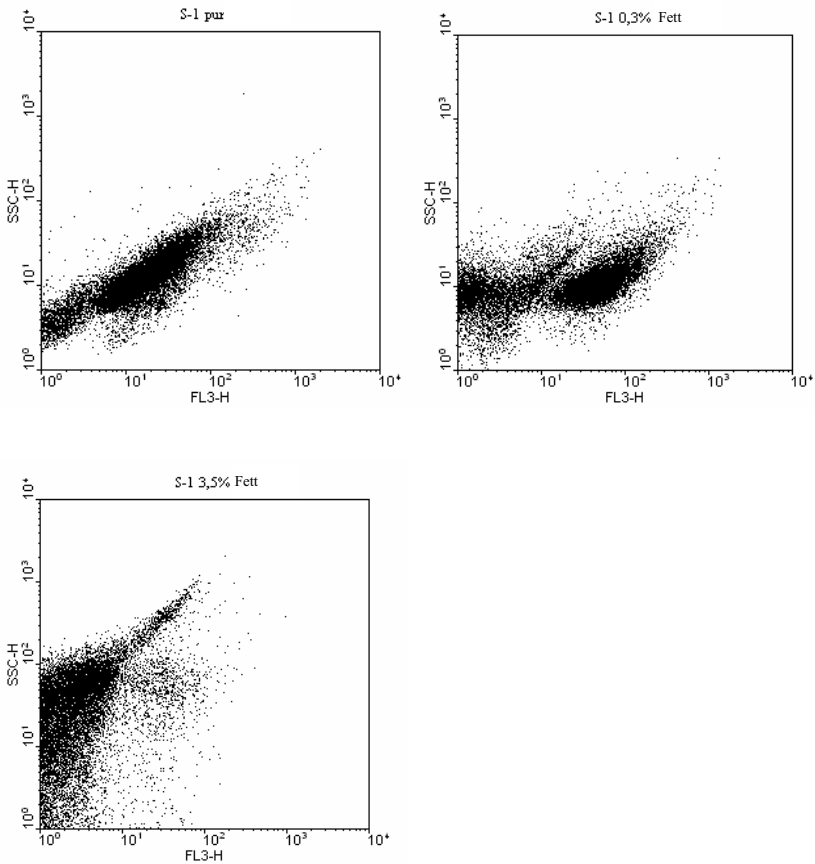


Abbildung 18: Dotplot von *B. lactis* (S-1) an Tag 1 mit jeweils gleicher Bakterienkonzentration ohne Milchezusatz, mit 0,3 %- und 3,5 %-fetthaltiger Milch

Die Daten der einzelnen Tage sind im Anhang (Anh. 9.6) zu finden. Der Einfluß des Fettes ist unabhängig von der Lagerungsdauer.

B. lactis (S-1)

Zwischen Tag 1 und Tag 42 waren Differenzen der FACS- und OSV-Daten zwischen 0,3 lg KbE/ml (Probe 1, ohne Milchezusatz), 0,3 lg KbE/ml (Probe 2, 0,3 %-fettthaltige Milch zugesetzt) und 0,2 lg KbE/ml (Probe 3, 3,5 %-fettthaltige Milch zugesetzt) zu verzeichnen. Diese Schwankungen liegen unter ($|\Delta KZ| = < 0,7$ lg KbE/ml) und sind zu vernachlässigen.

Abbildung 19 zeigt, dass sich die Bakterienwolke im Dotplot stets an der gleichen Stelle darstellte. Vitale Bakterien sind grün, tote Bakterien blau und Beads rot dargestellt. Während der Lagerung ist eine Zunahme der blau dargestellten, toten Bakterien zu verzeichnen.

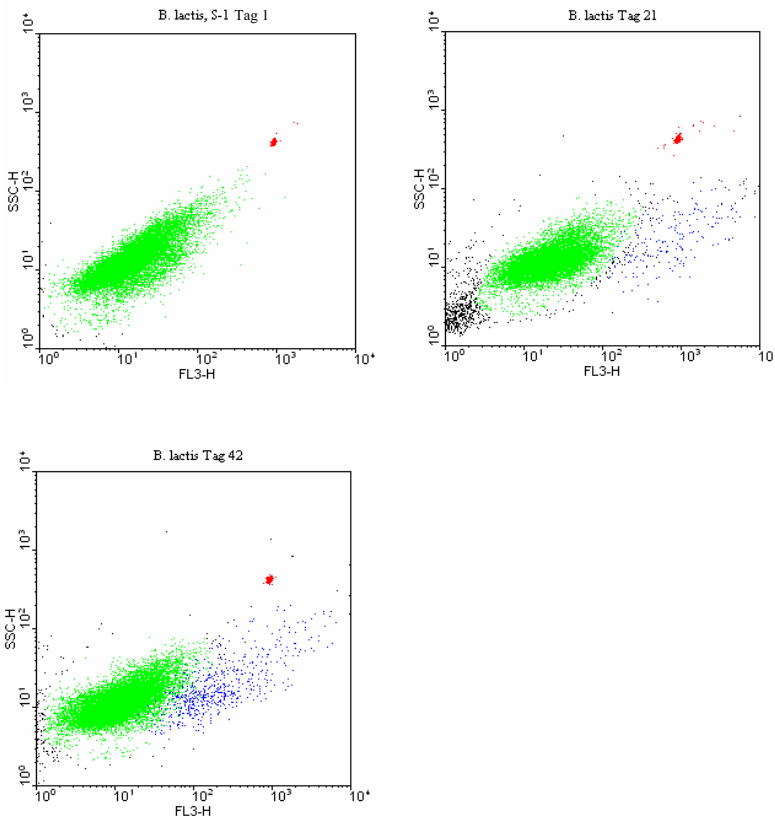


Abbildung 19: Dotplot von *B. lactis* ohne Milchezusatz an Tag 1, Tag 21 und Tag 42 der Lagerung

4 ERGEBNISSE

Die von *B. lactis* im FACS und OSV ermittelte Keimzahl blieb unabhängig von der Probenzusammensetzung im Laufe der Lagerung bei 9,0 lg KbE/ml stabil wie Abbildung 20 veranschaulicht.

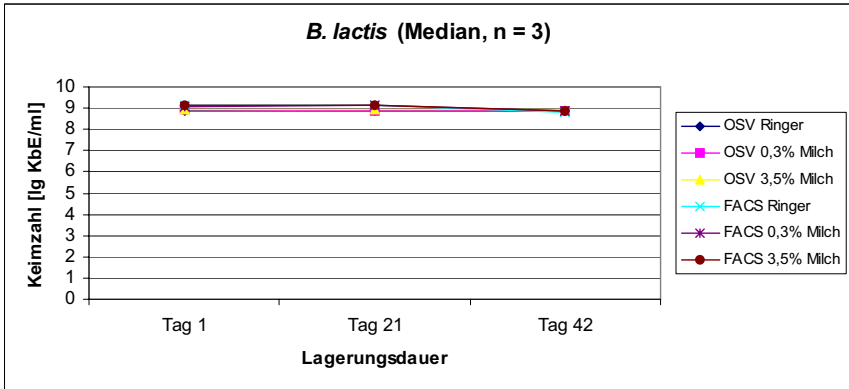


Abbildung 20: Keimzahlen [lg KbE/ml] des Stammes *B. lactis* ermittelt durch das Oberflächenspatelverfahren und Durchflusszytometrie im Verlauf der Lagerung mit 0,3 % - und 3,5 % fetthaltiger H-Milch sowie ohne Milchzusatz

B. longum (S-7)

Die im FACS ermittelten Werte variierten an Tag 1 um 1,0 lg KbE/ml (Probe 1 und 3), was gerade signifikant war. Im Laufe der Lagerung blieben die im FACS ermittelten Werte stabil, einzig die Probe 1 zeigte eine leichte Abnahme der Keimzahl von 0,7 lg KbE/ml.

Im OSV zeigte sich zwischen Tag 1 und Tag 42 eine signifikante Abnahme der Keimzahl. Probe 1 zeigte eine Verringerung um 5,9 lg KbE/ml von 7,64 lg KbE/ml auf 1,7 lg KbE/ml, Probe 2 zeigte eine Abnahme auf 4,5 lg KbE/ml und Probe 3 auf 5,1 lg KbE/ml. In denen mit Milch versetzten Proben 2 und 3 sind am Tag 42 im OSV etwa 3,0 lg KbE/ml mehr Bakterien nachweisbar als in der Probe 1 ohne Milchezusatz wie Abbildung 21 zeigt.

An Tag 42 betrug die Differenz der Werte zwischen FACS und OSV 4,9 lg KbE/ml (Probe 1), 3,3 lg KbE/ml (Probe 2) und 2,6 lg KbE/ml (Probe 3).

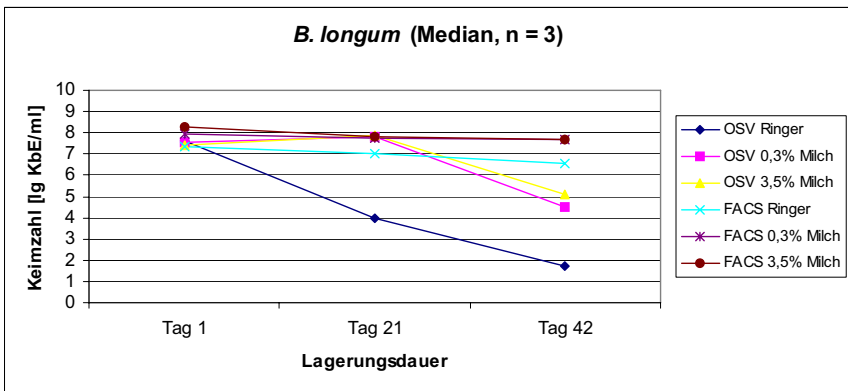


Abbildung 21: Keimzahlen [lg KbE/ml] des Stammes *B. longum* ermittelt durch das Oberflächenspatelverfahren und Durchflusszytometrie im Verlauf der Lagerung mit 0,3 % - und 3,5 % fetthaltiger H-Milch sowie ohne Milchezusatz

B. breve (S-9)

Die im FACS ermittelten Werte nahmen –wie Abbildung 22 zeigt- zwischen Tag 1 und Tag 42 um maximal 0,9 lg KbE/ml ab (Probe 2).

Die im OSV ermittelten Werte nahmen um 7,5 lg KbE/ml (Probe 1), 4,8 lg KbE/ml (Probe 2) und 4,7 lg KbE/ml (Probe 3) ab.

In den mit Milch versetzten Proben 2 und 3 sind am Tag 42 im OSV etwa 2 lg KbE/ml mehr Bakterien nachweisbar als in der Probe 1 ohne Milchezusatz.

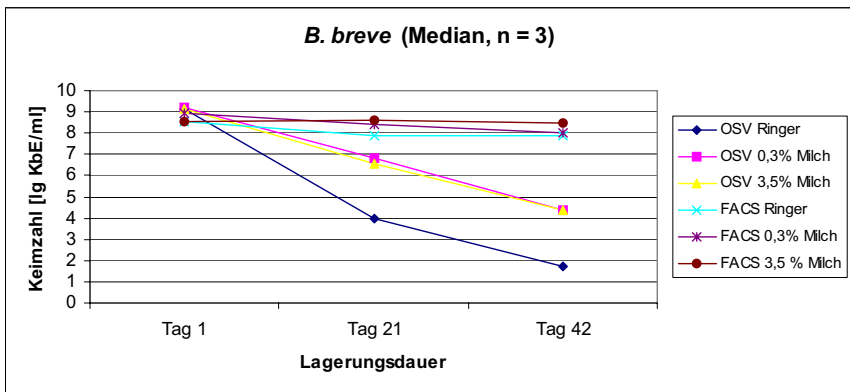


Abbildung 22: Keimzahlen [lg KbE/ml] des Stammes *B. breve* ermittelt durch das Oberflächenspatelverfahren und Durchflusszytometrie im Verlauf der Lagerung mit 0,3 % - und 3,5 % fetthaltiger H-Milch sowie ohne Milchezusatz

L. casei (S-16)

Die Proben 1, 2 und 3 wiesen im FACS mit etwa 8,5 lg KbE/ml die gleiche Keimzahl auf. Die im OSV ermittelten Werte stimmten mit denen im FACS überein und blieben von Tag 1 bis Tag 42 konstant. Einzig Probe 3 verzeichnete im Laufe der Lagerung eine Zunahme der Keimzahl um 0,8 lg KbE/ml im OSV, was die Abbildung 23 zeigt.

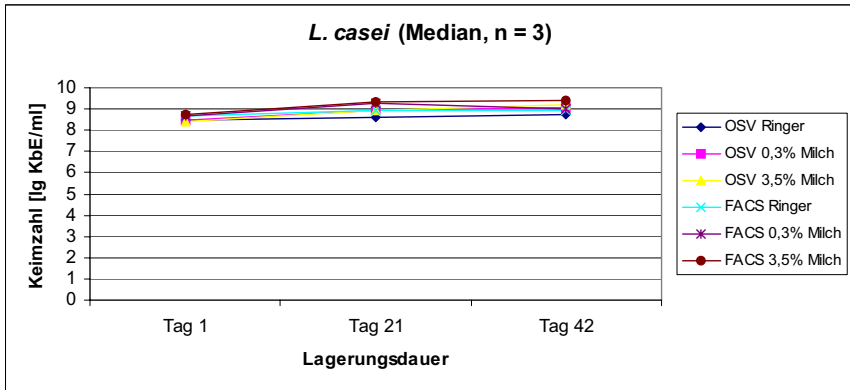


Abbildung 23: Keimzahlen [lg KbE/ml] des Stammes *L. casei* ermittelt durch das Oberflächenspatelverfahren und Durchflusszytometrie im Verlauf der Lagerung mit 0,3 % - und 3,5 % fetthaltiger H-Milch sowie ohne Milchzusatz

L. acidophilus (S-12)

Im Laufe der Lagerung verlagerte sich die Position der Bakterienwolke (vitale Bakterien sind grün, tote blau eingefärbt) im Punktediagramm weiter nach rechts, während die roten Beads stets an gleicher Stelle sitzen (Abb. 25). Im Laufe der Lagerung ist eine deutliche Zunahme der toten (blauen) Bakterien zu beobachten. Am Tag 1 waren die Werte beider Methoden identisch bei etwa 8,0 lg KbE/ml. Im FACS zeigte nur Probe 1 zwischen Tag 1 und Tag 42 eine Abnahme der Keimzahl um 0,8 lg KbE/ml.

Im OSV nahm die Keimzahl von Probe 1 um 2,2 lg KbE/ml ab, von Probe 2 um 0,9 lg KbE/ml und Probe 3 zeigte eine konstante Keimzahl.

Unterschiede zwischen beiden Methoden waren am Tag 42 besonders bei Probe 1 zu erkennen ($|\Delta \text{KZ}| = 1,5 \text{ lg KbE/ml}$), bei Probe 2 ($|\Delta \text{KZ}| = 1,0 \text{ lg KbE/ml}$) war die Differenz geringer und bei Probe 3 nicht vorhanden (Abb. 24).

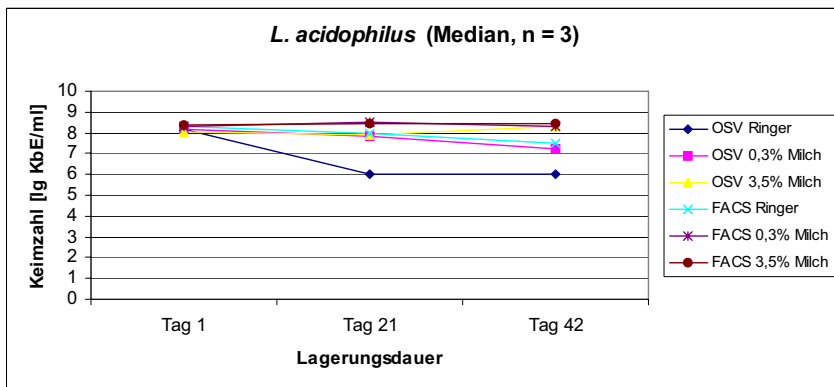


Abbildung 24: Keimzahlen [lg KbE/ml] des Stammes *L. acidophilus* ermittelt durch das Oberflächenspatelverfahren und Durchflusszytometrie im Verlauf der Lagerung mit 0,3 % - und 3,5 % fetthaltiger H-Milch sowie ohne Milchezusatz

4 ERGEBNISSE

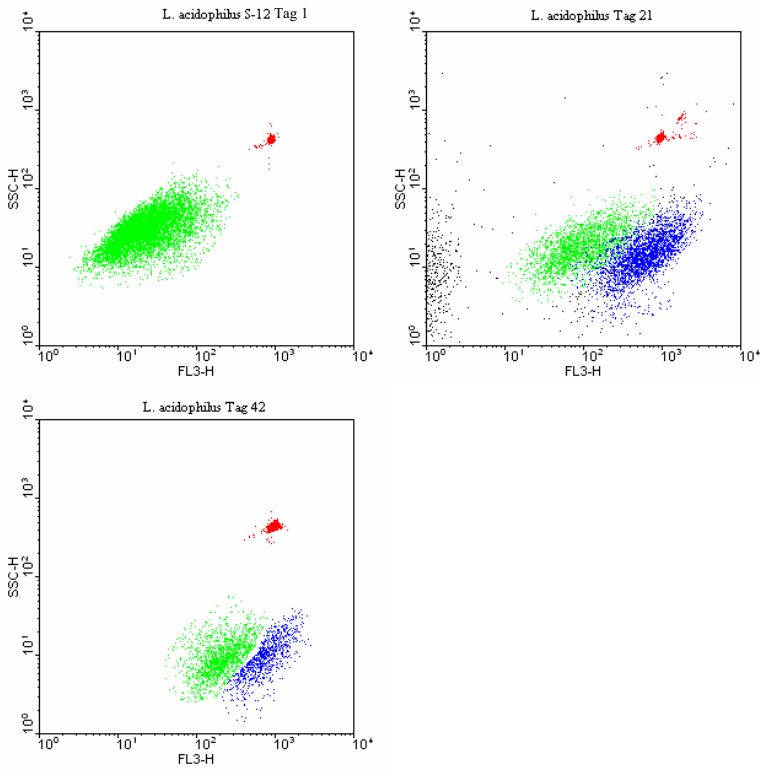


Abbildung 25: *L. acidophilus* an Tag 1, Tag 21 und Tag 42 der Lagerung

L. johnsonii (S-14)

Am Tag 1 lagen die Keimzahlen beider Methoden bei ca. 9,0 lg KbE/ml. Im FACS zeigte Probe 1 eine Abnahme der Keimzahl bis zum Tag 42 um 1,7 lg KbE/ml auf 7,3 lg KbE/ml, alle anderen Werte blieben konstant.

Im OSV zeigte Probe 1 bis zum Tag 42 eine Abnahme um 6,3 lg KbE/ml auf 2,5 lg KbE/ml. Die Werte beider Methoden sind in Abbildung 26 dargestellt.

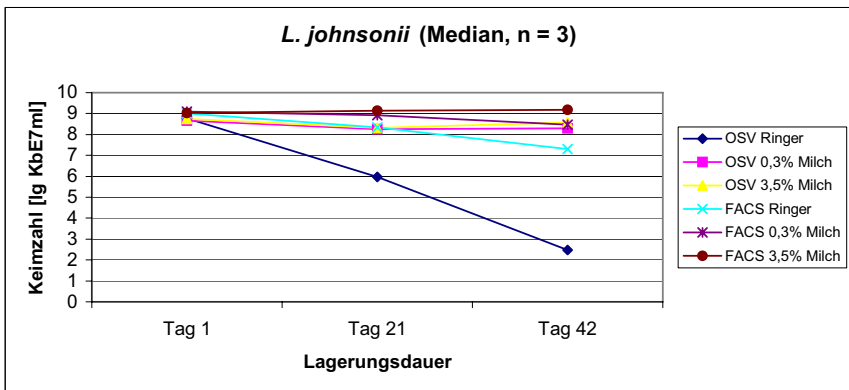


Abbildung 26: Keimzahlen [lg KbE/ml] des Stammes *L. johnsonii* ermittelt durch das Oberflächenspatelverfahren und Durchflusszytometrie im Verlauf der Lagerung mit 0,3 % - und 3,5 % fetthaltiger H-Milch sowie ohne Milchzusatz

4.2.4 Milchlischerzeugnis

Mit dem an Reinkulturen erprobten durchflusszytometrischen Verfahren wurden 7 Milcherzeugnisse aus dem Handel untersucht.

Besonders Mischkulturen und Fettgehalte $> 0,1\%$ erschwerten die Auswertung im Dotplot, da einerseits eine genaue Zuordnung der Wolken nicht möglich war, andererseits Fettkügelchen als störende Elemente in und über den Punktwolken lagen wie in Abbildung 27 zu sehen ist.

Beispielhaft ist die Herausarbeitung der Bakterienwolken für Produkt 10 in Abbildung 27 dargestellt, in welchem *L. acidophilus*, *B. lactis* und *S. thermophilus* enthalten sind. Bedingt durch die ähnliche Größe und Granularität der Keime aus der Mischkultur verschmelzen die Wolken im Dotplot miteinander. Mithilfe der Software-Programme CellquestPro[®] und WINMDI[®] ist es aber möglich, ein Messergebnis nach verschiedenen Gesichtspunkten darzustellen. So kann man eine Messung ungefärbt (nur Vorwärts-(FSC) und Seitwärtstreulicht (SSC), also Größe und Granularität) darstellen oder in den verschiedenen Fluoreszenzkanälen Fl-1 bis Fl-4 ansehen.

Die verschiedenen Parameter können dann gegeneinander aufgetragen werden, z.B. Größe gegen Fluoreszenz. In diesen Auswertungsbildern gelingt es oft, einzelne Wolken gegeneinander abzugrenzen und manuell zu markieren, also zu „gaten“. Färbt man diese „gates“ dann in einem Auswertungsfenster am Computer ein, kann man sich die markierten Messereignisse auch in einem anderen Auswertungsfenster der gleichen Messung anzeigen lassen und wie in einer Art Puzzle das Ergebnis zusammensetzen.

Im Fl-4-Kanal fluoreszieren mit TO-PRO markierte und demzufolge tote Zellen besonders stark und stellen sich weit rechts dar, während Fl-1 und Fl-3 besonders geeignet für die Darstellung von mit SYTO-gefärbten Zellen ist.

Die grüne Wolke, bei der es sich vermutlich um *L. acidophilus* handelt, da Keime aus der *L. acidophilus*-Gruppe stets eine sehr ähnliche Wolke erzeugen, weist rechnerisch einen Gehalt von 8,0 lg KbE/ml auf. Die pinke Wolke enthält 7,8 lg KbE/ml und die hellblaue Wolke 7,1 lg KbE/ml, wobei hier nicht zwischen *B. lactis* und *S. thermophilus* unterschieden werden kann. Die versuchte Zuordnung der Wolken erfolgte wegen fehlender Marker nach Erfahrungswerten und ist nicht durch molekularbiologische Marker gestützt.

4 ERGEBNISSE

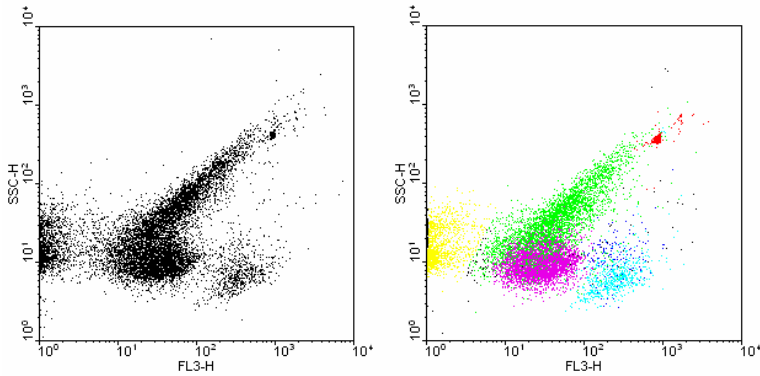


Abbildung 27: Dotplot von Produkt 10 vor (links) und nach (rechts) der Bearbeitung

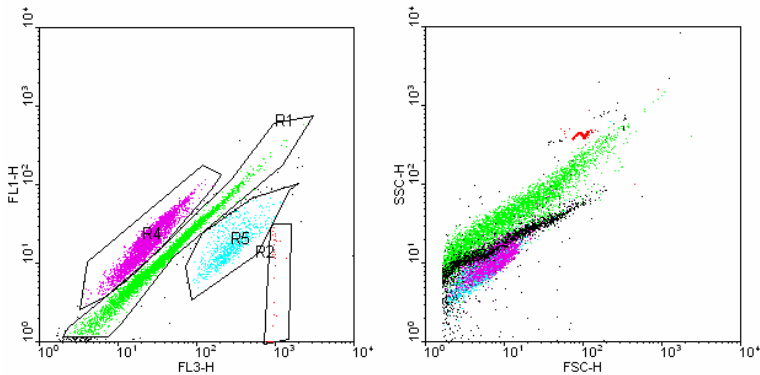


Abbildung 28: Dotplot von Produkt 10 während der Bearbeitung

Die Keimzahlen wurden auf verschiedenen Selektiv- und Elektivnährböden mittels OSV bestimmt. Parallel dazu wurden die Produkte im FACS untersucht (siehe Tab. 25). Die geringste Differenz ($|\Delta \text{KZ}| = 1,2 \text{ lg KbE/ml}$) zeigte sich bei dem Produkt 8 mit *L. casei* Shiota in einer Matrix mit geringem Magermilchanteil.

4 ERGEBNISSE

Die größte Differenz ($|\Delta \text{KZ}| = 3,8 \text{ lg KbE/ml}$) sowie Probleme bei der Zuordnung der einzelnen Bakterienwolken waren bei einem Joghurtprodukt (Produkt 10) mit 1,6 % Fettgehalt zu verzeichnen.

Tabelle 25: Keimzahlen und Differenzen ($|\Delta \text{KZ}| = \text{lg KbE/ml}$) von FACS und OSV

Nr. ¹⁾	<i>L. acidophilus</i>			<i>L. casei</i>			<i>Bifidobacterium</i>			<i>S. thermophilus</i>		
	FACS	OSV	ΔKZ	FACS	OSV	ΔKZ	FACS	OSV	ΔKZ	FACS	OSV	ΔKZ
8				8,39	7,18	1,21						
2				10,38	8,49	1,85				9,41	8,30	1,11
10	9,93	6,11	3,82	9,11	5,63	3,48		4,67		9,85	8,23	1,62
9	10,41	6,95	3,46			n.z.		6,30	n.z.	9,34	8,82	0,52
1	10,15	7,34	2,81							9,58	8,15	1,43
7	10,51	7,02	3,49	n.z.	7,06		n.z.	6,51		n.z.	8,72	
5							9,34	7,96	1,38			

¹⁾ = Produkt-Nummer

n.z. = Punktwolke ist nicht zuzuordnen

4 ERGEBNISSE

5 DISKUSSION

Methoden zur Keimzahlbestimmung von Probiotika wie die klassische kulturelle Untersuchungen mittels Oberflächenspatelverfahren oder die Durchflusszytometrie müssen geeignet für die Anwendungsfelder wie Vitalitätsbestimmung, Keimzahlbestimmung sowie Brauchbarkeit für die Untersuchung von Reinkulturen, Mischkulturen mit/ohne Milchezusatz und Produkten sein. Dies soll anhand der eigenen Untersuchungen abgewogen und kritisch verglichen werden.

5.1 Vitalitätsbestimmung

Die Bestimmung der Vitalität erfolgte durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen im Durchflusszytometer. Parallel dazu fand eine Keimzahlbestimmung auf entsprechenden Nährböden statt, um eine Zu- oder Abnahme der Vitalität mittels kultureller Methode überprüfen zu können.

5.1.1 Farbstoffauswahl

In dieser Arbeit wurden die DNA/RNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffe SYTO[®]9 (Lebend- und Totfarbstoff), TO-PRO[®]-3 und PJ (Totfarbstoffe) zur Vitalitätsbestimmung von Bakterien eingesetzt.

Während in den Anfängen der Bakterienmessung im Durchflusszytometer vorrangig Farbstoffe eingesetzt wurden, die sich in der Zellfunktionsmessung somatischer Zellen etabliert hatten wie DiOC₆(3), FDA, Rh123 (DIAPER et al. 1992), Tinopal CBS-X (DAVEY u. KELL 1996, 1997, DAVEY et al. 1999) wurde in neueren Arbeiten zur Vitalitätsbestimmung meist auf DNA/RNA-spezifische Farbstoffe speziell zur Lebend/Totdiskriminierung zurückgegriffen.

Nach Sichtung der Literatur wurde aus der SYTO-Farbstoffreihe zur Untersuchung von Bakterien SYTO[®]9 ausgewählt, welcher sowohl lebende als auch tote Zellen anfärbt (LEBARON et al. 1998). Durch die Absorption bei 485 nm und Emission bei ca. 500 nm ist SYTO[®]9 als grünfluoreszierend in FI-1, aber auch in FI-3 sichtbar. Ebenfalls mit SYTO[®]9 und PJ als Totfarbstoff färbten AUTY et al. (2001) die probiotischen Stämme *L. paracasei* und *Bifidobacterium* spp. in Milch, Magermilch und fermentierter Milch, um diese im

Lasermikroskop auf Vitalität zu untersuchen. Die gleichen Farbstoffe wurden von BUNTHOF et al. (2001a, 2001b) und BUNTHOF und ABEE (2002) sowohl für Bakterien in Bouillon als auch für Milchmischerzeugnisse genutzt, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass keine Interferenzen bei dem Einsatz in Milchmischerzeugnissen zu erwarten waren.

Aus der Reihe der TO-PRO-Farbstoffe, die z.B. bei MORTIMER et al. (2000) und SAKAMOTO et al. (2005) Anwendung fanden, wurde TO-PRO[®]-3 gewählt. Dieser rotfluoreszierende Farbstoff mit der Anregungswellenlänge von 642 nm und einer Emission von 661 nm entspricht dem Spektrum des 10-mW-Dioden-Lasers und kann gut über den Fl-4 Kanal detektiert werden.

PJ hingegen wird bei 535 nm angeregt und emittiert bei 617 nm, so dass die orange Fluoreszenz in Fl-2 erfasst wird. In den oben bereits erwähnten Studien von AUTY et al. (2001), BUNTHOF et al. (2001a, 2001b) und BUNTHOF und ABEE (2002) wurde PJ erfolgreich in Kombination mit SYTO[®]9 sowohl für Reinkulturen als auch für Milchmischerzeugnisse eingesetzt.

Sowohl TO-PRO[®]-3 als auch PJ wurden als geeignet zur Färbung von unfixierten Zellen beschrieben (SCHIEMANN u. BUSCH 2007), was für die geplanten Untersuchungen von Bedeutung war. Da die Genera *Lactobacillus* und *Bifidobacterium* sehr sauerstoffempfindlich sind und deshalb auf eine umfassende Probenaufbereitung verzichtet werden sollte, boten sich diese Farbstoffe, bei denen eine Zellfixierung nicht notwendig ist, an.

In Kombination ließen SYTO[®]9 und TO-PRO[®]-3 oder PJ eine gute Trennung der Fluoreszenzen in verschiedene Kanäle zu und boten gleichzeitig die Möglichkeit einer zuverlässigen, matrixunabhängigen Vitalitätsbestimmung.

5.1.2 Reinkultur

B. bifidum weist meist eine größere Vitalität auf als *B. longum* (VENTLING u. MISTRY 1993) und Bifidobakterien werden durch Lagerung oft deutlich negativ beeinflusst (LAROIA u. MARTIN 1991, BONAPARTE 1997).

Diese Erkenntnisse beruhen auf kulturellen Keimzahlbestimmungen, ließen sich aber mit der durchflusszytometrischen Methode untermauern. Zur Etablierung der Methode wurde mit Reinkulturen aus Bouillon gearbeitet. Dadurch wurde eine sichere Zuordnung der Bakterien

ermöglicht und gleichzeitig störenden Interferenzen mit Matrixbestandteilen, wie sie z.B. in Milch vorhanden sind, vorgebeugt.

So zeigten im Lagerungsverlauf die Stämme *B. animalis* (S-4), *B. lactis* (S-1), *B. bifidum* (S-10), *B. infantis* (S-8) eine große Stabilität. Die Stämme *B. longum* (S-7) und *B. breve* (S-9) hingegen zeigten in Abhängigkeit zur Lagerungsdauer zunehmenden Vitalitätsverlust.

Aus dem Genus *Lactobacillus* gilt die *L. casei*-Gruppe als lagerungsstabil, während für die *L. acidophilus*-Gruppe ein rascher Vitalitätsverlust bekannt ist (KLEIN et al. 1999).

Auch dieses Lagerungsverhalten konnte in den eigenen Untersuchungen am FACS nachgewiesen und bestätigt werden. Die *L. casei*-Gruppe mit *L. casei* (S-16) und *L. rhamnosus* (S-17) wies annähernd gleichbleibende Vitalität auf. Als weniger stabil erwiesen sich *L. acidophilus* (S-12), *L. reuteri* (S-15) und *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (S-23), die deutlichste Abnahme zeigte jedoch *L. johnsonii*.

Die Vitalitätsbestimmung mittels FACS konnte diese Entwicklung deutlich zeigen, ebenso wie vergleichbare Tendenzen mit dem OSV sowohl im Falle eines stabilen Lagerungsverhaltens als auch bei deutlichem Vitalitätsverlust. Lagerungsstabile Bakterien wie z.B. *B. lactis* bilden im Dotplot eine klare Wolke, die im Lagerungsverlauf eine feste Position einbehält, während lagerungsinstabile Bakterien wie z.B. *L. acidophilus* im Laufe der Lagerung im Dotplot ihre Position verlagern.

Bei der Beurteilung der Vitalität ist bei somatischen Zellen eine 5 %-ige methodisch bedingte Tagesvarianz zu berücksichtigen. Diese Tagesvarianz ist ein in der Durchflusszytometrie bekanntes Phänomen, welches in der Zytologie mit den Zellreaktionen auf Schwankungen der Umgebungstemperatur oder des Luftdrucks erklärt wird. MERLE (2003) hat u.a. Temperatur und Lagerungsdauer als Einflussfaktoren auf Zellvitalität und -funktionalität beschrieben und beispielhaft Tagesvarianzen untersucht. Die Erkenntnisse sind nur bedingt auf Bakterienzellen übertragbar, können aber als wertvolle Hinweise auf Schwankungsbreiten und deren Ursachen gewertet werden. So erwies sich auch in dieser Arbeit die Lagerungsdauer als ein Faktor für die Vitalität.

5.1.3 Milchmischerzeugnisse

Die meisten probiotischen Produkte werden in Form von Milchmischerzeugnissen angeboten, so dass der Keimgehalt dieser wirtschaftlich und technologisch bedeutenden Handelsform näher untersucht werden sollte.

Bei der Untersuchung von Produkten mit einer komplexen Matrix wie Milch mit Fett- und Eiweißanteilen stellt sich die Frage der Probenaufbereitung.

GUNASEKERA et al. (2003), die in Rohmilch und ultrahoherhitzter Milch eine bekannte Anzahl von Bakterien (*Pseudomonas fluorescens*, *E. coli*, *S. aureus*) einbrachten und die Proben parallel mittels Durchflusszytometer und Mikroskop untersuchten, bereiteten diese zuvor auf. Für die durchflusszytometrische Analyse der Bakterien wurden die Proben zentrifugiert und mit Detergentien und Enzymen behandelt, um Proteine und Lipide aus der Probe zu entfernen. Allerdings handelte es sich bei den eingesetzten Bakterien nicht um Milchsäure- oder probiotische Bakterien wie in den eigenen Untersuchungen, sondern um Lebensmittelverderbniserreger mit humanpathogenem Potential. Diese Keime sind robust und gedeihen aerob, so dass die etwa einstündige Probenaufbereitung keinen nachteiligen Effekt auf das durchflusszytometrische Ergebnis hat (GUNASEKERA et al. 2000, 2003). Anders verhält es sich bei der Untersuchung von Produkten mit probiotischen Bakterien wie z.B. *L. casei* Shirota. Hier konnte durch eine Probenaufbereitung zwar die Zahl der störenden Matrixbestandteile reduziert werden, gleichzeitig findet aber ein beträchtlicher Vitalitätsverlust der Bakterien statt, so dass Analysen besser ohne Aufbereitung durchgeführt werden sollten (BUNTHOF u. ABEE 2002). Da *L. casei* Shirota als einer der widerstandsfähigeren probiotischen Bakterienstämme gelten kann und viele Laktobazillen und vor allem Bifidobakterien wesentlich sauerstoffempfindlicher und stressanfälliger sind, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf eine über Verdünnung und Färben hinausgehende Probenaufbereitung verzichtet.

Die fünf untersuchten Milchmischerzeugnisse enthielten zwischen zwei und vier verschiedene Bakterienstämme. Teilweise konnten tote und lebende Bakterienwolken bestimmt werden, allerdings wurde eine Zuordnung der Wolken zu einem der deklarierten Stämme durch überlappende Bakterienwolken und Fett- bzw. Eiweißpartikel sehr erschwert. Dies wurde schon von BUNTHOF und ABEE (2002) beschrieben, die von einer Überlappung des FSC/SSC-Signals zwischen Bakterienwolken und Milchpartikeln ebenso berichten wie von

etwa 10^{10} störenden Partikeln/ml Milch. Diese hohe Partikeldichte kann durch Streuung und Absorption des Anregungs- und Emissionslichts zu einer Störung des Detektionssystems und zu verfälschten Messergebnissen führen. Auch bei der durchflusszytometrischen Analyse von Milchproben mit niedriger Zellzahl ist ein störender Einfluß von Fettpartikeln bekannt, der teilweise eine Auswertung der Messwerte verhindert (Köß 2004).

Die Untersuchung mittels OSV zeigte einen deutlichen Einfluß der Lagerungsdauer auf die *L. acidophilus*-Gruppe, die bis zum MHD relativ stabil blieb, um dann bis unter die Nachweisgrenze abzunehmen. Andere deklarierte Stämme der Spezies *L. casei*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* und *S. thermophilus*, zeigten konstante Keimzahlen. Damit stehen die Ergebnisse im Einklang mit den Untersuchungen von NIGHSWONGER et al. (1996), DAVE u. SHAH (1998), KLEIN et al. (1999) und SODONI et al. (2002), die ebenfalls für die *L. acidophilus*-Gruppe einen deutlichen Vitalitätsverlust im Laufe der Lagerung beschreiben, während *S. thermophilus*, *L. casei* und *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* als lagerungsstabil beschrieben werden.

5.1.4 Pharmazeutika

Als ausschlaggebend für die Wirksamkeit von Arzneimitteln kann deren Wirkstoffgehalt gelten, im Fall von Produkten mit pharmazeutisch wirksamen Mikroorganismen ist deren Gehalt entscheidend.

Von den drei untersuchten Präparaten beinhalteten zwei Präparate Monokulturen von *E. coli* Nissle 1917 (Nr. 11 und Nr. 12) und ein Erzeugnis (Nr. 13) eine Mischkultur aus *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. und *Lactococcus lactis*.

Erwartungsgemäß nahm die Vitalität der Mikroorganismen in den Produkten Nr. 11 und Nr. 12 mit zunehmender Lagerungsdauer ab, wobei die Ergebnisse beider Methoden eine gleiche Entwicklung aufzeigen. Die hohen Keimzahlen sind auch in anderen pharmazeutischen Präparaten zu beobachten, so wird die als Biotherapeutikum eingesetzte Hefe *Saccharomyces boulardii* als Lyophilisat mit einer Keimzahl von ca. 3×10^{10} /KbE/g angeboten (PERITI u. TONELLI 2002).

Als Einflußgrößen während der Lagerung von getrockneten Pulvern mit probiotischen Bakterien gelten Temperatur, Wassergehalt des Pulvers, relative Feuchtigkeit, Zusammensetzung des Pulvers, Sauerstoffgehalt, Verpackungsmaterial sowie die Exposition

zu Licht. Auch die Temperatur bei der Rehydration von sprüh- oder gefriergetrockneten probiotischen Pulvern wirkt sich auf die Keimzahl aus (MENG et al. 2008).

Ogleich in pulverförmigen Zubereitungen die Vitalität unter der von flüssigen Produkten lag, war die im OSV bestimmte Keimzahl sehr hoch. MIYAMOTO-SHINOHARA et al. (2000) haben das Lagerungsverhalten von *E. coli* nach Gefriertrocknung untersucht. Sie konnten zeigen, dass etwa 50 % der Bakterien den Trocknungsprozess überlebten und sogar nach 15 Jahren Lagerung noch mehr als 10 % der Mikroorganismen lebensfähig waren. Das stimmt mit den eigenen Beobachtungen überein, so lag die Vitalität des untersuchten *E. coli*-Stammes im pulverförmigen Präparat bei maximal 40 % mit einer kulturell bestimmten Keimzahl von ca. 10 lg KbE/ml. Einfluß auf die Vitalität hat unter anderem die optimale Konzentration von Trehalose und Glycerin, die zu einer deutlich besseren Verträglichkeit der Gefriertrocknung führt, wie TESSEMA et al. (2006) für einen *E. coli*-Stamm herausarbeiten konnten.

Pulverförmige oder lyophilisierte Bakterienpräparate weisen auf Nährmedien oft einen höheren Anteil kultivierbarer Bakterien auf und bieten sich - wie z.B. bei der Lyophilisierung genutzt - als Formulierung zur Lagerung an.

Als neuen Ansatz beschreiben SLEATOR und HILL (2008) für eine größere Vitalität während des Trocknungsprozesses und der Lagerung die Möglichkeit, Stressresistenzsysteme von pathogenen Stämmen wie z.B. *Listeria monocytogenes* auf stressanfälligerer probiotische Bakterien zu übertragen.

Im pulverförmigen Produkt Nr. 13 ließen sich verschiedene Bakterienwolken darstellen. Allerdings konnten die verschiedenen Wolken – vergleichbar mit der Situation bei Milchprodukten - nicht einzelnen Keimen zugeordnet werden. Die Vitalität der Bakterien lag bei 50,1 %, auf den einzelnen Nährböden ließen sich die deklarierten Bakterien in hoher Konzentration zwischen 8,3 (*L. acidophilus*) und 9,3 lg KbE/ml (*Lactococcus lactis*) nachweisen. Um die Möglichkeiten der Durchflusszytometrie nutzen zu können, wäre sowohl hier als auch bei Milchprodukten der Einsatz von spezifischen Markern wie z.B. Antikörper oder Gensonden für einzelne Bakteriengenera oder –spezies wünschenswert, wie sie für andere Bakterienspezies bereits existieren (FERNÁNDEZ-LAGO et al. 2000, YU et al. 2005). Der Einsatz des FACS erlaubt ohne spezielle Marker zwar teilweise eine Unterscheidung, aber keine Differenzierung der untersuchten Bakterien oder eine sichere Zuordnung.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ließ sich die Lebensfähigkeit durch Kenntlichmachung toter und lebender Bakterien gut darstellen. Das FACS eignete sich gut zur Vitalitätsbestimmung der untersuchten probiotischen Bakterien. Die Bestimmung der Vitalität ließ sich innerhalb weniger Stunden durchführen und erfasste auch die Keime, welche z.B. aufgrund von Lagerungsstress durch kulturelle Nachweismethoden, die nur vermehrungsfähige Bakterien erfassen, nicht mehr nachweisbar waren.

5.2 Keimzahlbestimmung

Zur Quantifizierung im Durchflusszytometer können wie in Kap. 2.2.2.4 beschrieben, verschiedene Methoden genutzt werden. Mit der radiometrischen Methode und dem Einsatz von Referenzpartikeln, deren Anzahl pro Volumen bekannt ist, wählt man eine unempfindliche Methode, bei der z.B. Temperaturschwankungen, Viskositätsänderungen oder Änderungen in der Pumpenleistung keine Messfehler bewirken (NEBE-VON-CARON 2003). Neben Latex- oder Polystyrolpartikeln („Beads“) von genormter Größe, die in verschiedenen Durchmessern und Fluoreszenzen verfügbar sind, können auch Referenzzellen eingesetzt werden. Zwar sind diese preislich günstiger, allerdings stellen sie sich nicht so punktwolkenförmig dar wie Beads und sind zudem als biologische Einheiten schwer kalkulierbaren Einflüssen unterworfen. Ihr Einsatz bedarf anhaltend einer genauen Überprüfung der Anzahl, zudem kann es zu Überlappungen der Wolken im Dotplot kommen. Um die Einflussgrößen zu minimieren und Interferenzen zwischen somatischen Zellen und Bakterien zu vermeiden, wurden für die im Folgenden diskutierten Versuche zur Quantifizierung 25 μl Beads (PeakFlow™Orange flow cytometry reference beads 2,5 μm , $1,2 \times 10^8$) je Probe zugegeben.

5.2.1 Nachweisgrenze

Zur Etablierung der Quantifizierung im Durchflusszytometer war eine Bestimmung der Nachweisgrenze unerlässlich.

Hierfür wurden nach gleichzeitigen Untersuchungen von Monokulturen aus Bouillon und einem Produkt (Nr. 8) mittels FACS und OSV die ermittelten Keimzahlen verglichen und eine Nachweisgrenze definiert. Eingesetzt wurden Stämme der Spezies *B. lactis* und *B. breve*,

womit ein stabiler und ein relativ labiler Stamm zum Einsatz kamen. Für die *L. acidophilus*-Gruppe wurde *L. johnsonii* gewählt, für die *L. casei*-Gruppe *L. casei* und *L. casei* Shirota. Im Produkt (Nr. 8) war eine Monokultur von *L. casei* Shirota enthalten. Die gewählten Bakterienspezies stellen Stämme, die als Probiotikum Verwendung finden, zudem werden sie in der Milchtechnologie eingesetzt (KLEIN 1998). Ihr Nachweis und ihre Anzahl sind folglich von praktischer Bedeutung, bedenkt man den geforderten Gehalt von 10^6 KbE/ml Produkt oder die empfohlene Tagesdosis von 10^9 KbE/ml, um im menschlichen Organismus physiologische Leistung erbringen zu können (ANONYM 1999a).

Die im FACS ermittelte Nachweisgrenze lag zwischen 4,5 und 5,8 lg KbE/ml, wobei keine Unterschiede zwischen den Gattungen *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* oder Rein- und Monokultur bestanden. Schwankungen an dieser Stelle sind vermutlich stammspezifisch. Oberhalb dieser Werte stimmten die Ergebnisse beider Methoden überein ($|\Delta KZ| = < 0,7$ lg KbE/ml), während an der Nachweisgrenze die FACS-Werte stagnierten und die OSV-Werte weiter linear abnahmen. Auffällig war, dass die für das Produkt ermittelte Keimzahl im OSV etwa 1 lg-Stufe unter den im FACS ermittelten Gehalten lag (8,4 bzw. 7,2 lg KbE/ml). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen einer Arbeit von BUNTHOF und ABEE (2002). Als Nachweisgrenze gaben sie 10^5 KbE/ml an.

MOHR et al. (2006) setzten die Durchflusszytometrie zur Sterilitätsprüfung von zur Transfusion bestimmten Thrombozyten-Konzentraten, die nach Zentrifugieren des Blutes aus der Leukozytenschicht gewonnen wurden, ein. Sie definierten die Nachweisgrenze für Bakterien mittels Beads ebenfalls bei 10^5 KbE/ml. Bei niedrigen Bakteriengehalten gefährdete eine Überlappung der Bakterienwolken mit Debris und Artefakten eine sichere Quantifizierung.

Die Gesamtkeimzahlbestimmung für Bakterien mittels FACS gelang GUNASEKERA et al. (2003) zwischen 10^2 und 10^6 Zellen/ml, wobei bei Gehalten von über 10^4 Zellen/ml die SYTO-Anfärbung ausreichte, während die Autoren unterhalb dieses Gehaltes Fluoreszenz-in-situ-Hybridation (FISH)-basierte Durchflusszytometrie nutzten, da alleinige Fluorochromfärbung nicht ausreichte.

Mit einer Nachweisgrenze von ca. 10^5 KbE/ml ist das FACS gut für die Untersuchung von probiotischen Bakterien geeignet, die mit einem Mindestgehalt von 10^6 KbE/ml in probiotischen Produkten enthalten sein sollten (ANONYM 1999a). Folglich kann die

Durchflusszytometrie zur Quantifizierung angewandt werden, da die relevanten Keimzahlgrößen im Messbereich liegen.

5.2.2 Reinkultur

Nach dem Festlegen der Nachweisgrenze wurden in Bouillon gezüchtete Reinkulturen von 7 Stämmen der Gattung *Bifidobacterium* und 8 Stämmen der Gattung *Lactobacillus* durchflusszytometrisch und mittels OSV quantifiziert. Die Ergebnisse beider Methoden stimmten überein, wobei die Ergebnisse zwischen den Werten von 7,48 (FACS) bzw. 7,36 (OSV) für *L. paracasei tolerans* (S-18) und 9,38 (FACS) bzw. 9,11 (OSV) für *L. rhamnosus* lagen. Einzig *L. reuteri* wies eine signifikante Differenz ($|\Delta KZ| = > 0,7 \lg \text{KbE/ml}$) der Keimzahlen von 0,83 $\lg \text{KbE/ml}$ auf (siehe Kap. 4.2.2, Tab. 24). Oberhalb der Nachweisgrenze von 4,5-5,8 $\lg \text{KbE/ml}$ ist das Durchflusszytometer für die Quantifizierung von Reinkulturen – wie schon in Kap. 5.2.1 festgestellt - geeignet. Beide Methoden lieferten vergleichbare Ergebnisse. Eine FACS-Analyse dauert etwa eine Stunde und ist somit wesentlich schneller als die konventionelle Methode, welche bis zu 7 Tagen dauern kann. Nachteile des OSV wie das Verklumpen von Bakterien auf Platte und das teilweise schlechte Wachstum auf Selektivmedien sind bei durchflusszytometrischen Messungen ohne Bedeutung. So wird ein Verklumpen der Bakterienzellen durch die hydrodynamische Fokussierung unterbunden und statt des Wachstums wird die direkte Vitalität der Zelle beurteilt.

5.2.3 Reinkultur mit Milchzusatz

Nach Etablierung der durchflusszytometrischen Methode zur Quantifizierung von Reinkulturen aus Bouillon wurde durch den Zusatz von Milch mit unterschiedlichen Fettkonzentrationen (ohne Milch = Probe 1; mit 0,3 % fetthaltiger Milch = Probe 2; mit 3,5 % fetthaltiger Milch = Probe 3) die Matrix eines Produktes simuliert. Um Einflüsse von Milch und Lagerungsdauer bewerten zu können, wurden die Proben an den Tagen 1, 21 und 42 untersucht.

B. lactis (S-1) zeigte sowohl im FACS als auch im OSV eine konstant hohe Keimzahl.

B. longum (S-7) zeigte im FACS nur bei Probe 1 (ohne Milchzusatz) einen Vitalitätsverlust. Signifikante Abnahmen der Keimzahl zeigten sich im Lagerungsverlauf im OSV. Anders als

Probe 1 zeigten Probe 2 und 3 keine lineare Abnahme über den gesamten Zeitraum, sondern zeigten erst ab Tag 21 einen deutlichen Verlust der Keimzahl.

Milch scheint hierbei protektiv zu wirken, zum einen setzte der Vitalitätsverlust der mit Milch versetzten Proben 2 und 3 erst später ein, zum anderen waren die Keimzahlverluste wesentlich geringer als bei Probe 1 ohne Milchanteil. Ähnliches beobachteten TAKAHASHI et al. (2004), die nach zweiwöchiger Lagerung mittels klassischer Verfahren für einen in fermentierte Milch eingebrachten *B. longum*-Stamm den konstanten Keimgehalt von 8 KBE/ml messen konnten.

B. breve (S-9) zeigte im Durchflusszytometer relativ stabile Werte. Im OSV zeigte sich eine lineare Abnahme der Werte bis unter die Nachweisgrenze (Probe 1) bzw. etwa 4,5 lg KBE/ml (Probe 2 und 3). Auch hier sind im OSV bei Milchzusatz - gleich welchen Fettgehaltes - weniger Keimzahlverluste messbar.

L. casei (S-16) zeigte im Laufe der Lagerung einen mit beiden Methoden ermittelten stabilen Anteil lebender Bakterien und ist somit ebenso stabil wie *B. lactis*.

L. acidophilus (S-12) zeigte im FACS nur für Probe 1 eine Abnahme der Keimzahl. Im OSV hingegen ist es wiederum die Probe 1 ohne Milch, welche die größte Keimzahlabnahme aufweist, während die mit Magermilch versetzte Probe einen geringen und die Vollmilchprobe gar keine Abnahme aufzeigt.

Als herabsetzende Faktoren für die Lagerungsfähigkeit von *L. acidophilus* wurden die anfängliche Säuerung und die Lagerungstemperatur beschrieben (KULP u. RETTGER 1924), allerdings sollte diese Beurteilung auf Stammes- und nicht auf Speziesebene geschehen.

L. johnsonii (S-14) zeigte anfangs einen hohen Keimgehalt, im Laufe der Lagerung ließ sich mit beiden Methoden nur für Probe 1 ein Vitalitätsverlust messen.

Zum einen ist die Lagerungsstabilität der *L. casei*-Gruppe größer als die der *L. acidophilus*-Gruppe, und *B. lactis* erwies sich stabiler als *B. longum* und *B. breve*. Auch VENTLING und MISTRY (1993) konnten zeigen, dass in Magermilch und ultrafiltrierter Milch das Wachstum von *B. longum* schlechter war als das anderer Bifidobakterien.

Zum anderen scheint Milch einen protektiven Einfluß auf die Lagerungsfähigkeit bzw. Überlebensfähigkeit der hier untersuchten probiotischen Bakterien zu haben. BUNTHOF et al. (2001b) fanden im FACSCalibur® heraus, dass mit Mutanolysin gestresste *Lactococcus*

lactis-Zellen in einer käseähnlichen Umgebung mit hohem Proteingehalt, Kalium und Magnesium wesentlich stabiler waren als ohne diese Zusätze.

Allerdings beeinträchtigten nicht nur die Partikel der Milch, sondern besonders die Fettbestandteile die Auswertung im Dotplot (siehe Kap. 4.2.3, Abb. 27). Je höher der Fettanteil, desto schwerer erwies sich die Abgrenzung der Bakterienwolken. Dies galt gleichermaßen für Laktobazillen und Bifidobakterien. Auch andere Autoren beschreiben die störenden Auswirkungen von Milchinhaltstoffen bei Messungen im FACS (BUNTHOF u. ABEE 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte besonders der Einfluß des Fettgehaltes gezeigt werden. Ferner liegen die im FACS ermittelten Werte oftmals über den im OSV bestimmten Keimzahlen. Da aber alle durchflusszytometrischen Werte oberhalb der Nachweisgrenze lagen (zwischen ca. 6,7-9,0 lg KbE/ml), wäre wie bei den Reinkulturen zu erwarten, dass beide Methoden übereinstimmen. Eine Erklärung für die höheren Werte im FACS könnte sein, dass die Bakterien zwar gestresst und nicht mehr vermehrungsfähig, aber dennoch vital und stoffwechselaktiv sind.

Die Hypothese wird durch die Untersuchungen von BUNTHOF et al. (2001b) untermauert. Sie konnten bei Joghurtstarterkulturen im FACS drei verschiedene Zellklassen identifizieren: kultivierbare Zellen, intakte und metabolisch aktive Zellen, die sich nicht kultivieren ließen sowie membranpermeable Zellen. Etwa 50 % aller Mutterstarterkulturbakterien waren permeabel für Totfarbstoffe, und von den vitalen Bakterien erwiesen sich 40-65 % als kultivierbar. Viele der gesundheitlichen Effekte könnten auch durch diese nur im FACS als vital erkennbare, aber nicht mehr auf Nährmedien kultivierbaren Bakterien bewirkt werden, z.B. durch Laktosespaltung, Produktion antimikrobieller Verbindungen, Assimilation von Cholesterol oder antioxidative Effekte (BUNTHOF u. ABEE 2002).

Auch in der bereits erwähnten Untersuchung von GUNASEKERA et al. (2003) konnten diese zeigen, dass nicht mehr kultivierbare Bakterienzellen in Rohmilch durchaus noch metabolisch aktiv waren und Proteine exprimierten. Dies ist für ein Qualitätsmanagement von Bedeutung.

5.2.4 Milchmischerzeugnisse

Die meisten probiotischen Produkte werden aus technologischen und Akzeptanzgründen als Milchmischerzeugnisse angeboten. Für die Säuerung und die erwünschte Textur dieser Produkte ist der Einsatz von Bakterienmischkulturen am besten, allerdings führen einzeln

ingesetzte Stämme zu besserem Wachstum und höherer Stabilität. Auch müssen Besonderheiten der ausgesuchten Spezies berücksichtigt werden, so zeigt *L. acidophilus* gutes Wachstum in Milch, besitzt aber eine geringe Lagerungsstabilität, während z.B. *L. rhamnosus* eher zögerlich wächst, dafür aber ein stabiles Lagerungsverhalten vorweist (SODONI et al. 2002). Durchflusszytometrisch und mittels OSV wurden 7 Milchlischerzeugnisse aus dem Handel hinsichtlich ihres Keimgehaltes untersucht. Die beiden Produkte mit Monokulturen von *B. bifidum* und *L. casei* Shiota (Nr. 5 u. Nr. 8) zeigten die größte Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden mit einer Differenz von 1,21 bzw. 1,38 Kbe/ml, wobei im FACS die höheren Werte ermittelt wurden. Diese Differenz ist vermutlich auf vitale, aber nicht mehr kultivierbare Bakterien zurückzuführen und spricht nicht gegen die Genauigkeit der Methode.

Schwieriger wird die Auswertung und Interpretation bei Mischkulturen, wie sie in herkömmlichen Joghurtprodukten und vielen probiotischen Erzeugnissen zu finden sind.

Die Unterschiede für *L. casei* und *S. thermophilus* schwankten zwischen 1,11 und 1,85 lg Kbe/ml, was relativ gering ist und neben der Robustheit der Stämme vielleicht auch auf eine klare Trennung der typischen Wolken zurückzuführen ist. Unterdessen war die schweiförmige Wolke von *L. acidophilus* schwerer abzugrenzen und zwischen FACS und OSV bestand eine Differenz von 2,81 lg Kbe/ml (Produkt Nr. 1 u. 2). Allerdings war dies vermutlich vor allem durch die geringe Lagerungsstabilität der *L. acidophilus*-Gruppe bedingt. Auch KLEIN et al. (1999) konnten nach einjähriger Lagerung von tiefgekühlten Milcherzeugnissen mit probiotischen Bakterien mittels klassischer Verfahren für die *L. casei*-Gruppe konstant hohe Keimzahlen nachweisen, während die *L. acidophilus*-Gruppe größere Schwankungen zeigte. Dies stimmt mit den Beobachtungen von DAVE und SHAH (1998) überein, die bei 35tägiger Lagerung von Joghurt für *S. thermophilus* keine und für *L. acidophilus* Keimzahlabnahmen von knapp 2,0 lg Kbe/ml feststellten. NIGHSWONGER et al. (1996) zeigten ebenfalls für einen in fermentierte Milchprodukte eingebrachten *L. casei*-Stamm während der 28tägigen Lagerung bei 5-7 °C keine Reduktion der Keimzahl, während verschiedene *L. acidophilus*-Stämme stammspezifisch signifikante Abnahmen zeigten. Die aus den Produkten isolierten *L. acidophilus*-Stämme wiesen im OSV Werte zwischen 6,11-7,34 lg Kbe/ml auf, während im FACS wesentlich höhere Werte zu ermitteln waren. Auch bei BUNTHOF und ABEE (2002) lagen die in Joghurtstarterkulturen und probiotischen

Produkten mittels Plattenzählverfahren ermittelten KbE/ml-Werte unter den im FACS durch Zugabe von Beads bestimmten Werten, zeigten aber eine große Kongruenz.

Wie auch bei der Untersuchung der Reinkulturen (Kap.5.2.2) kann das Durchflusszytometer wiederum neben toten und lebenden Zellen auch noch diejenigen sichtbar machen, die zwar noch vital und metabolisch aktiv, aber nicht mehr vermehrungsfähig und somit auf Nährmedien nicht mehr kultivierbar sind (BUNTHOF et al. 2001b).

Die Differenz beider Methoden lag bei den Produkten mit zwei verschiedenen Bakterienspezies unter der für Produkte mit mehr als zwei verschiedenen Kulturen. Wie erwartet zeigten sich die größten Differenzen (bis zu 3,82 lg KbE/ml) bei fetthaltigeren Produkten mit mehr als zwei eingesetzten Kulturen (Produkt Nr. 7, 9, 10). Hier erwies sich eine Abgrenzung der Bakterienwolken untereinander oder gegen Fettbestandteile oft als sehr schwierig und eine genaue Zuordnung teilweise als nicht möglich. Da eine Reduktion der Fettbestandteile nicht ohne Vitalitätsverlust der eingesetzten Bakterien möglich ist, wäre eine Möglichkeit der besseren Zuordnung die genaue Kennzeichnung der einzelnen Bakterienspezies.

So sind zur Identifizierung von *E. coli* und Pneumokokken im FACS bereits fluoreszenzmarkierte Gensonden oder serotypspezifische Antikörper erfolgreich eingesetzt worden (FUCHS et al. 1998, YU et al. 2005). Mithilfe von spezifischen Markern könnte man nicht nur probiotische Bakterien untereinander abgrenzen, sondern eventuell auch die Stammzugehörigkeit der Bakterien überprüfen. In einigen Bereichen werden spezifische, mit Fluorochromen gekoppelte Gensonden auf Speziesebene eingesetzt. Zur Ermittlung von inter- und intraspezifischen Verwandtschaftsgraden von Bifidobakterien wurden bereits 16S rRNA und 16S-23S rRNA Sonden angewandt, welche sich zur Identifizierung auf Stammesebene eignen (LEBLOND-BOURGET et al. 1996). Durch 16S rRNA-basierte Untersuchungen mittels FISH ist es HARMSSEN et al. (1999) gelungen, aus humanen Stuhlproben die Gesamtkeimzahl der Anaerobier und u.a. die Keimzahl von Bifidobakterien und Laktobazillen mikroskopisch zu bestimmen. Zur Identifizierung wurden die bifidobakterienspezifischen Oligonukleotide Bif164 sowie die laktobazillen- und enterokokkenspezifische Lab158, - jeweils gekoppelt an den Farbstoff DAPI, welcher auch im FACS eingesetzt wird – verwendet. Gelänge es, diese spezifischen Gensonden mit verschiedenen Fluorochromen zu kombinieren, könnte man einen Einsatz im FACS

versuchen. Denn Biomoleküle wie mono- oder polyklonale Antikörper oder Gensonden für *In-situ*-Hybridisierungsreaktionen können direkt oder indirekt fluoreszent derivatisiert und im FACS sichtbar gemacht werden (ROTHER 2007).

In probiotischen Erzeugnissen sind oft Fehldeklarationen der Hersteller zu beklagen, so ist mittels DNA-DNA-Homologiestudien statt des oft ausgewiesenen *L. acidophilus* ein anderes Mitglied seiner taxonomischen Gruppe, nämlich *L. johnsonii*, nachweisbar, während sich hinter *L. casei* oft die Spezies *L. paracasei* verbirgt (SCHILLINGER 1999). Diese wichtigen Unterschiede sind phänotypisch (z.B. mittels OSV) schwer bis nicht nachweisbar. Binnen weniger Stunden könnte man im FACS mittels oben beschriebener Techniken nicht nur die Vitalität bzw. Keimzahl, sondern auch noch die genaue Spezieszugehörigkeit der eingesetzten Bakterien bestimmen. Zwar gelingt bisher eine Kenntlichmachung der toten und vitalen Zellen und teilweise auch ein klares Abgrenzen der Wolken im Dotplot. Allerdings kann keine sichere Zuordnung dieser zu Bakterienspezies erfolgen.

Einige Bakterien wie beispielsweise *L. acidophilus* (langgezogene Schweifwolke) oder *B. bifidum* (kompakte Wolke) stellen sich zwar in typischen Wolkenformationen dar, so dass ein erfahrener Untersucher eine Zuordnung versuchen kann, die jedoch verifiziert werden muss.

Der Einsatz einer Sortierfunktion des FACS, um eine Identifizierung der Bakterienwolken zu ermöglichen, ermöglicht eine solche nachträgliche Bestätigung. Einige FACS-Geräte sind routinemäßig mit einem sogenannten „Sorter“ ausgestattet. Zellen mit bestimmten Eigenschaften werden in diesen Zellsortiergeräten nicht nur erkannt, sondern auch vereinzelt, wobei sich grundsätzlich alle im FACS analytisch erfassten Partikel auch sortieren lassen. Nach der hydrodynamischen Fokussierung wird durch Schwingungen der Düse der Flüssigkeitsstrahl der Probe aufgebrochen und in regelmäßige Tropfen aufgeteilt. Tropfen mit „erwünschtem“ Inhalt werden elektrostatisch aufgeladen und zwischen zwei geladenen Platten von anderen Tropfen abgelenkt. Durch positive und negative Ladung sowie verschiedene Ladungsstärken lassen sich bis zu vier Populationen parallel vereinzeln. Je nach Geräteausrüstung kann man die herausgefilterten Partikel nicht nur in Röhrchen sortieren, sondern direkt auf Objektträger oder Kulturplatten aufbringen lassen. Durch regelmäßige Reinigung und steriles Spülen des Flüssigkeitssystems kann die Kontaminationsrate sehr gering gehalten werden. Liegt der Schwerpunkt der Analyse auf dem Anspruch an Reinheit

empfiehlt sich eine Konzentration von maximal 10^6 Zellen/ml, soll die Ausbeute möglichst groß sein, eignen sich Zellkonzentrationen bis 10^8 Zellen/ml (CROSS u. DÖBEL 2007). Diese Größenordnungen scheinen Untersuchungen in den wichtigen Keimzahlbereichen zu erlauben. Durch das Sortieren der Bakterien z.B. nach Spezieszugehörigkeit mit der Möglichkeit zu anschließender kulturellen und mikroskopischen Diagnostik könnte eine direkte Zuordnung der Punktwolken zu einzelnen Bakterienspezies erfolgen.

5.2.5 Ausblick

Milchprodukte stellen in Deutschland einen wichtigen Wirtschaftsfaktor dar. Im Jahr 2006 lieferten Deutschlands Landwirte 27.136.000 Tonnen Milch an milchverarbeitende Betriebe, vorläufige Prognosen sagen für 2007 eine Steigerung um 2 % voraus. Neben anderen Erzeugnissen werden daraus 566.600 Tonnen Sauermilch, Kefir- und Joghurtherzeugnisse sowie 3.101.400 Tonnen Milchlischerzeugnisse hergestellt (ANONYM 2007b). Der Anteil probiotischer Produkte daran nimmt stetig zu. Private Verbraucher haben im Jahr 2007 ca. 88.393.816 Liter probiotischen Joghurt gekauft, das sind ca. 17,6 % der Joghurtgesamtmenge. Auf festen probiotischen Joghurt entfallen dabei etwa 64.670.000 Liter. Davon liegen 55,1 % der Produkte bei einem Fettgehalt von 1,6-1,8 %, 28,1 % enthalten zwischen 1,9-3,5% Fett, 5,0% liegen zwischen 3,6-3,9 %, 3,0 % haben einen Fettgehalt zwischen 0,3-1,5 %, die restlichen Anteile fallen auf Produkte mit $< 0,3$ oder $> 3,9$ % (Keunecke 2008¹). Damit ist der Anteil der Erzeugnisse mit niedrigem Fettgehalt bei probiotischen Produkten (ca. 86 % haben einen Fettgehalt $< 3,6\%$) wesentlich größer als bei normalen Joghurtprodukten (ca. 64 % haben einen Fettgehalt $< 3,6\%$). Neben der am schnellsten wachsenden Produktkategorie Milchlischerzeugnisse werden aber auch mehr probiotische Fruchtsäfte, soja- und cerealienbasierte fermentierte Produkte vertrieben. In Westeuropa beträgt der Umsatz mit diesen Produkten über 1,4 Milliarden Euro, wobei mit einem Umsatz von ca. 1 Milliarde Euro der Großteil auf Joghurts und Desserts entfällt. Für die nächsten 5 Jahre ist ein jährliches Wachstum von 7-8 % prognostiziert. Traditionell sind die Produkte in kleinen Portionen abgepackt, das bekannteste Format ist der 1994 durch Yakult eingeführte Drink in der für die tägliche Dosis abgepackten 7-Tage-Variante.

¹ Persönliche Mitteilung von Frau Dr. K. Keunecke, ZMP, Bonn am 31. März 2008

Die heutigen Marktführer sind Danone und Yakult (welche beide einen *L. casei*-Stamm deklarieren), zusammengenommen mit einem Marktanteil von ca. 1,2 Milliarden Euro für das Jahr 2003. In Europa liegt der Pro-Kopf-Verzehr von fermentierten Milchprodukten bei 35-45 Litern pro Jahr, wobei in Deutschland etwa 15 Liter Joghurt und 30 Liter andere fermentierte Milchprodukte pro Jahr verzehrt werden (SAXELIN 2008).

In den Supermarktregalen bieten nur wenige Hersteller Produkte mit Monokulturen an, obgleich dazu auch Marktführer wie z.B. Yakult (*L. casei* Shirota) gehören. Ein Großteil der probiotischen Milchlischerzeugnisse basieren auf Mischkulturen. So beträgt bei großen Starterkulturerzeugern der Anteil von Monokulturen für die Milchwirtschaft ca. 1 % (Müller 2008²).

Das Vorkommen dieser Mischkulturen erschwert auch die Bestimmung des Bakteriengehaltes in probiotischen Produkten von amtlicher Seite, so dass sich Untersuchungseinrichtungen teilweise auf den kulturellen Nachweis der Gesamtkeimzahl Milchsäurebildner beschränken, damit aber keine Aussage über den Gehalt an probiotischen Bakterien oder gar deren Stammeszugehörigkeit treffen können.

Der relativ niedrige Fettgehalt der meisten probiotischen Milchlischerzeugnisse spricht für einen Einsatz der Durchflusszytometrie, da bei dieser Konstellation mit wenig und zu vernachlässigenden Interferenzen zu rechnen ist. Allerdings erfordert der überwiegende Einsatz von Starterkulturen mit mehreren Bakterienspezies eine Modifikation der Methode durch die Anwendung von spezifischen Markern, um die probiotischen Bakterien auf Spezies- oder Stammesebene sicher identifizieren zu können. Ein Einsatz des FACS ist aber bereits jetzt sinnvoll bei Monokulturen mit niedrigem Fettgehalt und den sogenannten Probiotik-Drinks.

² Persönliche Mitteilung von Frau Dr. C. Müller, Chr. Hansen, Nienburg am 1. April 2008

6 SCHLUSSFOLGERUNGEN

1. Die Einsetzbarkeit vom FACS zur Quantifizierung probiotischer Kulturen ist grundsätzlich gegeben.
2. Das Verhältnis von toten und lebenden Bakterien ist mittels Durchflusszytometer (FACS) innerhalb weniger Stunden verfügbar, während die Keimzahlbestimmung mit kultureller Methode (OSV) 72 Stunden dauert.
3. Im Durchflusszytometer besteht eine methodisch bedingte Nachweisgrenze von 10^5 KbE/ml, d.h. oberhalb dieses Wertes ist die Methode zur Quantifizierung geeignet.
4. Da die Nachweisgrenze der durchflusszytometrischen Methode bei 10^5 KbE/ml und der geforderte Gehalt probiotischer Bakterien bei 10^6 KbE/ml liegen, ist die Durchflusszytometrie zur Keimzahlbestimmung probiotischer Produkte grundsätzlich geeignet.
5. Im Laufe der Lagerung von Milchprodukten sind im FACS meist höhere Keimzahlen messbar als im OSV, weil im Durchflusszytometer die Quantifizierung lebender, wenn auch nicht mehr vermehrungsfähiger Bakterien möglich ist, während diese im OSV nicht mehr nachweisbar sind.
6. Milch scheint einen protektiven Einfluß auf die Überlebensfähigkeit von Bifidobakterien und Laktobazillen zu haben.
7. Die Matrix Milch stellt eine Herausforderung dar, da sie mit steigendem Fettgehalt die Auswertung der Messergebnisse durch interferierende Punktwolken erschwert.
8. Produkte mit Monokulturen liefern im FACS durch gute Abgrenzbarkeit, weniger Interferenzen und eindeutige Zuordnung bessere Ergebnisse als Mischkulturen.
9. Bei Mischkulturen sind zur Identifizierung von Bakterien im Durchflusszytometer zusätzliche Marker erforderlich.

6 SCHLUSSFOLGERUNG

7 ZUSAMMENFASSUNG

Birte Ahlfeld:

Durchflusszytometrische Bestimmungen von probiotischen Starterkulturen unter besonderer Berücksichtigung von Laktobazillen und Bifidobakterien

Probiotische Produkte erfreuen sich weltweit zunehmender Beliebtheit. Mikroorganismen, die eine gesundheitsbezogene Wirkungskomponente besitzen, stellen hierbei den wertbestimmenden Anteil dar und sind von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Als Voraussetzung für einen physiologischen probiotischen Effekt gilt ein Gehalt von 10^6 KbE/g Produkt. Die Keimzahlbestimmung probiotischer Bakterien aus Milchprodukten erfolgt bisher kulturell auf Elektiv- und/oder Selektivnährböden. Es existiert aber bislang keine Standardmethode. Da die kulturelle Methode außerdem zeitaufwendig ist, sind Schnellmethoden zur quantitativen Bestimmung wünschenswert.

In diese Arbeit wurden daher 10 Stämme der Gattung *Lactobacillus* (*L.*), 7 der Gattung *Bifidobacterium* (*B.*), ein Stamm der Spezies *Escherichia* (*E.*) *coli* sowie Kulturen aus 10 Milchlischerzeugnissen und 3 pharmazeutischen Präparaten (zwei Monokulturen mit *E. coli*, eine Mischkultur mit *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., *Lactococcus lactis*) einbezogen. Reinkulturen wurden entweder in Bouillon pur oder in Bouillon mit 25 % Milch (0,3 % und 3,5 % Fett) eingemischt und ebenso wie ein Teil der Milcherzeugnisse bei 4 °C für 42 Tage gelagert und an Tag 1, Tag 21 und Tag 42 untersucht. Die Pharmazeutika wurden 5 mal im monatlichen Intervall untersucht.

Die Untersuchungen fanden parallel im Durchflusszytometer (FACSCalibur[®], Becton Dickinson) mithilfe der Fluoreszenzfarbstoffe SYTO[®]9 (Lebend- und Totfarbstoff), TO-PRO[®]-3 und PJ (Totfarbstoffe) sowie mittels Oberflächenspatelverfahren (OSV) auf verschiedenen Elektiv- bzw. Selektivnährböden (MRS, MRS-V, MUP, X-Glu, RCM, M-17, PC) statt. Zur Quantifizierung erfolgte im FACS die Zugabe einer bekannten Anzahl Beads (PeakFlow[™] Orange flow cytometry reference beads 2,5 µm, $1,2 \times 10^8$) in bekanntem Volumen, wodurch rechnerisch der Gehalt der untersuchten Bakterien ermittelt werden konnte.

Im Laufe der 42tägigen Lagerung wurde die bakterielle Vitalität von Reinkulturen und Produkten mit dem Durchflusszytometer bestimmt und mit den Änderungen der Keimzahlen des kulturellen Verfahrens verglichen. Die Fluoreszenzfarbstoffe ermöglichten die

Unterscheidung von vitalen und toten Bakterien sowie eine prozentuale Bestimmung dieser Parameter.

Danach wurde die Quantifizierung im FACS mithilfe von Beads (Dreifachansatz) etabliert. Zur Festlegung der Nachweisgrenze erfolgten Untersuchungen von Reinkulturen und einem Produkt mit Monokultur. Während des 42tägigen Lagerungsversuches wurde eine Keimzahlbestimmung von Reinkulturen mit und ohne Milchzusatz sowie Milchlischerzeugnissen durchgeführt. Die gewonnenen Werte wurden stets mit den mittels OSV (Doppelansatz) ermittelten Keimzahlen verglichen.

Bei der Untersuchung der 12 Reinkulturen nahm die mittels OSV bestimmte Keimzahl ab, während parallel der Anteil toter Bakterien im FACS zunahm. 9 Stämme wie z.B. *L. casei* (S-16) und *B. animalis* (S-4) zeigten relativ gleichbleibende Anteile bzw. eine geringe Abnahme vitaler Bakterien und Keimzahlen (Abnahme vitaler Bakterien 2,7-23 %, $|\Delta \text{KZ}| = 0,02\text{-}1,51 \text{ lg KbE/ml}$). 3 Stämme wie z.B. *L. johnsonii* (S-14) und *B. longum* (S-7) zeigten einen sehr großen Vitalitäts- und Keimzahlverlust (Abnahme vitaler Bakterien 67,3-79,7%, $|\Delta \text{KZ}| = 3,68\text{-}8,08 \text{ lg KbE/ml}$).

Bei der Untersuchung der Milchlischerzeugnisse konnte im OSV gezeigt werden, dass die im Produkt eingesetzten Stämme von *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium* sp. und *S. thermophilus* während der Lagerung sehr stabil blieben ($|\Delta \text{KZ}| \leq 0,7 \text{ lg KbE/ml}$). Anders verhielt sich *L. acidophilus*, welcher stets eine große Abnahme der Keimzahl aufwies, wenn auch teilweise erst nach Ablauf des MHD. Im FACS war eine Zuordnung der Bakterienwolken nur präsumtiv möglich.

Die Vitalität für Präparate mit Monokultur von *E. coli* ließ sich gut darstellen. Wie für die Reinkulturen ermittelt zeigte sich parallel zum Vitalitätsverlust eine Abnahme der Keimzahlen. Am MHD ließen sich im OSV mindestens 8,2 lg KbE/ml nachweisen. Im pulverförmigen Produkt mit einer Mischkultur von Laktobazillen, Bifidobakterien und Laktokokken ließ sich zwar im FACS die Vitalität der Bakterienwolken ermitteln, allerdings konnte wie bei den Milchlischerzeugnissen nur eine präsumtive Zuordnung zu den eingesetzten Stämmen erfolgen.

Bei der Ermittlung der Nachweisgrenze nahmen die mittels OSV bestimmten Keimzahlen parallel zu den Verdünnungsstufen ca. 1 lg KbE/ml ab, während die im FACS gewonnenen

Keimzahlen nach anfangs gleicher Entwicklung bei etwa 10^5 KbE/ml stagnierten. Somit betrug die Nachweisgrenze der Keimzahlbestimmung im FACS 10^5 KbE/ml.

Die Keimzahlen für Reinkulturen mit Milchzusatz wiesen im FACS und OSV anfangs gleiche Keimgehalte auf. Allerdings waren im Laufe der 42tägigen Lagerung im FACS teilweise signifikant höhere Keimzahlen messbar als im OSV. In den Proben mit Milchzusatz waren häufig signifikant höhere Keimzahlen messbar als ohne Milchzusatz.

Milchmischerzeugnisse mit Monokulturen lieferten mittels beider Methoden vergleichbare Ergebnisse, während sich wie schon bei der Vitalitätsbestimmung festgestellt die Zuordnung und Abgrenzung der Bakterienwolken für Mischkulturen im FACS nur präsumtiv vornehmen ließ.

Für Messungen von Reinkulturen sowohl zur Qualifizierung als auch zur Quantifizierung erwies sich das Durchflusszytometer als geeignet. Die Nachweisgrenze von ca. 10^5 KbE/g lag unter dem geforderten Mindestgehalt probiotischer Bakterien von 10^6 KbE/g, so dass das Durchflusszytometer für quantitative Bestimmungen von probiotischen Produkten geeignet erschien. Die Höhe der Nachweisgrenze stimmte mit den Erkenntnissen anderer Arbeiten überein. Im Lagerungsverlauf wurden im FACS teilweise höhere Werte als im OSV bestimmt. Ursächlich könnten im Durchflusszytometer quantifizierbare, lebende, wenn auch nicht mehr vermehrungsfähiger Bakterien sein, die mit dem kulturellen Verfahren nicht mehr nachweisbar waren. Qualitätskontrollen wurden bisher mittels kultureller Verfahren durchgeführt und können – gerade nach Lagerung - nicht sicher alle vitalen, gestressten Bakterien durch Wachstum erfassen. Der alternative Einsatz eines Durchflusszytometers würde die gleichzeitige Erfassung von Vitalität und Keimzahl der Bakterien innerhalb kurzer Zeit erlauben.

Milch schien einen protektiven Effekt auf die Lagerungsstabilität zu haben. Allerdings konnte gezeigt werden, dass bei Milchzusatz höhere Fettgehalte die Auswertung am FACS erschwerten, während bei einem mäßigen Fettanteil – wie bei der Mehrzahl probiotischer Produkte gegeben - gute Ergebnisse zu erzielen waren. Bei der Untersuchung von Milchprodukten mit Mischkulturen verhinderten überlappende Bakterienwolken eine sichere Zuordnung der im FACS gemessenen Bakterien. Hier wären für eine Zuordnung der Bakterien spezielle Marker wie z.B. Antikörper und Gensonden oder der Einsatz der Sortierfunktion am FACS wünschenswert.

Zur Vitalitäts- und Keimzahlbestimmung von Bakterien aus Rein- und Monokulturen scheint die Durchflusszytometrie mit einer Nachweisgrenze von ca. 10^5 KbE/g geeignet. Im FACS lassen sich zusätzlich vitale, obgleich nicht mehr vermehrungsfähige Bakterien darstellen, die durchaus noch probiotisch wirksam sein könnten. Bei einer weiteren Produktgruppe, den Milchprodukten mit Mischkulturen, sind gegebenenfalls zusätzlich Techniken zur Speziesidentifizierung im FACS erforderlich.

8 SUMMARY

Birte Ahlfeld:

Determination of probiotic starter cultures via flow-cytometry with special reference to lactobacilli and bifidobacteria

The popularity of probiotic products has been increasing worldwide. Microorganisms with health-related properties represent an economically important fraction of these products. A content of 10^6 cfu/g product is considered to be a prerequisite for any physiological probiotic effect. The total bacterial count of probiotic bacteria has been done culturally on elective and/or selective media so far. However, a standard method has not been established yet. As culturing is time-consuming, a rapid method for a quantitative determination of bacteria would be desirable.

Therefore, 10 strains of *Lactobacillus* (*L.*) spp., 7 of *Bifidobacterium* (*B.*) spp., one of *Escherichia* (*E.*) *coli* as well as cultures from 10 flavoured milks and 3 pharmaceutical preparations (two monocultures with *E. coli*, and one mixed culture containing *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., and *Lactococcus lactis*) were considered for the present survey. Monocultures were suspended in either pure bouillon or in bouillon containing 25 % milk (0.3 and 3.5 % fat) and were stored for 42 days at 4 °C, as were some of the flavoured milk products. Samples were evaluated on day 1, 21 and 42. Pharmaceutical preparations were analysed five times at monthly intervals.

Analysis were carried out in parallel in a flow cytometer (FACSCalibur[®], Becton Dickinson) using the fluorescent dyes SYTO[®]9 (live/dead staining), TO-PRO[®]-3 and PJ (dead staining), and via the surface spatula method (OSV) on a series of elective and selective media (MRS, MRS-V, MUP, X-Glu, RCM, M-17, PC). Quantification by FACS was achieved adding a known quantity of beads (PeakFlow[™] Orange flow cytometry reference beads 2.5 µm, 1.2 x 10⁸) to a known volume. This allowed the enumeration of bacteria present in a given sample.

During the 42 days of storage, bacterial vitality in monocultures and milk products was determined via flow cytometry and was compared to the changes in the bacterial counts detected during conventional culturing. The fluorescent dyes permitted the differentiation between vital and dead bacteria as well as the determination of these parameters on a percentage level.

The method of quantifying bacteria via FACS and using beads (triple set of solutions per sample) was established subsequently. Pure cultures and monoculture from one product were further investigated in order to assess a limit of detection. Determination of bacterial counts of pure cultures with and without milk additive as well as of flavoured milk products was carried out during the 42-days storage phase. The data obtained were constantly compared to the bacterial counts resulting from the OSV method (double set of solutions per sample).

During the analysis of the 12 pure cultures, bacterial counts as determined via OSV decreased while the amount of dead bacteria detected by FACS increased in parallel. 9 strains, e.g. *L. casei* (S-16) and *B. animalis* (S-4) yielded constant amounts or slight reductions in the percentage of dead bacteria and bacterial counts (reduction of viable bacteria by 2.7 – 23.0 %, $|\Delta BC| = 0.02 - 1.51 \text{ lg cfu/ml}$). With 3 strains, e.g. *L. johnsonii* (S-14) and *B. longum* (S-7), a marked decrease in vitality and bacterial counts was observed (reduction of viable bacteria by 67.3 – 79.7 %, $|\Delta BC| = 3.68 - 8.08 \text{ lg cfu/ml}$).

While analysing the flavoured milk products, results obtained via OSV showed that strains of *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium* sp. and *S. thermophilus*, remained at a very stable level during storage ($|\Delta BC| \leq 0.7 \text{ lg cfu/ml}$). The case of *L. acidophilus* was a different one, since bacterial counts of this strain always decreased constantly, although this phenomenon sometimes did not occur before reaching the best of date. The attribution to different bacteria to corresponding dot plots was, however, merely presumptive.

The vitality of preparations containing *E. coli* in monoculture could be demonstrated readily. As previously established for the pure cultures, loss of vitality was linked to decreasing bacterial counts. Using OSV, a minimum of 8.2 lg cfu/ml was detected by the best of date. Vitality of the bacteria dot plots could be asserted in the powdery product containing mixed cultures of lactobacilli, bifidobacteria, and lactococci via FACS, but a direct attribution to the different strains was as presumptive as seen already with the flavoured milk products.

When establishing a limit of detection, the bacterial counts determined by OSV decreased in parallel to the dilution by approx. 1 lg cfu/ml while data obtained via FACS showed that after taking a similar course, the bacterial counts remained static at approx. 10^5 cfu/ml . Thus, the limit of detection of bacterial counts via FACS amounts to 10^5 cfu/ml .

Bacterial counts of pure cultures with milk additive initially were the same in FACS and OSV. However, significant higher bacterial counts during storage were detected via FACS than were with OSV. Samples with milk additive yielded significantly more bacteria than samples without milk additive did in most cases.

Applying both methods to flavoured milk products containing monocultures, no significant differences occurred. Regarding flavoured milk with mixed cultures however, precise differentiation and attribution of dot plots to the different strains were merely presumptive, similar to the situation encountered during vitality analysis.

The data suggests that flow cytometry is suitable for qualitative analysis and quantification of pure cultures. The limit of detection established - 10^5 cfu/g – ranges well below the recommended minimum content of probiotic bacteria (10^6 cfu/g) implying therefore that flow cytometry may be used for quantitative analysis of probiotic products. The level of the detection limit corresponds with the results stated in the literature. Some higher bacterial counts were measured via FACS during storage. This may be due to the presence of viable bacteria that however were incapable of reproduction. These can be quantified by FACS but would elude conventional cultivation at the same time. So far, quality inspections were performed using culture methods that may be unable to detect all vital, stressed bacteria by growth, especially after storing. Using flow cytometry as an alternative would permit a simultaneous measurement of the amount and the vitality of bacteria in probiotic products.

It appeared that milk had a protective effect on the product stability during storage. However, it was seen that the increased amounts of fat in milk hampered the measurement by FACS. Lower fat contents which are typical for most probiotic products however were revealed good results. While analysing milk products that contained many different cultures, overlapping dot plots made a reliable attribution of dot plots to the corresponding strains via FACS impossible. To cope with this, special markers, e.g. antibodies, gene probes or applying a sorting function while performing FACS measurement could improve this drawback.

Flow cytometry, with a detection limit of 10^5 cfu/g, seems also a suitable method to determine bacterial counts and vitality in pure cultures and monocultures. Additionally, living (yet non-reproducing) bacteria may be detected that still possess probiotic properties. Concerning milk products that contain mixed cultures however, additional techniques to identify the species should be integrated into the FACS analysis, where necessary.

8 SUMMARY

9 ANHANG**9.1 Nährmedien**MRS-Bouillon (Lactobacillus-Bouillon nach de Man, Rogosa und Sharpe)

Art. Nr. CM 359, Oxid.

Typische Zusammensetzung:	(g/l)
Pepton	10,0
Fleischextrakt `Lab-Lemco`	8,0
Hefeextrakt	4,0
Glucose	20,0
`Tween`80	1,0
Dikaliumhydrogenphosphat	2,0
Natriumacetat	5,0
Triammoniumcitrat	2,0
Magnesiumsulfat	0,2
Mangan(II)-sulfat	0,05
pH 6,2 ± 0,2	

Herstellung:

52 g MRS-Bouillon-Basis in 1 l Aqua dest. unter rühren bei 60°C lösen und bei 121°C für 15 min. autoklavieren.

MRS-Agar (Lactobacillus-Agar nach de Man, Rogosa und Sharpe).

Art. Nr. CM 361, Oxid.

Die Zusammensetzung des MRS-Agars ist die gleiche wie die der Bouillon, zusätzlich sind 10 g Agar zugesetzt.

Herstellung:

62 g MRS-Basis in 1 l Aqua dest. im Dampftopf lösen, bei 121°C für 15 min. autoklavieren.

RCM-Bouillon (Reinforced Clostridial Medium)

Art. Nr. 218081, Difco

Typische Zusammensetzung: (g/l)

Pankreatisch abgeb. Casein	5,0
Protease-Pepton Nr.3	5,0
Rinderextrakt	10,0
Hefeextrakt	3,0
Dextrose	5,0
Natriumchlorid	5,0
Lösl. Stärke	1,0
Cystein-HCL	0,5
Natriumacetat	3,0
Agar	0,5

pH 6,8 ± 0,2

Herstellung:

38g RCM-Basis in 1 l Aqua dest. im Dampftopf lösen, bei 121 °C für 15 min. autoklavieren.

RCM-Agar (Reinforced Clostridial Medium)

Art. Nr. 218081, Difco

Zur Grundlage der Bouillon werden 14,5g Agar je Liter zugegeben.

Herstellung:

52,5 g RCM-Agar-Basis in 1 l Aqua dest. im Dampftopf lösen, bei 121 °C für 15 min. autoklavieren.

X-Glu-Agar

Typische Zusammensetzung:	(g/l)
Caseinpepton	10,0
Hefeextrakt	5,0
Kaliumhydrogenphosphat	6,0
Ammoniumhydrogencitrat	2,0
Natriumacetat	15,0
Magnesiumsulfat	575 mg
Eisen(II)Sulfat	34 mg
Mangansulfat	12 mg
Tween 80	1,0
Agar	12,0
pH 5,5	

Supplement:

Glukose	20,0
X-Glu (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β-D-Glucopyranoside)	20 mg

Herstellung:

Mit 880 ml Aqua dest. Zutaten im Dampftopf lösen. Durch Zugabe von 98 % Essigsäure den pH-Wert auf 5,8 einstellen und den flüssigen Agar in 5 x 176 ml-Portionen abfüllen. Für 15 min. bei 118 °C autoklavieren, vor dem gießen auf 50 °C temperieren.

Glukose-Lösung:

Zur Herstellung einer 20 %igen Lösung 20,0 g Glukose in 100,0 ml Aqua dest. Lösen und bei 121 °C für 15 min. autoklavieren

Tris-HCL-Puffer für X-Glu-Enzymkomponente:

15,0 ml 0,1 M HCL werden mit 25,0 ml 0,2 M Tris-Puffer (lösen von 2,422 g Tris in 100 ml Aqua dest.) in einem 100 ml Meßkolben vermennt und auf 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Autoklavieren erfolgt bei 121 °C für 15 min., alternativ kann sterilfiltriert werden (Porengröße 0,2 µm).

X-Glu-Enzymkomponente:

25 mg X-Glu-Enzymkomponente werden steril in 25 ml 0,2 M Tris-HCL-Puffer eingebracht und wenigstens 30 min. im Ultraschallbad gelöst.

Unmittelbar vor dem gießen der Platten werden je 176 ml Agar 20 ml der 20 %igen Glukose-Lösung sowie 4 ml der X-Glu-Lösung steril zugegeben.

MUP-Agar (Mupirocin-Agar):

Typische Zusammensetzung: Basismedium wie RCM-Agar

Supplement:

Mupirocin 50,0 mg

Herstellung:

RCM-Agar nach Herstellerangaben im Dampftopf lösen, 5 x 200 ml-Einheiten abfüllen, bei 121 °C für 15 min. autoklavieren. Der pH liegt bei 6,9.

Mupirocin-Supplement:

50,0 mg Mupirocin in 10 ml sterilem Aqua dest. lösen.

Zu je 200 ml des auf 50 °C temperierten Agars werden vor dem gießen 2 ml Antibiotikum-Lösung sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm).

MRS-V-Agar:

Typische Zusammensetzung: Basismedium wie MRS-Agar .

Supplement:

Vancomycin 50 mg

Herstellung:

MRS-Agar in 950 ml Aqua dest. im Dampftopf lösen, 5 x 190 ml-Einheiten abfüllen, bei 118 °C für 15 min. autoklavieren. Der pH liegt bei 5,7.

Vancomycin-Supplement:

50,0 mg Vancomycin in 50 ml verdünntem Alkohol (1:1 Alkohol : Aqua dest.) lösen und unmittelbar vor dem gießen des auf 50 °C temperierten Agars je 190 ml Agar 10 ml Vancomycin-Lösung sterilfiltrieren (Porengröße 0,2 µm).

M 17-Agar (Oxoid CM 785)

Typische Zusammensetzung:	(g/l)
Caseinpepton	5,0
Sojamehlpepton	5,0
Fleischextrakt `Lab-Lemco`	5,0
Hefeextrakt	2,5
Ascorbinsäure	0,5
Magnesiumsulfat	0,25
Dinatrium-β-Glycerophosphat	19,0
Agar	11,0

pH 6,9 ± 0,2

Laktose-Lösung:

10 g Laktose werden in 100 ml Aqua dest. gelöst. Sterilfiltrieren (Porengröße 0,2 µm) oder bei 121 °C für 15 min. autoklavieren.

Herstellung:

In 950 ml Aqua dest. werden 48,25 g M 17 Agar-Basis im Dampftopf gelöst und bei 121 °C für 15 min. autoklaviert. Vor dem gießen werden 50 ml sterile, 10 %ige Laktose-Lösung zugegeben.

Plate-Count-Agar (PC-Agar, Oxoid CM 325):

Typische Zusammensetzung:	(g/l)
Trypton	5,0
Hefeextrakt	2,5
Glukose	1,0
Agar	9,0
pH 7,0 ± 0,2	

Herstellung:

In 1000 ml Aqua dest. werden 17,5 g PC- Agar-Basis im Dampftopf gelöst und bei 121 °C für 15 min. autoklaviert.

9.2 Reagenzien

9.2.1 Reagenzien für OSV

Agar No.1	Oxoid (LP0011), Hampshire, England
Ammoniumhydrogencitrat	Merck (4145673), Darmstadt
Caseinpepton	Oxoid (LP0042), Hampshire, England
Eisen(II)-sulfat	Merck (6194979), Darmstadt
D(+)-Glukose-Monohydrat	Merck (1.08342.1000), Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck (4873), Darmstadt
Hefeextrakt	Oxoid (L 21), Hampshire, England
Laktose	Merck (7656), Darmstadt
Magermilch, gepulvert	Oxoid (811335), Hampshire, England
Magnesiumsulfat	Merck (1.05886.0500), Darmstadt
Mangan(II)-sulfat-1-hydrat	Merck (5963), Darmstadt
Mupirocin	Promochem, Middlesex, England
Natriumacetat	Merck (2364801), Darmstadt
Natriumbicarbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma Aldrich Chemie GmbH (S8875), München

Natriumchlorid	Oxoid (LP0005), Hampshire, England
Natriumhydrogenphosphat	Merck (1.06579.0500), Darmstadt
Ringer-Tabletten	Merck Eurolab GmbH (1.15525.0001), Darmstadt
TRIS-Puffer	Roth (48552), Karlsruhe
Tween 80	Merck (1.05267), Darmstadt
Vancomycinhydrochlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH (S8875), München
X-Glu (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucopyranoside)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

9.2.2 Reagenzien für die Durchflusszytometrie

Natriumazid (NaN_3), 10 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH (S-2002), München
Natriumhypochlorit-Lösung 12 %	Roth (9062), Karlsruhe
PeakFlow™Orange flow cytometry reference beads, 2,5 μm	Molecular Probes (P-14629), Leyden, Niederlande
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4 ohne Ca^{2+} und MG^{2+} , pulverisiert	Sigma Aldrich Chemie GmbH (1000 – 3), München

Propidiumjodid (PJ)	Sigma Aldrich Chemie GmbH (28.707-5), München
Syto [®] 9	Molecular Probes (T-), Leyden, Niederlande
Toluidinblau	Merck Eurolab GmbH (1.15930.0025), Darmstadt
TO-PRO [®] -3	Molecular Probes (T-3605), Leyden, Niederlande

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

Ein Beutel Trockensubstanz wurde in 1 l A. tridest. gelöst. Der pH-Wert der fertigen Lösung betrug 7,4, die Lösung beinhaltete folgende Bestandteile in den angegebenen Konzentrationen:

NaCl 137,0 µmol/ml

KCl 2,7 µmol/ml

N₂HPO₄ 8,1 µmol/ml

KH₂PO₄ 1,12 µmol/ml

Trägerflüssigkeit für die Durchflusszytometrie (Sheath fluid)

Zu sterilfiltriertem PBS wurde 0,1 mg/ml Natriumazid (NaN₃) gegeben.

A. tridest.

Sterilfiltriertes A. tridest. (Porengröße 0,2 µm) wurde als Nachspüllösung für das Durchflusszytometer verwendet.

Natriumhypochlorid

Eine 12 %ige Natriumhypochloridlösung wurde mit A. tridest. 1:12 zu einer 1 %igen Natriumhypochloridlösung verdünnt und als Spüllösung für das Durchflusszytometer verwendet.

9.2.3 Technische Geräte

Analysenwaage Sartorius analytic	Sartorius, Göttingen
Autoklav Varioklav [®] Dampfsterilisator	H + P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Bürker-Zählkammer	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Fluoreszenz-Durchflusszytometer, Modell FACSCalibur [®] , mit angeschlossener Computereinheit	Becton Dickinson, Heidelberg
Heidolph [®] Reax top	Heidolph Instruments (515-10000), Schwabach
Heißluftsterilisator	Rubarth Apparate GmbH, Hannover
Lichtmikroskop Zeiss Axiolab	Zeiss, Oberkochen
Microprocessor pH-Meter pH539	WTW, Weilheim

Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Eppendorf Research®, verschiedene Modelle; einstellbar von 0,5 – 10 µl; 20 – 200 µl; 100 – 1000 µl; 1000 – 5000 µl; Fixvolumen 10 µl und 50 µl	Eppendorf, Hamburg
Wärmeschrank 37 °C	Memmert, Schwalbach
Wasserbad mit Temperaturregelung	GFL, Typ 1003, Hannover
9.2.4 Glas- und Einmalartikel	
Anaerobierindikator	Oxoid, Hampshire, England
AnaeroGen™ 2,5 l und 3,5 l	Oxoid (AN0025A; AN0035A), Hampshire, England
Anaerobiertopf 2,5 l	Oxoid, Hampshire, England
Anaerobiertopf, groß (GAS PAK)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg- Wieblingen
Combitips plus (1,0 ml; 2,5 ml)	Eppendorf, (0030 069.234; 0030 069.242), Hamburg
Filtrationseinheit, Porengröße 0,2 µm	Sarstedt AG (83.1826.0001), Nümbrecht
Glasflaschen 250 ml Jenaer Glas	Schott (3501), Mainz

Glasflaschen Duran [®] mit Schraubverschluß 100 ml, 500 ml und 5l	Landgraf Laborgeräte OHG, Langenhagen
Microbank [™]	PRO-LAB Diagnostics, Richmond Hill, Ontario, Kanada
Pipettenspitzen Standartips [®] ; 10 µl, 2 – 200 µl, 50 – 1000 µl, 100 – 5000 µl	Eppendorf, Hamburg
Plattierungsspatel (Einmalspatel)	Sarstedt AG (86.1569.001), Nümbrecht
Reagenzglas Duran [®] 13 ml	Schott Glaswerke, Mainz
Röhrchen für die Durchflusszytometrie, 5 ml, aus Polypropylen (FACS-Röhrchen)	Sarstedt AG (55.468), Nümbrecht
Röhrchen, 15 ml und 50 ml mit Deckel	Sarstedt AG (62.554.502; 62.547.254), Nümbrecht
Safe-Lock-Tubes 1,5 ml (Eppendorf Reaktionsgefäße)	Eppendorf (003120.086), Hamburg
Spritzen, 2 ml; 10 ml	Roth (0058.1), Karlsruhe

9.3 Gramfärbung

Lösungen für die Gramfärbung

I. Carbolgentianaviolett

Stammlösung = gesättigte, alkoholische Gentianaviolettlösung

13 g Gentianaviolett B wurden in 1000 ml 96 % Alkohol aufgelöst und nach 2 Tagen Standzeit filtriert.

Gebrauchslösung (10 %):

90 ml Stammlösung wurden mit 10 ml Phenol (Carbolsäure) und 900 ml A. dest. vermischt.

II. Lugolsche Lösung

Stammlösung

50 g kristallines Jod und 150 g Kaliumjodid (Substanz) wurden in 500 ml A. dest. gelöst.

Gebrauchslösung (1:30)

30 ml Stammlösung wurden in 870 ml A. dest. gegeben.

III. Carbofuchsin

Zur Herstellung einer gesättigten, alkoholischen Fuchsinlösung wurden 100 g Diamantfuchsin in 1000 ml 96 % Alkohol aufgelöst (leicht erwärmt und anschließend filtriert).

Stammlösung

40 ml gesättigte, alkoholische Fuchsinlösung und 20 ml Phenol (Carbolsäure) wurden mit 400 ml A. dest. vermischt.

Gebrauchslösung (10 %)

100 ml der Stammlösung wurden zu 900 ml A. dest. gegeben.

Zur Erstellung eines Bakterienpräparates wurde entweder eine Öse Bouillon auf einen Objektträger aufgebracht oder eine Bakterienkolonie in einen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung auf einem Objektträger verrieben.

Nach Hitze-fixierung erfolgte eine Färbung nach Gram. Der Objektträger wurde für 3 min. mit Carbolgentianaviolett bedeckt, dieses abgeschüttet und für 2 min. mit Lugolscher Lösung nachgefärbt. Nach Abschütten der überschüssigen Farbe erfolgten ein Entfärben in Brennspritus und ein Auftrag von verdünntem Fuchsin für 15 sec.

Anschließend wurde mit Wasser abgespült und der Objektträger getrocknet.

Toluidinblaulösung

Toluidinblau wurde zu 2 mg/ml in A. monodest. gelöst.

9.4 Probenaufbereitung

¼-starke Ringerlösung

Zur Erstellung von Verdünnungsreihen mit Laktobazillen und Bifidobakterien wurde sterile, ¼-starke Ringerlösung verwendet. In 500 ml demineralisierten, neutralem Wasser wurde eine Tablette gelöst und die Flüssigkeit bei 121 ° C für 15 min. autoklaviert. Der pH lag bei $7,0 \pm 0,2$.

8,5 %ige Natriumchloridlösung

Zur Erstellung von Verdünnungsreihen mit *E. coli* wurde sterile 8,5 %ige Natriumchloridlösung verwendet. Hierfür wurden 8,5 g Natriumchlorid in 1000 ml A. dest. gelöst und bei 121 °C für 15 min. autoklaviert.

9.5 Stammsammlung

Vorbereitung der Stämme für die Aufnahme in die Stammsammlung

Reinkulturen

Von den als Kryokonservat eintreffenden Stämmen (0,8 ml Bakteriensuspension mit 0,2 ml Glycerol) wurden 0,2 ml in 9 ml vorgewärmte MRS- bzw. RCM-Bouillon (BI) pipettiert, resuspendiert und anaerob bei $37 \pm 0,5$ °C für 24 ± 1 h bebrütet. Bei verhaltendem Wachstum verlängerte sich die Bebrütungsdauer um 24 ± 1 h, bei gutem Wachstum wurden 0,2 ml in eine neue, vorgewärmte Bouillon (BII) überimpft und für weitere 24 ± 1 h bebrütet. Bei gut sichtbarem Wachstum erfolgte ein fraktionierter Ösenausstrich MRS- bzw. RCM-Agarplatte (PI) und erneute anaerobe Bebrütung bei $37 \pm 0,5$ °C für 48 ± 2 h. Je eine Kolonie wurde in MRS- bzw. RCM-Bouillon (BIII) überimpft, vorgetext und für weitere 24 ± 1 h bei $37 \pm 0,5$ °C anaerob bebrütet, ehe ein erneuter fraktionierter Ösenausstrich angefertigt und die Agarplatte (PII) für 48 ± 2 h bebrütet wurde. Einige Kolonien dieser Agarplatte (PII) dienen zur Beimpfung der MikrobakTM-Kryo-Röhrchen (Abb.: 29).

Produktisolate

Produktreinkulturen

Von Produkten, in denen nur eine Bakterienspezies enthalten war, wurde eine Verdünnungsreihe angelegt und Agarplatten (PI) beimpft. Nach anaerobe Bebrütung bei $37 \pm 0,5$ °C für 48 ± 2 h wurde eine einzelne Kolonie der Reinkultur und vorgewärmte Bouillon (BI) überbracht und für 24 ± 1 h bebrütet. Eine weitere Platte wurde mit einem fraktionierten Ausstrich beimpft und für 48 ± 2 h bebrütet (PII), ehe einzelne Kolonien zur Beimpfung des MicrobakTM-Systems dienen.

Produktmischkulturen

Anschließend an die Isolation der einzelnen Spezies aus einem Produkt nach den in (Isolierung/Kultivierung der Keime) und (siehe RK) beschriebenen Verfahren wurden die nun als Reinkultur vorliegenden Stämme für die Sicherung in der Stammsammlung mehreren

Agar-Bouillon-Passagen unterzogen. Nach dem Anlegen einer Verdünnungsreihe wurden 0,1 ml Probenvolumen auf eine Agarplatte (PI) ausgebracht und mit einem sterilen Einmalspatel verteilt. Nach 48 ± 2 h-stündiger Bebrütung erfolgte eine Inokulierung der Bouillon (BI) mit einer Kolonie und weitere Bebrütung für 24 ± 1 h. Nun erfolgte ein weiterer fraktionierter Ausstrich (PII), teilweise auf selektiven Nährböden (MRS-V, MUP), dem sich eine Bebrütung für $48-72 \pm 2$ h, je nach Wachstumsintensität, anschloss. Nach weiterem Wachstum einzelner Kolonien für 24 ± 1 h in Bouillon (BII) erfolgte ein letzter fraktionierter Ausstrich (PIII), von dem nach $48-72 \pm 2$ h Bebrütung einige Kolonien in das Microbank™-System überführt wurden. Bebrütet wurde stets anaerob bei $37 \pm 0,5$ °C.

Isolierung, Kultivierung und Sicherung der Stämme aus den unterschiedlichen Medien sind schematisch in Abbildung 29 dargestellt.

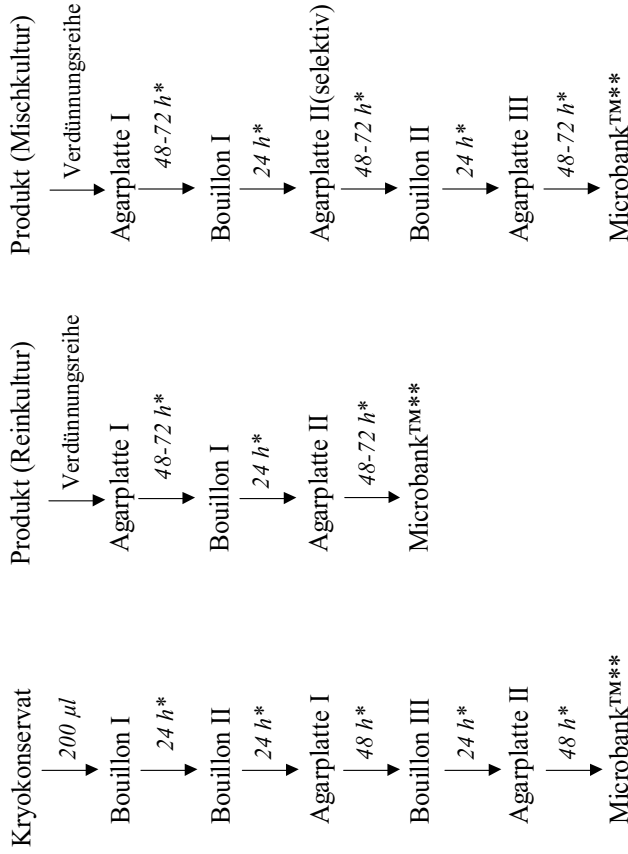
Stammhaltung

Zur Stammhaltung kam das Microbank™-System der Firma PRO-LAB-Diagnostics, Kanada, zum Einsatz.

Das sterile System bestand aus mit Kryopuffer gefüllten 2 ml Kryo-Röhrchen, in denen 25 Trägerperlen enthalten waren. Nach Entfernen des Schraubverschlusses unter sterilen Bedingungen wurden so viele KbE eines Stammes steril mit einer Öse in das Röhrchen verbracht, bis das Inokulum nach Aufschütteln einen McFarland Standard von 3-4 erreichte. Nach mehrmaligem kräftigen Schütteln und Abpipettieren der flüssigen Phase ermöglichte die poröse Oberfläche der Perlen die Bindung der Mikroorganismen. Die Kryo-Röhrchen wurden bei $-80 \pm 0,5$ °C gelagert.

Kultivierung aus Stammsammlung

Die Wiederanzucht der Bakterien erfolgte durch steriles Überführen einer Trägerperle des Microbank™-System (PRO-LAB-Diagnostics, Kanada) in vorgewärmte MRS- bzw. RCM-Bouillon und anaerobe Bebrütung für 24 ± 1 h bei $37 \pm 0,5$ °C. Während der Entnahme wurden die Kryo-Röhrchen auf zerkleinertem Eis bzw. Kühlakkus in einer Styroporbox gelagert.



* = anaerob, 37 ± 0,5 ° C

** = - 80 ± 1 ° C

Abbildung 29: Isolierung, Kultivierung und Sicherung der Bakterienstämme

9.6 Tabellenanhang

Tabelle 26: Lagerungsversuch Reinkulturen pur, mit 0,3 % und 3,5 % fetthaltiger Milch, Keimzahl in [lg Kbe/ml] von Tag 1

Versuchstag 1						
Stamm-Nr.:	OSV I	OSV II	OSV III	FACS I	FACS II	FACS III
pur						
S-1	9,08	8,23	8,89	9,31	8,73	9,11
S-7	7,64	5,48	5,02	7,44	6,42	9,15
S-9	9,15	8,40	9,32	8,23	8,51	9,01
S-12	8,18	7,26	8,27	8,34	7,69	8,63
S-14	8,94	8,77	8,63	9,00	9,07	8,84
S-16	8,48	8,29	8,66	8,69	8,55	8,86
0,3% fetthaltige Milch						
S-1	8,96	8,40	9,00	9,47	8,76	9,10
S-7	7,58	5,48	4,70	7,95	6,37	9,16
S-9	9,18	8,40	9,30	8,94	8,83	8,97
S-12	8,15	7,26	8,24	8,34	7,71	8,55
S-14	8,97	8,67	8,58	9,09	9,15	8,93
S-16	8,60	8,22	8,47	8,69	8,55	8,82
3,5% fetthaltige Milch						
S-1	9,00	8,45	8,94	9,23	8,76	9,13
S-7	7,45	5,70	5,08	8,31	6,74	9,35
S-9	9,11	8,45	9,23	8,84	8,51	8,57
S-12	8,04	7,28	8,27	8,39	7,75	8,50
S-14	8,89	8,68	8,75	9,04	9,14	9,01
S-16	8,61	8,26	8,38	8,71	8,62	8,85

Tabelle 27: Lagerungsversuch Reinkulturen pur, mit 0,3 % und 3,5 % fetthaltiger Milch, Keimzahl in [lg KBE/ml] von Tag 21

Versuchstag 21						
Stamm-Nr.:	OSV I	OSV II	OSV III	FACS I	FACS II	FACS III
pur						
S-1	9,03	8,48	8,85	9,20	8,58	9,15
S-7	4,00	6,43	2,00	6,99	5,79	8,58
S-9	5,30	4,00	4,00	7,93	7,52	7,90
S-12	5,95	6,02	7,85	7,96	7,70	8,27
S-14	7,00	5,97	4,94	8,35	8,38	8,30
S-16	8,49	8,76	8,59	8,96	9,00	8,93
0,3% fetthaltige Milch						
S-1	9,20	8,80	8,90	9,16	8,74	9,12
S-7	7,11	7,79	7,94	7,77	6,54	9,12
S-9	6,95	6,80	6,12	9,12	8,38	8,37
S-12	7,82	7,00	7,81	8,51	7,77	8,63
S-14	8,51	7,92	8,26	7,44	9,05	8,93
S-16	8,80	8,97	9,10	9,30	9,27	9,34
3,5% fetthaltige Milch						
S-1	9,26	8,83	8,97	9,32	8,77	9,15
S-7	7,32	7,85	8,04	7,83	6,51	9,24
S-9	7,00	6,56	5,92	8,93	8,61	8,61
S-12	7,90	7,00	8,05	8,42	7,88	8,67
S-14	8,53	7,93	8,32	9,14	9,21	9,12
S-16	8,97	8,68	9,16	9,36	9,37	9,54

Tabelle 28: Lagerungsversuch Reinkulturen pur, mit 0,3 % und 3,5 % fetthaltiger Milch, Keimzahl in [lg KbE/ml] von Tag 42

Versuchstag 42						
Stamm-Nr.:	OSV I	OSV II	OSV III	FACS I	FACS II	FACS III
pur						
S-1	8,98	8,26	8,88	9,50	8,59	8,80
S-7	1,70	4,37	1,70	6,58	5,56	6,95
S-9	1,70	1,70	1,70	7,87	7,43	8,58
S-12	7,18	3,28	6,00	7,51	6,66	8,06
S-14	6,02	2,48	1,70	7,30	5,73	7,32
S-16	8,67	8,73	8,85	9,22	8,97	8,54
0,3% fetthaltige Milch						
S-1	9,08	8,46	8,85	9,09	8,71	8,88
S-7	1,70	5,24	4,48	7,69	6,19	7,84
S-9	1,70	5,54	4,35	7,75	8,48	8,00
S-12	8,62	6,79	7,21	8,29	7,59	8,65
S-14	8,40	7,23	8,29	7,39	8,46	8,88
S-16	9,08	8,99	9,22	9,54	8,98	8,99
3,5% fetthaltige Milch						
S-1	9,12	8,64	8,95	9,28	8,75	8,89
S-7	1,70	5,46	5,09	7,65	6,31	8,08
S-9	1,70	5,65	4,35	8,10	8,65	8,46
S-12	8,78	7,00	8,33	8,43	7,74	8,67
S-14	8,67	8,53	8,20	9,18	9,18	8,88
S-16	9,28	9,20	9,22	9,67	9,35	9,39

Tabelle 29: Verdünnungsreihen zur Festlegung der Nachweisgrenze, Keimzahlen in [lg KbE/ml]

Stamm-Nr., Produkt-Nr.	Verdünnungsstufe						
	1	2	3	4	5	6	7
S-1 OSV	8,74	7,74	6,77	5,60	4,74	3,72	2,61
S-1 FACS	9,01	8,07	6,99	6,40	6,18	6,10	5,71
S-9 OSV	8,30	7,10	6,11	5,11	4,12	3,12	2,26
S-9 FACS	8,76	7,66	6,46	5,71	5,75	5,77	5,77
S-14 OSV	8,75	7,54	6,63	5,77	4,71	3,73	2,71
S-14 FACS	8,96	7,93	6,98	5,94	5,23	4,66	4,18
S-16 OSV	8,43	7,49	6,39	5,48	4,43	3,53	2,79
S-16 FACS	8,78	7,85	6,94	6,07	5,77	5,76	5,90
S-26 OSV	8,83	7,86	6,93	5,89	4,86	3,88	2,72
S-26 FACS	9,24	8,21	7,21	6,18	5,73	5,26	5,13
Nr.8 OSV	7,18	6,13	5,29	4,23	3,24	2,04	0,95
Nr. 8 FACS	8,40	7,31	6,44	5,47	4,69	4,50	4,51

Tabelle 30: Lagerungsversuch pharmazeutische Produkte, OSV-Werte als Keimzahl in [lg KbE/ml], FACS-Werte als tote Bakterien in [%]

Produkt-Nr.	Untersuchungszeitpunkt				
	1	2	3	4	5
11 OSV	8,80	8,28	8,18	7,71	7,76
11 FACS	91	90	87	57	54
12 OSV	10,49	10,61	9,88	9,00	8,72
12 FACS	41	36	31	20	19

9.7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dotplot von <i>L. reuteri</i> im Laufe der Lagerung	71
Abbildung 2: Produkt 8 mit Monokultur von <i>L. casei</i>	74
Abbildung 3: Produkt (4) mit Mischkultur	74
Abbildung 4: Dotplot des flüssigen Präparates mit Bakterienwolke (li.) und Vitalfarbstoffen (re.)	76
Abbildung 5: Vitalität [%] und Keimzahl [lg KbE/ml] von <i>E. coli</i> im FACS bzw. OSV	77
Abbildung 6: Dotplot des pulverförmigen Präparates mit Bakterienwolke	78
Abbildung 7: Vitalität [%] und Keimzahl [lg KbE/ml] von <i>E. coli</i> im FACS bzw. OSV	78
Abbildung 8: Im Dotplot lassen sich drei Wolken erkennen (a), sowie die Vitalität der Bakterien (b)	79
Abbildung 9: Dotplot von <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. casei</i> (grün) und Beads (rot)	80
Abbildung 10: Dotplot von <i>B. lactis</i> mit 6743 Bakterien (große Wolke) und 12281 Beads (kleine Wolke)	81
Abbildung 11: Quantifizierung [lg KbE/ml] von <i>B. lactis</i> im Oberflächenspatelverfahren und im Durchflusszytometer im Verlauf einer dekadischen Verdünnungsreihe	82
Abbildung 12: Quantifizierung [lg KbE/ml] von <i>B. breve</i> im Oberflächenspatelverfahren und im Durchflusszytometer im Verlauf einer dekadischen Verdünnungsreihe	83
Abbildung 13: Quantifizierung [lg KbE/ml] von <i>L. johnsonii</i> im Oberflächenspatelverfahren und im Durchflusszytometer im Verlauf einer dekadischen Verdünnungsreihe	84
Abbildung 14: Quantifizierung [lg KbE/ml] von <i>L. casei</i> im Oberflächenspatelverfahren und im Durchflusszytometer im Verlauf einer dekadischen Verdünnungsreihe	85
Abbildung 15: Quantifizierung [lg KbE/ml] von <i>L. casei</i> Shirota im Oberflächenspatelverfahren und im Durchflusszytometer im Verlauf einer dekadischen Verdünnungsreihe	86
Abbildung 16: Quantifizierung [lg KbE/ml] von Produkt 8 im Oberflächenspatelverfahren und im Durchflusszytometer im Verlauf einer dekadischen Verdünnungsreihe	87
Abbildung 17: Dotplot von <i>L. acidophilus</i> (S-12) an Tag 1 mit jeweils gleicher Bakterienkonzentration ohne Milchzusatz, mit 0,3 %- und 3,5 %-fetthaltiger Milch	89
Abbildung 18: Dotplot von <i>B. lactis</i> (S-1) an Tag 1 mit jeweils gleicher Bakterienkonzentration ohne Milchzusatz, mit 0,3 %- und 3,5 %-fetthaltiger Milch	90
Abbildung 19: Dotplot von <i>B. lactis</i> ohne Milchzusatz an Tag 1, Tag 21 und Tag 42 der Lagerung	91
Abbildung 20: Keimzahlen [lg KbE/ml] des Stammes <i>B. lactis</i> ermittelt durch das Oberflächenspatelverfahren und Durchflusszytometrie im Verlauf der Lagerung mit 0,3 %- und 3,5 % fetthaltiger H-Milch sowie ohne Milchzusatz	92
Abbildung 21: Keimzahlen [lg KbE/ml] des Stammes <i>B. longum</i> ermittelt durch das Oberflächenspatelverfahren und Durchflusszytometrie im Verlauf der Lagerung mit 0,3 %- und 3,5 % fetthaltiger H-Milch sowie ohne Milchzusatz	93
Abbildung 22: Keimzahlen [lg KbE/ml] des Stammes <i>B. breve</i> ermittelt durch das Oberflächenspatelverfahren und Durchflusszytometrie im Verlauf der Lagerung mit 0,3 %- und 3,5 % fetthaltiger H-Milch sowie ohne Milchzusatz	94

Abbildung 23: Keimzahlen [lg KbE/ml] des Stammes <i>L. casei</i> ermittelt durch das Oberflächenspatelverfahren und Durchflusszytometrie im Verlauf der Lagerung mit 0,3 % - und 3,5 % fetthaltiger H-Milch sowie ohne Milchzusatz.....	95
Abbildung 24: Keimzahlen [lg KbE/ml] des Stammes <i>L. acidophilus</i> ermittelt durch das Oberflächenspatelverfahren und Durchflusszytometrie im Verlauf der Lagerung mit 0,3 % - und 3,5 % fetthaltiger H-Milch sowie ohne Milchzusatz.....	96
Abbildung 25: <i>L. acidophilus</i> an Tag 1, Tag 21 und Tag 42 der Lagerung.....	97
Abbildung 26: Keimzahlen [lg KbE/ml] des Stammes <i>L. johnsonii</i> ermittelt durch das Oberflächenspatelverfahren und Durchflusszytometrie im Verlauf der Lagerung mit 0,3 % - und 3,5 % fetthaltiger H-Milch sowie ohne Milchzusatz.....	98
Abbildung 27: Dotplot von Produkt 10 vor (links) und nach (rechts) der Bearbeitung.....	100
Abbildung 28: Dotplot von Produkt 10 während der Bearbeitung	100

9.8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Merkmale der Milchsäurebakterien (KLEIN 1998).....	5
Tabelle 2: <i>L. acidophilus</i> -Gruppe; Erstbeschreibung, weitere Einordnungen und Typstämme	7
Tabelle 3: <i>L. casei</i> -Gruppe, Erstbeschreibung, weitere Einordnungen und Typstämme.....	8
Tabelle 4: <i>L. reuteri</i> -Gruppe, Erstbeschreibung, weitere Einordnungen und Typstämme	9
Tabelle 5: <i>Bifidobacterium</i> spp., Erstbeschreibung, weitere Einordnungen und Typstämme .	11
Tabelle 6: <i>Lactococcus</i> spp., Erstbeschreibung, weitere Einordnungen und Typstämme	14
Tabelle 7: Antimikrobielle Eigenschaften von Milchsäurebakterien (ROBINSON et al. 2000)	18
Tabelle 8: Immunmodulatorische Effekte von Probiotika (nach DE VRESE u. SCHREZENMEIR 2000).....	20
Tabelle 9: Postulierte antimutagene/antikanzerogene Wirkmechanismen (GERLACH 2007)23	
Tabelle 10: Wichtige wirtschaftlich genutzte Genera und Stämme der Milchsäurebakterien und ihre Anwendungsgebiete (modifiziert nach KLEIN 1998)	24
Tabelle 11: Auswahlkriterien für den Einsatz probiotischer Stämme in Lebensmitteln (nach ANONYM 1999a, KULLEN u. KLAENHAMMER 2000, GOLDBERG 2002)	28
Tabelle 12: Probiotika in der Tierernährung (Stand Februar 2008).....	35
Tabelle 13: Differentialmedien zur Detektion und Enumeration von potentiell probiotischen <i>Lactobacillus</i> - und <i>Bifidobacterium</i> -Spezies	39
Tabelle 14: Einsatzmöglichkeiten der Durchflusszytometrie in der Zellbiologie (LINDL 2002)	44
Tabelle 15: Eingesetzte Bakterienstämme	52
Tabelle 16: Milchlischerzeugnisse und deklarierte Bakterien	53
Tabelle 17: Probiotische Produkte ohne Milchzusatz und deklarierte Bakterien	54
Tabelle 18: Nährböden und Bouillon zur Bakterienanzucht.....	55
Tabelle 19: Detaillierte Zusammensetzung der einzelnen Probenansätze	58
Tabelle 20: Phänotypisches Erscheinungsbild der eingesetzten Bakterien auf den verschiedenen Nährmedien	63
Tabelle 21: Befüllung der einzelnen FACS-Probenröhrchen	68

Tabelle 22: Keimzahl der Bifidobakterien und Laktobazillen und der Anteil der toten Bakterien (T [%]) an Tag 1, 21 und 42 der Lagerung.....	73
Tabelle 23: Keimzahl der Bifidobakterien und Laktobazillen aus den Produkten an Tag 1, 21 (MHD). 42 der Lagerung	75
Tabelle 24: Keimzahl [lg KbE/ml] der Bifidobakterien- und Laktobazillen-Reinkulturen aus FACS und OSV	88
Tabelle 25: Keimzahlen und Differenzen ($ \Delta KZ = \lg \text{KbE/ml}$) von FACS und OSV	101
Tabelle 26: Lagerungsversuch Reinkulturen pur, mit 0,3 % und 3,5 % fetthaltiger Milch, Keimzahl in [lg KbE/ml] von Tag 1.....	146
Tabelle 27: Lagerungsversuch Reinkulturen pur, mit 0,3 % und 3,5 % fetthaltiger Milch, Keimzahl in [lg KbE/ml] von Tag 21.....	147
Tabelle 28: Lagerungsversuch Reinkulturen pur, mit 0,3 % und 3,5 % fetthaltiger Milch, Keimzahl in [lg KbE/ml] von Tag 42.....	148
Tabelle 29: Verdünnungsreihen zur Festlegung der Nachweisgrenze, Keimzahlen in.....	149
Tabelle 30: Lagerungsversuch pharmazeutische Produkte, OSV-Werte als Keimzahl in	149

9.9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	<u>Ab</u> bildung
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
Aqua tridest.	<u>A</u> qua <u>t</u> ridestillata
<i>B.</i>	<u>B</u> ifidobacterium
°C	Grad <u>C</u> elsius
comb. nov.	<u>C</u> ombinatio <u>n</u> ova
DSM	<u>D</u> eutsche <u>S</u> ammlung von <u>M</u> ikroorganismen und <u>Z</u> ellkulturen
<i>E.</i>	<u>E</u> scherichia
etc.	<u>e</u> t <u>c</u> etera
FACS	<u>F</u> luorescence <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orting
FACSCalibur®	Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson
FL 1-4	Detektoren des Durchflusszytometers
FSC	<u>F</u> orward <u>S</u> catter (Vorwärtsstreulicht)
h	<u>h</u> our (Stunde)
KbE	<u>K</u> oloniebildende <u>E</u> inheiten
KZ	<u>K</u> eimzahl
<i>L.</i>	<u>L</u> actobacillus
l	<u>L</u> iter
lg	<u>L</u> ogarithmus zur Basis 10
LMG	<u>L</u> aboratorium voor <u>M</u> icrobiologie, <u>G</u> ent, <u>B</u> elgien
MHD	<u>M</u> indest- <u>H</u> altbarkeits- <u>D</u> atum
ml	<u>M</u> illiliter
min.	<u>M</u> inuten
MRS	de <u>M</u> an- <u>R</u> ogosa- <u>S</u> harpe-Nährmedium
MUP	<u>M</u> upirocinhaltiger <u>A</u> gar
n	Stichprobengröße
NCDO	<u>N</u> ational <u>C</u> ollection of <u>D</u> airy <u>O</u> rganisms
NCIMB	<u>N</u> ational <u>C</u> ollection of <u>I</u> ndustrial and <u>M</u> arine <u>B</u> acteria
Nr.	<u>N</u> ummer
OSV	<u>O</u> berflächenspatelverfahren
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PC-Agar	<u>P</u> late- <u>C</u> ount- <u>A</u> gar
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PJ	<u>P</u> ropidiumjodid
<i>S.</i>	<u>S</u> treptococcus
sp.	<u>S</u> pezies
subsp.	<u>S</u> ubspezies
SSC	<u>S</u> ide <u>S</u> catter (Seitwärtsstreulicht)
SYTO®-9	grünfluoreszierender DNA/RNA Farbstoff
^T (hochgestellt)	<u>T</u> ypstamm
Tab.	<u>T</u> abelle
TO-PRO®-3	rotfluoreszierender DNA-Farbstoff
V	<u>V</u> ancomycin
X-Glu	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D- <u>g</u> lucoside-enthaltender <u>A</u> gar

10 SCHRIFTTUMSVERZEICHNIS

Birte Ahlfeld:

Durchflusszytometrische Bestimmungen von probiotischen Starterkulturen unter besonderer Berücksichtigung von Laktobazillen und Bifidobakterien

ABO-ELNAGA, I. G. u. O. KANDLER (1965):

Zur Taxonomie der Gattung *Lactobacillus* Beijerinck. I. Das Subgenus *Streptobacterium* Orla-Jensen

Zbl. Bakt. Abt. Orig. II 119, 1-36

ADAMS, M. R., u. P. MARTEAU (1995):

On the safety of lactic acid bacteria from food

Int. J. Food Microbiol. 27, 263-264

ADHIKARI, K., A. MUSTAPHA, I. U. GRÜN u. L. FERNANDO (2000):

Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yoghurt during refrigerated storage

J. Dairy Sci. 83, 1946-1951

ÁLVAREZ-BARRIENTOS, A., J. ARROYO, R. CANTÓN, C. NOMBELA u. M. SÁNCHEZ-PÉREZ (2000):

Applications of flow cytometry to clinical microbiology

Clin. Microbiol. Rev., 13, Nr. 2, 167-195

AMANN, R. L., B. J. BINDER, R. J. OLSON, S. W. CHRISHOLM, R. DEVEREUX u. D. A. STAHL (1990):

Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations

Appl. Environ. Microbiol. 56, Nr. 6, 1919-1925

ANONYM (1988):

Yoghurt: enumeration of characteristic microorganisms colony count technique at 37 °C

International IDF Standard 117A:1988

ANONYM (1997a):

Dairy starter cultures of lactic acid bacteria

International IDF Standard 149A:1997

ANONYM (1997b):

Yoghurt: enumeration of characteristic microorganisms colony count technique at 37 °C

International IDF Standard 117B:1997

ANONYM (1999a):

Arbeitsgruppe "Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln" am Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin BgVV, (jetzt: BfR) (1999):
Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln
Ern. Umschau 47, 191-195

ANONYM (1999b):

Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen (Biostoffverordnung)
Vom 27. Januar 1999
Zuletzt geändert durch Art. 8 V v .23.12.2004 I 3758; Änderungen durch Art. 438 V v. 31.10.2006 I 2407 (Nr. 50) noch nicht berücksichtigt
BGBl. T. I. 1999, 50

ANONYM (1999c):

Guideline for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products
Bull. Int. Dairy Fed. 340, 19-23

ANONYM (2000):

Richtlinie 2000/54/EG des Europäischen Parlaments und des Rates über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit
Vom 15. Dezember 2000
ABI. Der EG L 262/21

ANONYM (2001):

Bacterial disinfectant efficacy using flow cytometry
Microbial cytometry, Becton Dickinson Biosciences, Application note,
www.bdbiosciences.com

ANONYM (2002a):

Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (2002):
Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working group report.
[ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf](http://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf).

ANONYM (2002b):

Bacterial detection and live/dead discrimination by flow cytometry
Microbial cytometry, Becton Dickinson Biosciences, Application note,
www.bdbiosciences.com

ANONYM (2003a):

Opinion on the use of certain micro-organisms as additives in feedstuffs

http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out93_en.pdf

Europäische Union, von 25.April 2003

Europa -Food Safety -Scientific Committee on Animal Nutrition

http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/index_en.html

ANONYM (2003b):

Community Register of Feed Additives, pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003

Stand: 25. Februar 2008

http://ec.europa.eu/comm/food/food/animalnutrition/feedadditives/index_en.htm

ANONYM (2006a):

Minutes: International committee of prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related organisms

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 2501-2503

ANONYM (2006b):

Einstufung von Bakterien (Bacteria) und Archaeobakterien (Archaea) in Risikogruppen-

Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe, TRBA 466, Ausgabe: Dezember 2005

BArbBl. 7-2006, 33-193

ANONYM (2007a):

Introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA

Opinion of the scientific committee (Question No. EFSA-Q-2005-293)

EFSA J. 587, 1-16

ANONYM (2007b):

Niedersächsische Milchwirtschaft 2007

Voraussichtliche Jahresleistung aus den Ergebnissen bis August 2007, hochgerechnet bis zum Jahresende von der Landesvereinigung der Milchwirtschaft Niedersachsen e.V.

http://www.milchwirtschaft.de/Download/vorlaeufiger_jb.pdf

ARIHARA, K. (2004):

Functional foods

In: JENSEN, W. K., C. DEVINE u. M. DIKEMAN (Hrsg.): Encyclopedia of meat sciences Elsevier Ltd., Oxford, 1. Auflage, 492-499

- ARUNACHALAM, K., H. S. GILL u. R. K. CHANDRA (2000):
 Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HNO19)
 Eur. J. Clin. Nutr. 54, 263-267
- ASO, Y., H. AKAZA, T. KOTAKE, T. TSUKAMOTO, K. IMAI u. S. NAITO (1995):
 Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial
 European Urology 27, 104-109
- AUDISIO, C., G. OLIVER u. M. C. APELLA (1999):
 Antagonistic effect of *Enterococcus faecium* J96 against human and poultry pathogenic *Salmonella* spp.
 J. Food Prot. 62, 1333-1337
- AUTY, M. A. E., G. E. GARDINER, S. J. MCBREARTY, E. O. O'SULLIVAN, D. M. MULVIHILL, J. K. COLLINS, G. F. FITZGERALD, C. STANTON u. R. P. ROSS (2001):
 Direct in situ assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy
 Appl. Environ. Microbiol. 67, No. 1, 420-425
- BARBER, F. W. u. W. C. FRAZIER (1945):
 Dissociants of Lactobacilli
 J. Bacteriol. 50, Nr. 6, 637-649
- BEERENS, H. (1990):
 An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp.
 Lett. Appl. Bacteriol. 16, 450-456
- BEERENS, H. (1991):
 Detection of Bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent
 Appl. Environ. Microbiol. 57, Nr. 8, 2418-2419
- BEIJERINCK, M. W. (1901):
 Sur le lactiques de l'industrie
 Arch. Néerl. Sci. Exactes Nat. Série II 7, 212-243, zit. nach DELLAGIO (2004)
- BEN AMOR, K., P. BREEUWER, P. VERBAARSCHOT, F. M. ROMBOUTS, A. D. L. AKKERMANS, W. M. DE VOS u. T. ABEE (2002):
 Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured and dead *bifidobacterium* cells during bile salt stress
 Appl. Environ. Microbiol. 68, Nr. 11, 5209-5216

- BERNANDER, R., T. STOKKE u. E. BOYE (1998):
Flow cytometry of bacterial cells: comparison between different flow cytometers and different DNA stains
Cytometry 31, 29-36
- BERNET, M.F., D. BRASSART, J. R. NEESER u. A. L. SERVIN (1994):
Lactobacillus acidophilus LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria
Gut 35, 483-489
- BERNET-CAMARD, M.-F., V. LIÉVIN, D. BRASSART, J.-R. NEESER, A. L. SERVIN u. S. HUDAULT (1997):
The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo
Appl. Environ. Microbiol. 63, Nr. 7, 2747-2753
- BESSELINK, M. G. H., H. C. VAN SANTVOORT, E. BUSKENS, M. A. BOERMEESTER, H. VAN GOOR, H. M. TIMMERMAN, V.B. NIEUWENHUIJS, T. L. BOLLEN, B. VAN RAMSHORST, B. J. WITTEMAN, C. ROSMAN, R. J. PLOEG, M. A. BRINK, A. F. SCHAAPHERDER, C. H. DEJONG, P. J. WAHAB, C. J. VAN LAARHOVEN, E. VAN DER HARST, C. H. VAN EIJCK, M. A. CUESTA, L. M. AKKERMANS, H. G. GOOSZEN (2008):
Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial
Lancet 371, 651-659
- BIAVATI, B. u. P. MATTARELLI (1991):
Bifidobacterium ruminantium sp. nov. and *Bifidobacterium merycium* sp. nov. from the rumen of cattle
Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 163-168
- BIAVATI, B., P. MATTARELLI u. F. CROCIANI (1991):
Bifidobacterium saeculare: a new species isolated from faeces of rabbit
Syst. Appl. Microbiol. 14, 389-392
- BIAVATI, B., V. SCARDOVI u. W. E. C. MOORE (1982):
Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species
Int. J. Syst. Bacteriol. 32, 358-373
- BIAVATI, B., T. SOZZI, P. MATTARELLI u. L. D. TROVATELLI (1992):
Survival of bifidobacteria from human habitat in acidified milk
Microbiologica 15, 197-200

- BIEGALA, I. C., F. NOT, D. VAULOT u. N. SIMON (2003):
Quantitative assessment of picoeukaryotes in the natural environment by using taxon-specific oligonucleotide probes in association with tyramide signal amplification-fluorescence in situ hybridization and flow cytometry
Appl. Environ. Microbiol. 69, Nr. 9, 5519-5529
- BLUM, G., R. MARRE u. J. HACKER (1995):
Properties of *Escherichia coli* strains of serotype O6
Infection 23, Nr. 4, 234-236
- BONAPARTE, C. (1997):
Selective isolation and taxonomic position of bifidobacteria isolated from commercial fermented dairy products in central Europe
Berlin, Techn. Univ., Diss, FB 15 Nr.106
- BONAPARTE, C., G. KLEIN, B. HACK, K. ZIMMERMANN u. W. KNEIFEL (2001):
Nachweis und Zählung probiotischer Bakterien in Milchprodukten durch Selektiv- und Elektivmedien in einer Laborvergleichsuntersuchung
Arch. Lebensmittelhyg. 52, 91-93
- BONAPARTE, C., G. KLEIN, G. HILDEBRANDT, B. HACK, K. ZIMMERMANN u. W. KNEIFEL (2000):
Quantitativer Nachweis von probiotischen Bakterien in Milchprodukten: ein Laborvergleichstest
In: Proc. 41. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen 25.-28.09.2000, 302-307
- BORRIELLO, S. P., W. P. HAMMES, W. HOLZAPFEL, P. MARTINEAU, J. SCHREZENMEIR, M. VAARA u. V. VALTONEN (2003):
Safety of probiotics that contain Lactobacilli or Bifidobacteria
Clin. Inf. Diseases 36, 775-780
- BOYLE, R. J., R. M. ROBINS-BROWNE, M. L. TANG (2006):
Probiotic use in clinical practice: what are the risks?
Am. J. Clin. Nutr. 83, 1256-1264
- BRACQUART, P. (1981):
An agar medium for the differential of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in yoghurt
J. Appl. Bacteriol. 51, Nr. 2, 303-305
- BREVES, G. (2004):
Probiotische Mikroorganismen und ihre zellulären Wirkungsmechanismen
Mikrobiologie und Tierernährung: 20. Hülsenberger Gespräche, Lübeck, Schriftreihe der Wilhelm Schaumann Stiftung, 40-49

- BRUCE, A. W., G. REID, J. A. MCGROATY, M. TAYLOR u. C. PRESTON (1992):
Preliminary study on the prevention of recurrent urinary tract infection in adult women using intravaginal lactobacilli
Int. Urogynecol. J. 3, 22-25
- BRYGOO, E. R. u. N. ALDAME (1953):
Etude d'une espèce nouvelle anaérobie stricte du genre Eubacterium : *E. crispatum* n. sp.
Ann. Inst. Pasteur Paris 84, 640-641
- BUNTHOF, C. J. u. T. ABEE (2002):
Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters
Appl. Environ. Microbiol. 68 Nr.6, 2934-2942
- BUNTHOF, C. J., K. BLOEMEN, P. BREEUWER, F. M. ROMBOUITS u. T. ABEE (2001a):
Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria
Appl. Environ. Microbiol. 67, Nr. 5, 2326-2335
- BUNTHOF, C. J., S. VAN DEN BRAAK, P. BREEUWER, F. M. ROMBOUITS u. T. ABEE (1999):
Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*
Appl. Environ. Microbiol. 65, Nr. 8, 3681-3689
- BUNTHOF, C. J., S. VAN SCHALKWIJK, W. MEIJER, T. ABEE u. J. HUGENHOLTZ (2001b):
Fluorescent method for monitoring cheese starter permeabilization and lysis
Appl. Environ. Microbiol. 67, Nr. 9, 4264-4271
- CASALTA, E. u. M.-C. MONTEL (2007):
The *Lactococcus* genus
Int. J. Food Microbiol. doi:10.1016/j.jfoodmicro.2007.08.013
- CATO, E. P., W. E. C. MOORE u. L. J. JOHNSON (1983):
Synonymy of strains of "*L. acidophilus*" group A2 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus crispatus* (Brygoo u. Aldame 1953) Moore and Holdemann 1970)
Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 426-428
- CHAPON, J.-L. U. K. KISS (1991):
Numération des bifidobactéries dans les laits fermentés: proposition pour une méthode microbiologique
Trav. Chim. Aliment. Hyg. 82, 264-277
- CHARTERIS; W. P., P. M. KELLY, L. MORELLI u. J. K. COLLINS (1997):
Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations
Int. J. Food Microbiol. 35, 1-27

- CHEN, J. C., W. CAI u. Y. FENG (2007):
Development of intestinal bifidobacteria and lactobacilli in breast-fed neonates
Clin. Nutr. 26, 559-566
- CHENG, C. C. U. T. NAGASAWA (1983):
Associative relationships between bifidobacteria and lactobacilli in milk
Jpn. J. Zootechnol. Sci. 54, Nr. 11, 740-747
- CHIN, J., B. TURNER, I. BARCHIA u. A. MULLBACHER (2000):
Immune response to orally consumed antigens and probiotic bacteria
Immunol. Cell Biol. 78, 55-66
- CHUNG, J.D., S. CONNER u. G. STEPHANOPOULUS (1995):
Flow cytometric study of differentiating cultures of *Bacillus subtilis*
Cytometry 20, 324-333
- COKER, C. J. U. F. G. MATLEY (1982):
Selective enumeration of thermophilic lactobacilli in association with *Streptococcus thermophilus*
NZ J. Dairy Sci. Technol. 17, 269-272
- COLLINS, M. D. u. G. R. GIBSON (1999):
Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut
Am. J. Clin. Nutr. 69, 1052-1057
- COLLINS, M. D., B. A. PHILLIPS u. P. ZANONI (1989):
Desoxyribonucleic acid studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov.
Int. J. Syst. Bacteriol. 39, 105-108
- COMMANE, D., R. HUGHES, C. SHORTT u. I. ROWLAND (2005):
The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics
Mutat Res. 591, 276-289
- CORETTI, K. (1977):
Starterkulturen in der Fleischwirtschaft
Fleischwirtsch. 3, 386-394
- CROCIANI F., B. BIAVATI, A. ALESSANDRINI, C. CHIARINI u. V. SCARDOVI (1996):
Bifidobacterium inopinatum sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov. , two new species isolated from human dental caries
Int. J. Syst. Bacteriol. 46, (2), 564-571

- CROSS, M. u. V. DÖBEL (2007):
Durchflußzytometrische Zellsortierung
In: SACK, U., A. TARNOK u. G. ROTHE (Hrsg.) (2007): Zelluläre Diagnostik
Karger Verlag, Basel u. Freiburg, 27-70
- DAVE, R. I., u. N. P. SHAH (1996):
Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*,
Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *bifidobacteria*
J. Dairy Sci. 79, 1529-1536
- DAVE, R. I. u. N. P. SHAH (1997):
Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made with
commercial starter cultures
Int. Dairy J. 7, 537-545
- DAVE, R. I., u. N. P. SHAH (1998):
Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yoghurt
J. Dairy Sci. 81, 2804-2816
- DAVEY, H. M., A. JONES, A. D. SHAW u. D. B. KELL (1999):
Variable selection and multivariate methods for the identification of microorganisms by
flow cytometry
Cytometry, 35, 162-168
- DAVEY H. M., u. D. B. KELL (1996):
Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of
single-cell-analyses
Microbiol. Rev., 60, Nr. 4, 641-696
- DAVEY, H. M., u. D. B. KELL (1997):
Fluorescent brighteners: novel stains for the flow cytometric analysis of microorganisms
Cytometry, 28, 311-315
- DAVIDSON, R. H., S. E. DUNCAN, C. R. HACKNEY, W. N. EIGEL u. J. W. BOLING
(2000):
Probiotic culture survival and implications in fermented frozen joghurt characteristics
J. Dairy Sci. 83, 666-673
- DE MAN, J. C., M. ROGOSA u. M. E. SHARPE (1960):
A medium for the cultivation of lactobacilli
J. Appl. Microbiol. 23, 130-135
- DE VRESE, M. (2004):
Probiotische Lebensmittel und der Darm- was sagt die Wissenschaft
Dtsch. Molkerei-Zeitschrift Nr.9, 26-29

- DE VRESE, M. u. J. SCHREZENMEIR (2000):
Probiotika- Gesundheitliche Relevanz
In: EBERSDOBLER, H. u. A. MEYER (Hrsg.): Praxishandbuch Functional Food. Behr's Verlag, Hamburg, 1. Ordner, Kap. 7.4, 1-14
- DE VRIES, W. u. A. H. STOUTHAMER (1967):
Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of Bifidobacteria
J. Bacteriol. 93, Nr. 2, 574-576
- DE VRIES, W. u. A. H. STOUTHAMER (1968):
Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol, and xylose by *Bifidobacteria*
J. Bacteriol. 96, Nr. 2, 472-478
- DELCENSERIE, V., F. GAVINI, H. BEERENS, O. TRESSE, C. FRANSSSEN u. G. DAUBE (2007):
Description of a new species, *Bifidobacterium crudilactis* sp. nov., isolated from raw milk and raw milk cheeses
Syst. Appl. Microbiol. 30, 381-389
- DELLAGIO, F., L. M. T. DICKS, M. DU TOIT u. S. TORRIANI (1991):
Designation of ATCC 334 in place of ATCC 393 (NCDO 161) as the neotype strain of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and rejection of the *Lactobacillus paracasei* (COLLINS et al. 1989). Request for an opinion.
Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 340-342
- DELLAGIO, F., S. TORRIANI u. G. E. FELIS (2004):
Reclassification of *Lactobacillus cellobiosus* Rogosa et al. 1953 as a later synonym of *Lactobacillus fermentum* Beijerinck 1901
Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 809-812
- DELLAGIO, F., M. VESCOVO, L. MORELLI u. S. TORRIANI (1984):
Lactic acid bacteria in ensiled high moisture corn grain: physiological and genetic characterization
Syst. Appl. Bacteriol. 5, 534-544
- DELORME, C. (2007):
Streptococcus thermophilus
Int. J. Food Microbiol., im Druck, verfügbar unter:
doi 10.1016/J.ijfoodmicro.2007.08.014
- DESJARDINS, M. L., D. ROY u. J. GOULET (1990):
Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles
J. Dairy Sci. 73, 299-307
- DIAPER, L. P., K. TITHER u. C. EDWARDS (1992):
Rapid assessment of bacterial viability by flow cytometry
Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 268-272

DICKS, L. M. T., E. M. DU PLESSIS, F. DELLAGLIO u. E. LAUER (1996):
 Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. Rev., Designation of ATCC 334 as the Neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*
 Int. J. Syst. Bacteriol. 46, Nr.1, 337-340

DÖDERLEIN, A. (1892):
 Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber
 Cent. Bakt. 11, 699-700, zit. nach M. GOLDBERG (2002)

DONG, X., Y. XIN, W. JIAN u. D. LING (2000):
Bifidobacterium thermacidophilum sp. nov., isolated from an anaerobic digester
 Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50, 119-125

DUNCKER, S. (2005):
 Auswirkung von oral verabreichtem *E. coli* Nissle 1917 auf das Darm-assoziierte Immunsystem des Schweins
 Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

EITZMAN, P.D., J.L. HENDRICK u. F. SRIENC (1989):
 Quantitative immunofluorescence in single *Saccharomyces cerevisiae* cells
 Cytometry 10, 475-483

ERICKSON u. HUBBARD (2000):
 Probiotic immunomodulation in health and disease
 J. Nutr. 130, 403-409

FACKLAM, R. (2002):
 What happened to the streptococci: overview to taxonomic and nomenclature changes
 Clin. Microbiol. Reviews 15, 613-630

FARROW, J. A. u. M. D. COLLINS (1984):
 DNA base composition, DNA-DNA homology and long chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*
 J. General Microbiol. 130, 357-362

FEMIA, A. P., C. LUCERI, P. DOLARA, A. GIANNI, A. BIGGERI, M. SALVADORI, Y. CLUNE, K. J. COLLINS, M. PAGLIERANI u. G. CADERI (2002):
 Antitumorogenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats
 Carcinogenesis 23, Nr. 11, 1953-1960

FERNÁNDEZ-LAGO, L., F. J. VALLEJO, I. TRUJILLANO u. N. VIZCAÍNO (2000):
Fluorescent whole-cell hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify
Brucella spp. by flow cytometry
J. Clin. Microbiol. 38, Nr. 7, 2768-2771

FERRARI, B. C., G. OREGAARD u. S. J. SØRENSEN (2004):
Recovery of GFP-labeled bacteria for culturing and molecular analysis after cell sorting
using a benchtop flow cytometer
Microbial Ecol. 48, 239-245

FOX, S. M. (1989):
Probiotics: intestinal inoculants for production animals
Vet. Med. 83, 806-830

FUCHS, B. M., G. WALLNER, W. BEISKER, I. SCHWIPPL, W. LUDWIG u. R.
AMANN (1998):
Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16s rRNA for
fluorescently labeled oligonucleotide probes
Appl. Environ. Microbiol. 64, Nr. 12, 4973-4982

FUJISAWA, T., Y. BENNO, T. YAESHIMA u. T. MITSUOKA (1992):
Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus*
gallinarum sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus*
acidophilus A3 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus*
(Nakamura 1981)
Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 487-491

FULLER, R. (1989):
Probiotics in man and animal
J. Appl. Bacteriol. 66, 365-378

FULLER, R. (1991):
Probiotics in human medicine
Gut, 32, 439-442

GALDEANO, C. M. u. G. PERDIGON (2004):
Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune
stimulation
J. Appl. Microbiol. 97, 673-681

GASOL, J. M., U. L. ZWEIFEL, F. PETERS, J. A. FUHRMAN u. Å. HAGSTRÖM
(1999):
Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry
in natural planktonic bacteria
Appl. Environ. Microbiol. 65, Nr. 10, 4475-4483

GASSER, F. u. M. MANDEL (1968):

Desoxyribonucleic acid base composition of the genus *lactobacillus*
J. Bacteriol. 96, 580-588

GAUFFIN CANO, P. u. G. PERDIGON (2003):

Probiotics induce resistance to enteropathogens in a re-nourished mouse model
J. Dairy Res. 70, 433-440

GEOFFROY, M.-C., C. GUYARD, B. QUATTANENS, S. PAVAN, M. LANGE u. A. MERCENIER (2000):

Use of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors
Appl. Environ. Microbiol. 66, Nr. 1, 383-391

GERLACH, S. (2007):

Wirkungen eines Bifidojoghurts mit Laktulose und eines konventionellen Joghurts auf Darmphysiologie und bakterielle Metaboliten als Risikomodulatoren der Kolonkarzinogenese sowie Darmflora und Blutlipide bei gesunden Erwachsenen
Giessen, Justus-Liebig-Universität, Diss.

GHODDUSI, H. B. U. R. K. ROBINSON (1996):

Enumeration of starter cultures in fermented milks
J. Dairy Res. 63, Nr. 1, 151-158

GIBSON, G. R. u. F. MACFARLANE (1995):

The normal gut flora

In: SALMINEN, S., C. BOULEY, M. C. BOUTRON-RUALT, J. H. CUMMINS, A. FRANK, G. R. GIBSON, E. ISOLAURI, M. C. MOREAU, M. ROBERFROID u. I. ROWLAND (Hrsg.): Functional food science and gastrointestinal physiology and function
Brit. J. Nutr. 80, Suppl. 1, 147-171

GIBSON, G. R. u. M. B. ROBERFROID (1994):

Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics
J. Nutr. 125, 1401-1412

GILL, H. S., K. RUTHERFURD, M. L. CROSS u. P. K. GOPAL (2001):

Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HNO19
Am. J. Clin. Nutr. 74, 833-839

GOLDBERG, M. (2002):

Entwicklung und Einsatz von 16S rRNA Gensonden zur Identifizierung biotechnologisch genutzter Laktobazillen-Stämme der *L. acidophilus*- und *L. casei*- Gruppe
Diss. Freie Universität Berlin, Journal-Nr.: 2585

GOLDIN, B. R. (1998):
Health benefits of probiotics
Br. J. Nutr. 80, 203-207

GÖRKE, B. u. E. LIEBLER-TENORIO (2001):
Probiotika: gibt es eine wissenschaftliche Grundlage für die Wirkung?
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 108, 249-251

GUILLOT, J. F. (2000):
The pro and cons of probiotics- make probiotics work for poultry
Feed Mix Special, 28-30

GUINDULAIN, T. u. J. VIVES-REGO (2002):
Involvement of RNA and DNA in the staining of *Escherichia coli* by SYTO 13
Appl. Microbiol. 34, 182-188

GUNASEKERA, T. S., P. V. ATTFIELD u. D. A. VEAL (2000):
A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk
Appl. Environ. Microbiol. 66, Nr. 3, 1228-1232

GUNASEKERA, T. S., D. A. VEAL u. P. V. ATTFIELD (2003):
Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in
microbiological and somatic cell analyses in milk
Int. J. Food Microbiol. 85, 269-279

HAMMES, W. P. u. R. F. VOGEL (1995):
The genus *Lactobacillus*
In : WOOD, B. J. B. u. W. H. HOLZAPFEL (Hrsg.): The genera of lactic acid bacteria,
Vol. 2, Chapman & Hall, London, 19-54

HAMMES, W. P., N. WEISS u. W. HOLZAPFEL (1992):
The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*
In: BALOWS, A., H. G. TRÜPER, M. DWORKIN, W. HARDER u. K. H. SCHLEIFER
(Hrsg.): The prokaryotes, Vol. II, Chapter 70, Springer-Verlag, 1535-1595

HANSEN, P. A. (1968):
Type strains of *Lactobacillus* species. A report by the taxonomic subcommittee on
lactobacilli and closely related microorganisms.
American Type Culture Collection, Md., USA

HANSEN, P. A. u. E. F. LESSEL (1971):
Lactobacillus casei (Orla-Jensen) comb. nov.
Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 69-71

HANSEN, P. A. u. G. MOCQUOT (1970):

Lactobacillus acidophilus (Moro) comb. nov.

Int. J. Syst. Bacteriol. 20, 325-327

HARMSSEN, H. J. M., G. R. GIBSON, P. ELFFERICH, G. C. RAANGS, A. C. M. WILDEBOER-VELOO, A. ARGAIZ, M. B. ROBERFROID u. G. W. WELLING (1999):
Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria

FEMS Microbiol. Lett. 183, 125-129

HARTY, D. W. S., H. J. OAKLEY, M. PATRIKAKIS, E. B. H. HUME u. K. W. KNOX (1994):

Pathogenic potential of lactobacilli

Int. J. Food Microbiol. 24, 179-189

HATAKKA, K., E. SAVILAHTI, A. PÖNKÄ, J. H. MEURMAN, T. POUSSA, L. NÄSE, M. SAXELIN u. R. KORPELA (2001):

Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial

BMJ 322, http://www.bmj.com/cgi/report_abr/322/7298/1327

HELLER, K. J. (2001):

Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms

Am. J. Clin. Nutr. 73, 374-379

HELLER, K. J., C. MÖLLER u. W. BOCKELMANN (2004):

Lactobacillus bulgaricus-Kulturen zur Herstellung eines Joghurts mit mildem Geschmack

Dtsch. Milchwirtsch. 55, 422-424

HICKSON, M., A. L. D'SOUZA, N. MUTHU, T. R. ROGERS, S. WANT, C. RAJKUMAR u. C. J. BULPITT (2007):

Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial

BMJ, 335:80, <http://www.bmj.com/cgi/report/bmj.39231.599815.55v1.pdf>

HILTON, E., H. D. ISENBERG, P. ALPERSTEIN, K. FRANCE u. M. T. BORENSTEIN (1992):

Ingestion og yoghurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidal vaginitis

Ann. Intern. Med. 116, 353-357

HINRICHS, M. (2005):

Auswirkungen von *Enterococcus faecium* als Futterzusatzstoff auf die Keimflora und Zusammensetzung des Darminhalts sowie auf die Leistung von Broilern bei gleichzeitigem Einsatz eines Kokzidiostatikums

Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.

HOLM, C. u. L. JESPERSEN (2003):

A flow-cytometric gram-staining technique for milk-associated bacteria
 Appl. Environ. Microbiol. 69, Nr. 5, 2857-2863

HOLM, C., T. MATHIASSEN u. L. JESPERSEN (2004):

A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk
 J. Appl. Microbiol. 97, 1365-2672

HOLS, P., F. HANCY, L. FONTAINE, B. GROSSIORD, D. PROZZI, N. LEBLOND-BOURGET, B. DECARIS, A. BOLOTIN, C. DELORME, S. DUSKO EHRlich, E. GUEDON, V. MONNET, P. RENAULT u. M. KLEEREBEZEM (2005):

New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics
 FEMS Microbiol. Reviews 29, 435-463

HOLZAPFEL, W., P. HABERER, R. GEISEN, J. BJÖRKROTH u. U. SCHILLINGER (2001):

Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition
 Am. J. Clin. Nutr. 73, 365-373

HOLZAPFEL, W., P. HABERER, J. SNEL, U. SCHILLINGER u. J. H. J. HUIS IN 'T VELD (1998):

Overview of gut flora and probiotics
 Int. J. Food Microbiol. 41, 85-101

HULL, R. R. U. A. V. ROBERTS (1984):

Differential enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt
 Aust. J. Dairy Technol. 39, 160-163

JEROCH, H., E. STROBEL u. R. ZACHMANN (2004):

Untersuchungen zur Wirksamkeit des Probiotikums *Bacillus cereus* toyoi in der Putenmast
 Vet. Zootechn. 28, Nr. 50, 57-60

JOHNSON, J. L., F. PHELPS, C. S. CUMMINS, J. LONDON u. F. GASSER (1980):

Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus*-group
 Int. J. Syst. Bacteriol. 30, 53-68

JUNTUNEN M., P. V. Kirjavainen, A. C. Ouwehand, S. J. Salminen u. E. Isolauri (2001):
 Adherence of probiotic bacteria to human Intestinal mucus in healthy infants and during Rotavirus Infection

Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8, Nr. 2, 293-296

KAILA, M., E. ISOLAURI, E. SOPPI, E. VIRTANEN, S. LAINE u. H. ARVILOMMI (1992):

Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain
 Pediatr. Res. 32, 141-144

KALLIOMÄKI, M. S. SALMINEN, H. ARVILOMMI, P. KERO, P. KOSKINEN u. E. ISOLAURI (2001):

Probiotics: in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial
 Lancet 357, 1076-1079

KALLIOMÄKI, M. S. SALMINEN, T. POUSSA, H. ARVILOMMI u. E. ISOLAURI (2003):

Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial
 Lancet 361, 1896-1871

KAMPHUES, J., M. COENEN, E. KIENZLE, J. PALLAUF, O. SIMON u. J. ZENTEK (2004):

Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung
 Verlag Schaper, Alfeld-Hannover, 10. Aufl.

KANDLER, O. (1970):

Amino acid sequence of the murein and taxonomy of the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc* and *Pediococcus*
 Int. J. Syst. Bacteriol. 20, 491-507

KANDLER, O., K.-O. STETTER u. R. KÖHL (1980):

Lactobacillus reuteri sp. nov. , a new species of heterofermentative lactobacilli
 Zbl. Bakt. I Orig. C 1, 264-269

KIRJAVAINEN, P. V., T. ARVOLA, S. J. SALMINEN u. E. ISOLAURI (2002):

Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning?
 Gut 51, 51-55

KLAVER, F. A. M., F. KINGMA u. A. C. BOLLE (1990):

Groeirelaties tussen bifidobacteriën en lactobacillen in melk
 Voeding Middel Technologie 23, Nr. 9, 13-16

KLEIN, G. (1998):

Probiotische und technologisch eingesetzte Mikroorganismen in Lebensmitteln, Arzneimitteln und im Tierfutter – phäno- und genotypische Untersuchungen zur Identifizierung und zur biologischen Sicherheit
 Berlin, Freie Universität, Habil.

KLEIN, G., A. PACK, C. BONAPARTE u. G. REUTER (1998):
Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria
Int. J. Food Microbiol. 41, 103-125

KLEIN, G., W.-R. STENZEL u. G. REUTER (1999):
Langzeitstudie zum Nachweis von probiotischen Mikroorganismen in tiefgefrorenen und gekühlten gesäuerten Milcherzeugnissen
In: Proc. 40. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen 29.9.-1.10.1999, 347-350

KLUPSCH, H. J. (1984):
Saure Milcherzeugnisse, Milchmischgetränke und Desserts
in: E. V. Milchwirtschaft (Hrsg.), Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer, 362-365

KNEIFEL, W. (2005):
Entwicklung und Qualitätsmerkmale von Probiotika
Lohmann Information 1 (Januar-März), 17-20

KNEIFEL, W. u. B. PACHER (1993):
An X-Glu based medium for the selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in joghurt-related milk products
Int. Dairy J. 3, Nr. 3, 277-291

KOLTER, R., D. A. SIEGELE u. A. TORMO (1993):
The stationary phase of the bacterial life cycle
Annu. Rev. Microbiol. 47, 855-874

KOPEING, K., C. BONAPARTE, W. KNEIFEL u. M. UPMANN (2002):
Selektiver Nachweis von Bifidobakterien mit Hilfe eines Mupirocin-haltigen Nährbodens
In: Proc. 43. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen 24.-27.09.2002, 658-663

KöB, C. (2004):
Durchflußzytometrische Differenzierung sowie phänotypische und funktionelle Eigenschaften boviner Milchzellen unter Berücksichtigung der Eutergesundheit
Hannover, Tierärztl. Hochschule, Diss.

KULLEN, M. J. u. T. R. KLAENHAMMER (2000):
Genetic modification of intestinal Lactobacilli and Bifidobacteria
Curr. Issues Mol. Biol. 2, Nr. 2, 41-50

KULP, W. L., u. L. F. RETTGER (1924):
Comparative study of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*
J. Bacteriol., IX, 4, 357-389

- KUNDRAT, W. (1958):
 Beitrag zur Kenntnis der Milchsäurebakterien
 1.Mitteilung: Die Differenzierung der stäbchenförmigen Milchsäurebakterien (Genus *Lactobacillus* Beijerinck)
 Zbl. Bakt. II Abt. 111, 249-259
- LAPIERRE, L. (1990):
 Growth of *Lactobacillus acidophilus* isolated from fermented dairy products on different selective media
 Research Paper, Nestec. Research Centre, Lausanne, Schweiz
- LAPIERRE, L., P. UNDELAND u. L. J. COX (1992):
 Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products
 J. Dairy Sci. 75, Nr. 5, 1192-1196
- LARROIA, S. u. J. H. MARTIN (1991):
 Methods for enumerating and propagating bifidobacteria
 Cult. Dairy Prod. J. 26, Nr. 2, 32
- LAUER (1990):
Bifidobacterium gallicum sp. nov. isolated from human feces
 Int. J. Syst. Bacteriol. 40, 100-12
- LAUER, E., C. HELMING u. O. KANDLER (1980):
 Heterogeneity of the species *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Mocollet as revealed by biochemical characteristics and DNA-DNA hybridization
 Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C 1, 150-168
- LAUER, E. u. O. KANDLER (1976):
 Mechanismus der Variation des Verhältnisses Acet/Lactat bei der Vergärung von Glukose durch Bifidobakterien
 Arch. Mikrobiol. 110, 271-277
- LAUER, E. u. O. KANDLER (1980):
Lactobacillus gasserii sp. nov., a new species of subgenus *Thermobacterium*
 Zbl. Bakteriologie, Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig. Reihe C 1, 75-78
- LAUER, E. u. O. KANDLER (1983):
 DNA-DNA homology, murein types and enzyme patterns in the type strains of the genus *Bifidobacterium*
 Syst. Appl. Microbiol. 4, 42-64

- LEBARON, P., N. PARTHUISOT u. P. CATALA (1998):
Comparison of blue nucleic acid dyes for flow cytometric enumeration of bacteria in aquatic systems
Appl. Environ. Microbiol. 64, Nr. 5, 1725-1730
- LEBLOND-BOURGET, N., H. PHILLIPE, I. MARGIN u. B. DECARIS (1996):
16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *bifidobacterium* phylogeny
Int. J. Syst. Bacteriol. 46, Nr. 1, 102-111
- LERCHE, M. u. G. REUTER (1960):
Beitrag zur Methodik der Isolation und Differenzierung von aerob wachsenden „Laktobazillen“ (Genus „*Lactobacillus* Beijerinck“)
Zbl. Bakt. I. Orig. 179, 254-270
- LERCHE, M. u. G. REUTER (1962):
Das Vorkommen aerob wachsender grampositiver Stäbchen des Genus *Lactobacillus* Beijerinck im Darminhalt erwachsener Menschen
Zbl. Bakt. I. Orig. 185, 446-481
- LILLEY, D. M. u. R. H. STILLWELL (1965):
Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms
Science 147, 747-748
- LIM, K. S., C. S. HUH, Y. J. BAEK u. H. U. KIM (1995):
A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products
J. Dairy Sci. 78, Nr. 10, 2108-2112
- LINDL, T. (2002):
Zell- und Gewebekultur
5. Auflage, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg Berlin S. 247-253
- LINK-AMSTER, H., F. ROCHAT, K. Y. SAUDAN, O. MIGNOT u. J. M. AESCHLIMANN (1994):
Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake
FEMS Immunol. Med. Microbiol. 10, 55-63
- MAJAMAA, H. u. E. ISOLAURI (1997):
Probiotics: a novel approach in the management of food allergy
J. Allergy Clin. Immunol. 99, 179-185

- MALCHOW (1997):
Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease?
J. Clin. Gastroenterol. 25, Nr. 4,653-658
- MARA, D. D., u. J. I. OARGNI (1983):
Sorbitol-fermeting bifidobacteria as specific indicators of faecal pollution
J. Appl. Bacteriol. 55, Nr. 3, 349-357
- MASCO, L., M. VENTURA, R. ZINK, G. HUYS u. J. SWINGS (2004):
Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov.
Int. J. Syst. Bacteriol. 54, 1137-1143
- MATSUMOTO, K., T. TAKADA, K. SHIMIZU, Y. KADO, K. KAWAKAMI, I. MAKINO, Y. YAMAOKA, K. HIRANO, A. NISHIMURA, O. KAJIMOTO u. K. NOMOTA (2006):
The effects of a probiotic milk produkt containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the defecation frequency and the intestinal microflora of sub-optimal health state volunteers: a randomized placebo-controlled cross-over study
Bioscience Microflora Vol. 25 , Nr. 2, 39-48
- MATSUZAKI, T. (1998):
Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota
Int. J. Food Microbiol. 41, 133-140
- MATSUZAKI, T. u. J. CHIN (2000):
Modulating immune responses with probiotic bacteria
Immunol. Cell Biol. 78, 67-73
- MATTEUZI, D., F. CROCIANI, G. ZANI u. D. L. TROVATELLI (1971):
Bifidobacterium suis n. sp.: a new species of the genus *Bifidobacterium* isolated from pig feces
Zeitschrift. Allg. Mikrobiol. 11, 387-395
- MCDONALD, L. C., R. F. MCFEETERS, M. A. DAESCHEL u. H. P. FLEMING (1987):
A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria
Appl. Environ. Microbiol. 53, Nr. 6, 1382-1384

- MEILE, L. W. LUDWIG, U. RUEGER, C. GUT, P. KAUFMANN, G. DASEN, S. WENGER u. M. TEUBER (1997):
Bifidobacterium lactis sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk
Syst. Appl. Microbiol. 15, 380-385
- MENG, X. C., C. STANTON, G. F. FITZGERALD, C. DALY u. R. P. ROSS (2008):
Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotic cultures
Food Chemistry 106, 1406-1416
- MERLE, R. (2003):
Beziehungen zwischen Eutergesundheit und Funktionlität von aus Blut und Milch isolierten Leukozyten des Rindes unter besonderer Berücksichtigung der Chemilumineszenz
Hannover, Tierärztl. Hochschule, Diss.
- METCHNIKOFF, E. (1907):
Prolongation of life
Verlag G. P. Putman & Sons, New York, zit. nach SIMON et al. (2001)
- MEYER, A. L., I. ELMADFA, I. HERBACEK u. M. MICKSCHE (2007):
Probiotic, as well as conventional yogurt, can enhance the stimulated production of proinflammatory cytokines
J. Hum. Nutr. Diet 20, S.590-598
- MICHAYLOVA, M., K. ISAWA u. L. VLACHKOVA (2002):
Study on joghurt bacteria isolated from plants in bulgaria
Book of abstracts of the 7th Symposium on lactic acid bacteria, Egmond aan Zee, The Netherlands, A 40
- MIYAMOTO-SHINOHARA, Y., T. IMAIZUMI, J. SUKENOBE, Y. MURAKAMI, S. KAWAMURA u. Y. KOMATSU (2000):
Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage
Cryobiol. 41, 251-255
- MITSUOKA, T. (1969):
Vergleichende Untersuchungen über die Laktobazillen aus den Faeces von Menschen, Schweinen und Hühnern
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 210, 32-51
- MITSUOKA, T. (1969):
Vergleichende Untersuchungen über die Bifidobakterien aus dem Verdauungstrakt von Menschen und Tieren
Zbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I 210, 52-64

MITSUOKA, T. (1984):

Taxonomy and ecology of bifidobacteria
Bifidobacteria Microflora 3, 11-28

MITSUOKA, T., T. SEGA u. S. YAMAMOTO (1965):

Eine verbesserte Methodik der qualitativen und quantitativen Analyse der Darmflora von Menschen und Tieren
Zbl. Bakteriologie I. Abt. Orig. 195, 455-469

MODLER, H. W. U. L. VILLA-GARCIA (1993):

The growth of *Bifidobacterium longum* in a whey-based medium and viability of the organism in frozen yoghurt with low and high levels of developed acidity
Cult. Dairy Prod. J. 28, 4-8

MOHR, H., B. LAMBRECHT, A. BAYER, H.-P. SPRENGLER, S.-B. NICOL, T.

MONTAG u. T. H. MÜLLER (2006):

Basics of flow cytometry-based sterility testing of platelet concentrates
Transfusion 46, 41-49

MOLITOR, D. (2001):

In vitro- und in vivo-Effekte eines Probiotikums (*Enterococcus faecium*) als Futterzusatz bei Hunden
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

MONTES, R. G., T. M. BAYLESS, J. M. SAAVEDRA u. J. A. PERMAN (1995):

Effect of milks inoculated with *Lactobacillus acidophilus* or a yogurt starter culture in lactose-maldigesting children
J. Dairy Sci. 78, 1657-1664

MORO, E. (1900):

Ueber den *Bacillus acidophilus* n. spec.
Ein Beitrag zur Kenntnis der normalen Darmbakterien des Säuglings
Jahrb. Kinderheilkunde 52, 38-55

MORTIMER, F., D. J. MASON u. V. A. GANT (2000):

Flow cytometric monitoring of antibiotic-induced injury in *Escherichia coli* using cell-impermeant fluorescent probes
Antimicrobial Agents Chemotherapy 44, Nr. 3, 676-681

MOSCHETTI, G., G. BLAIOTTA, M. APONTE, P. CATZEDDU, F. VILLANI, P.

DEIANA u. S. COPPOLA (1998):

Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains
J. Appl. Microbiol. 85, 25-36

- MUNOA, F. J. u. R. PARES (1988):
 Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp.
 Appl. Environ. Microbiol. 54, No. 7, 1715-1718
- NADER DE MARCIAS, M. E., M. C. APELLA, N. C. ROMERO, S. N. GONZALES u.
 G. OLIVER (1992):
 Inhibition of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lact. acidophilus*
 J. Appl. Bacteriol. 73, 407-411
- NAKAMURA, L. K. (1981):
Lactobacillus amylovorus, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn
 fermentations
 Int. J. Syst. Bacteriol. 31, 56-63
- NEBE-VON-CARON, G. (2003):
 Bugs in the beam
 A manual for cytometry in microbiology
 Unipath limited/ Unilever, Sharnbrook, Bedfordshire, GB
- NEBE-VON-CARON, G., P. J. STEPHENS, C. J. HEWITT, J. R. POWELL u. R. A.
 BADLEY (2000):
 Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell
 sorting
 J. Microbiol. Methods, 42, 97-114
- NIGHSWONGER, B. D., M. M. BRASHEARS u. S. E. GILLILAND (1996):
 Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products
 during refrigerated storage
 J. Dairy Sci. 79, 212-219
- NISSLE, A. (1916):
 Über die Grundlagen einer neuen ursächlichen Bekämpfung der pathologischen Darmflora
 Dtsch. Med. Wochenschr. 42, 1181-1184, zit. nach DUNCKER (2005)
- NOGOSSEK, M. (2001):
 Untersuchungen zur Wirksamkeit von Pro- und Prebiotika gegen eine Infektion des
 Verdauungstraktes mit *Escherichia coli* bei Kanarienvögeln (*Serinus canaria*)
 Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- NOLAN, G.P., S. FIERING, J.-F. NICOLAS u. L. A. HERZENBERG (1988):
 Fluorescence-activated cell analysis and sorting of viable mammalian cells based on β -D-
 galactosidase activity after transduction of *Escherichia coli lacZ*
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2603-2607

- NOVO, D. J., N. G. PERLMUTTER, R. H. HUUNTER u. H. M. SHAPIRO (2000):
Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential,
membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus*
luteus
Antimicrobial Agents Chemotherapy 44, Nr. 4, 827-834
- NURMI, E. , L. NUOTIO u. SCHNEITZ (1992):
The competitive exclusion concept: development and future
Int. J. Food Microbiol. 15, 237-240
- OGIHARA, H., K. SATO u. M. HARUTA (1983):
The applicability of BCP plate count agar for the detection and enumeration of lactic acid
bacteria in fermented milk and lactic beverages
Shokuhin Eiseigaku Zasshi 24, Nr. 2, 230-233
- ORLA-JENSEN, S. (1919):
Maelkeri-Bakteriologi
Schönbærsk Forlag, Copenhagen, zit. nach EUZEBY (2006)
- ORLA-JENSEN, S. (1924):
La classification des bactéries lactiques
Lait 4, 468-474
DOI: 10.1051/lait:19243627
- PACHER, B. u. W. KNEIFEL (1993):
Zur Problematik des Nachweises von *Lactobacillus acidophilus* und Bifidobakterien in
Sauermilchprodukten
Dtsch. Molkereizeitschrift 114, 80-82
- PACHER, B. u. W. KNEIFEL (1996):
Development of culture medium for the detection and enumeration of bifidobacteria in
fermented milk products
Int. Dairy J. 6, 43-64
- PATURI, G. , M. PHILLIPS, M. JONES u. K. KAILASAPATHY (2007):
Immune enhancing effects of *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 and *Lactobacillus*
paracasei LAFTI L 26 in mice
Int. J. Food Microbiol. 115, 115-118
- PEDERSEN, L. W. (1993):
Proposed methods for counting and discriminating between: *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*
subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus* and bifidobacteria
Chr. Hansen's Laboratory Research Paper

- PELTO, L., E. ISOLAURI, E.-M. LILIUS, J. NUUTILA u. S. SALMINEN (1998):
Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have a immunostimulatory effect in healthy subjects
Clin. Experimental Allergy 28, 1474-1479
- PERDIGON, G., S. ALVAREZ, M. NADER DE MACIAS, M. E. ROUX u. A. PESCE DE RUIZ HOLGADO (1990):
The oral administration of lactic acid bacteria increase the mucosal intestinal immunity in response to enteropathogens
J. Food Protect. 53, 404-410
- PERDIGON, G., S. ALVAREZ, M. E. ROUX u. A. PESCE DE RUIZ HOLGADO (1991):
Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*: influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in the intestinal infections
J. Dairy Res. 58, 485-496
- PERDIGON, G., S. ALVAREZ, M. RACHID, G. AGÜERO u. N. GOBBATO (1995):
Symposium probiotic bacteria for humans: clinical systems for evaluation of effectiveness. Immune system stimulation by probiotics
J. Dairy Sci. 78, 1597-1606
- PEREZ, P. F., G. L. DE ANTONI u. M. C. AÑON (1991):
Formate production by *Streptococcus thermophilus* cultures
J. Dairy Sci. 74, 2850-2854
- PERITI, P. u. F. TONELLI (2002):
Biotherapeutics and biotherapy of surgical enteropathies
Digest Liver Dis. 34 (Suppl. 2), 87-97
- PESTKA, J. J., C.-L. HA, R. W. WARNER, J. H. LEE u. Z. USTUNOL (2001):
Effects of ingestion of yoghurts containing *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus* on splee and Peyer's patch lymphocyte populations in the mouse
J. Food Protect. 64, Nr. 3, 392-395
- PODGORSKII, V. S., T. M. LIASKOVSKII, N. K. KOVALENKO u. L. T. OLESHCHENKO (2006):
Study of vaginal and intestinal microflora of woman in the prenatal period and ist correction in dysbacteriosis
Microbiol. Z. 68, Nr. 2, 92-104
- POUPARD, J. A., I. HUSAIN u. R. F. NORRIS (1973):
Biology of the bifidobacteria
Bacteriol. Rev. 37, 136-165

- POUWELS, P. H., R. L. LEER, M. SHAW, M.-J. HEIJME DEN BAK-GLASHOUWER, F. D. TIELEN, E. SMIT, B. MARTINEZ, J. JORE u. P. L. CONWAY (1998):
Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes
Int. J. Food Microbiol. 41, 155-167
- RADKE-MITCHELL, L. C. u. W. E. SANDINE (1986):
Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and
Lactobacillus bulgaricus
J. Dairy Sci. 69, 2558-2568
- RANTALA, M. u. E. NURMI (1973):
Prevention of growth of *Salmonella infantis* in chicks by the flora of the alimentary tract of
chickens
Br. Poultry Sci. 14, 627-630
- RASIC, J. L. u. N. SAD (1990):
Culture media for detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products
Bull. IDF (International Dairy Federation) 252, 24-34
- RECHKEMMER, G. (2000):
Beeinflussung der Darmflora durch die Ernährung
In: Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE, Hrsg.): Ernährungsbericht, Kap. 9, 259-286
- REDDY, B. S. (1998):
Prevention of colon cancer by pre- and probiotics: evidence from laboratory studies
Br. J. Nutr. 80, 219-223
- REID, G., J. JASS, M. T. SEBULSKI u. J. K. MCCORMICK (2003):
Potential uses of probiotics in clinical practice
Clin. Microbiol. Rev. 16, No. 4, 658-672
- RENONDO-LOPEZ, V., R. L. COOK u. J. D. SOBEL (1990):
Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial
microflora
Rev. Infect. Dis. 12, Nr. 5, 856-872
- RESNIK, I. G. u. M. A. LEVIN (1981):
Quantitative procedure for Enumeration of Bifidobacteria
Appl. Environ. Microbiol. 42, No.3, 427-432
- REUTER, G. (1963):
Vergleichende Untersuchungen über die Bifidus-Flora im Säuglings- und Erwachsenenstuhl
Zbl. Bakt. I. Orig. A 191, 486-501

REUTER, G. (1965):
Das Vorkommen von Laktobazillen in Lebensmitteln und ihr Verhalten im menschlichen Intestinaltrakt
Zbl. Bakt. I. Orig. 197, 468-487

REUTER, G. (1967):
Atypische Streptobakterien als dominierende Flora in reifender und gelagerter Rohwurst
Fleischwirtsch. 47, 397-402

REUTER, G. (1969):
Zusammensetzung und Anwendung von Bakterienkulturen für therapeutische Zwecke
Arzneim.-Forsch. 19, 103-109

REUTER, G. (1997):
Present and future of probiotics in Germany and in central Europe
Biosci. Microflora 16, Nr. 2, 43-51

ROBINSON, R.K., C.A., BATT u. P.D. PATEL (2000):
Encyclopedia of food microbiology
Academic press, New York, London,
Bd 1 u. 2, S. 1134-1164

ROGOSA, M. (1974):
Bifidobacterium Orla-Jensen 1924, further comments
In: BUCHANAN R. u. N. GIBBONS (Hrsg.): Bergey's manual of determinative bacteriology
Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 669-671

ROGOSA, M., J. A. MITCHELL u. R. S. WISEMAN (1951):
A selective medium for the isolation of oral and fecal lactobacilli
J. Bact. 62, 132-133

ROGOSA, M., R. S. WISEMAN, J. A. MITCHELL, M. N. DISRAELY u. A. J. BEAMAN (1953):
Species differentiation of oral lactobacilli from man including descriptions of *Lactobacillus salivarius* nov. spec. and *cellobiosus* nov. spec.
J. Bact. 65, 681-699

ROSENFELDT, V., E. BENFELDT, S. D. NIELSEN, K. F. MICHAELSEN, D. L. JEPPESEN, N. H. VALERIUS u. A. PAERGAARD (2003):
Effect of probiotic lactobacillus strains in children with atopic dermatitis
J. Allergy Clin. Immunol. 111, 389-395

ROLFE, R. D. (2000):
The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health
J. Nutr. 130, 369-402

ROTHE, G. (2007):

Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie

In: SACK, U., A. TARNOK u. G. ROTHE (Hrsg.) (2007): Zelluläre Diagnostik

Karger Verlag, Basel u. Freiburg, 27-70

SAARELA, M., M. RANTALA, K. HALLAMAA, L. NAHYNEKA, I. VIRKAJÄRI u. J. MÄTTÖ (2004):

Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria

J. Appl. Microbiol. 96, 1205-1214

SAKAMOTO, C., N. YAMAGUCHI u. M. NASU (2005):

Rapid and simple quantification of bacterial cells by using a microfluidic device

Appl. Environ. Microbiol. 71, Nr. 2, 1117-1121

SAKATA, S., M. KITAHARA, M. SAKAMOTO, H. HAYASHI, M. FUKUJAMA u. Y. BENNO (2002):

Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*

Int. J. Syst. Bacteriol. 20, 57-64

SALMINEN, S., A. OUWEHAND, Y. BENO u. Y. K. LEE (1999):

Probiotics: how should they be defined?

Trends Food Science & Technol. 10, 107-110

SARTOR, R. B. (2004):

Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics

Gastroenterol. 126, 1620-1633

SAXELIN, M. (1996):

Persönliche Mitteilung

Valio Ltd. R.&D.Division, Helsinki (SF), zit. nach BONAPARTE et al. (2000)

SAXELIN, M. (2008):

Probiotic formulations and applications, the current probiotics market, and changes in the marketplace: a european perspective

Clin. Infect. Dis. 46, (Suppl. 2), 76-79

SCARDOVI, V. (1986):

Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen

In: SNEATH, P. H. A., N. S. MAIR u. M. E. SHARPE (Eds.):

Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 1209-1234

SCARDOVI, V. u. F. CROCIANI (1974):

Bifidobacterium catenulatum, *Bifidobacterium dentium* and *Bifidobacterium angulatum*: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships
Int. J. Syst. Bacteriol. 24, 6-20

SCARDOVI, V. u. L. D. TROVATELLI (1965):

The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*
Ann. Microbiol. Enzimol. 15, 19-29

SCARDOVI, V. u. L. D. TROVATELLI (1969):

New species of bifidobacteria from *Apis mellifica* L. and *Apis indica* F. A contribution of the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*
Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten, Hygiene, Abt. II 123, 64-88

SCARDOVI, V. u. L. D. TROVATELLI (1974):

Bifidobacterium animalis (Mitsuoka) comb. nov. and the "minimum" and "subtile" groups of new bifidobacteria found in sewage
Int. J. Syst. Bacteriol. 24, 21-28

SCARDOVI, V., L. D. TROVATELLI, B. BIAVATI u. G. ZANI (1979):

Bifidobacterium cuniculi, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium boum*, and *Bifidobacterium pseudocatenulatum*: four new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships
Int. J. Syst. Bacteriol. 29, 291-311

SCARDOVI, V. u. G. ZANI (1974):

Bifidobacterium magnum sp. nov., a large, acidophilic bifidobacterium isolated from rabbit feces
Int. J. Syst. Bacteriol. 24, 29-34

SCHIEMANN, M. u. D. H. BUSCH (2007):

Auswahl und Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen
In: SACK, U., A. TARNOK u. G. ROTHE (Hrsg.) (2007): Zelluläre Diagnostik
Karger Verlag, Basel u. Freiburg

SCHIFFRIN, E. J., F. ROCHAT, H. LINK-AMSTER, J. M. AESCHLIMANN u. A. DONNET-HUGHES (1995):

Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria
J. Dairy Sci. 78, 491-497

SCHILLINGER, U. (1999):

Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage
Int. J. Food Microbiol. 47, 79-87

- SCHLEIFER, K. H., M. EHRMANN, U. KRUSCH u. H. NEVE (1991):
Revival of the species *Streptococcus thermophilus*, ex Orla-Jensen 1919, nom. rev.
Syst. Appl. Microbiol. 14, 386-388
- SCHLEIFER, K. H. u. R. KILLPER-BÄLZ (1987):
Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci,
enterococci and lactococci: a review
Syst. Appl. Microbiol. 10, 1-19
- SCHLEIFER, K. H., J. KRAUS, C. DVORAK, R. KILPPER-BÄLZ, M. D. COLLINS u.
W. FISCHER (1985):
Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov.
Syst. Appl. Microbiol. 6, 183-195
- SCHLEIFER, K.-H. u. W. LUDWIG (1995):
Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera
Syst. Appl. Microbiol. 18, 461-467
- SCHULER, R., A. RUPPERT, F. MÜLLER (1968):
Die Mikroorganismen der Bifidusgruppe (syn. *Lactobacillus bifidus*)
Milchwissenschaft (Sonderdruck) 23, Heft 6, 9, 10
- SCHULTZ, M., U. G. STRAUCH, H.-J. LINDE; S. WATZL; F. OBERMEIER, C.
GÖTTL, N. DUNGER, N. GRUNWALD, J. SCHÖLMEICH u. H. C. RATH (2004):
Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal
inflammation in two different murine models of colitis
Clin. Diagn. Lab. Immunology 11, Nr. 2, 372-378
- SEBALD, M. F., F. GASSER u. H. WERNER (1965):
DNA base composition and classification. Application to group of bifidobacteria and to
related genera
Ann. Inst. Pasteur 109, 251-269
- SEKAR, R., B. M. FUCHS, R. AMANN u. J. PERNTHALER (2004):
Flow sorting of marine bacterioplankton after fluorescence in situ hybridization
Appl. Environ. Microbiol. 70, Nr. 10, 6210-6219
- SGOURAS, D., P. MARAGKOUKAKIS, K. PETRAKI, B. MARTINEZ-GONZALEZ, E.
ERIOU, S. MICHPOULOS, G. KALANTZOPOULOS, E. TSAKALIDOU u. A.
MENTIS (2004):
In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota
Appl. Environ. Microbiol. 70, Nr. 1, 518-526
- SHAH, N. P., W. E. V. LANKAPUTHRA, M. L. BRITZ u. W. S. A. KYLE (1995):
Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt
during refrigerated storage
Int. Dairy J. 5, 515-521

- SHAPIRO, H.M.(1988):
 Practical flow cytometry
 John Wiley & Sons, Inc., New York, 4. Auflage
 Online-Version: <http://probes.invitrogen.com/lit/practicalflowcytometry/toc.html>
- SHERMAN, J. M. (1937):
 The streptococci
 Bacteriol. Rev. 1, Nr. 1, 3-97
- SHIMADA, K., M. MADA, M. MUTAI, A. SUZUKI u. H. KONUMA (1977):
 Techniques for viable cell counts in the fermented milk with *Bifidobacterium*
 Shokuhin Eiseigaku Zasshi 18, 537-546
- SIMON, O., A. JADAMUS u. W. VAHJEN (2001):
 Probiotic feed additives-effectiveness and expected modes of action
 J. Anim. Feed Sci. 10, Suppl. 1, 51-67
- SIMPSON, P. J., R. P. ROSS, G. F. FITZGERALD u. C. STANTON (2004):
Bifidobacterium psychraerophilum sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov.,
 isolated from a porcine caecum
 Int. J. Syst. Bacteriol. 54, 401-406
- SLEATOR, R. D. u. C. Hill (2008):
 Bioengineered bugs- a patho-biotechnology approach to probiotic research and applications
 Medical Hypotheses 70, 167-169
- SODONI, I., A. LUKAS, M. N. OLIVEIRA, F. REMEUF u. G. CORRIEU (2002):
 Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell counts in
 fermented milk processing
 J. Dairy Sci. 85, 2479-2488
- SONOIKE, K., M. MADA u. M. MUTAI (1986):
 Selective agar medium for counting viable cells of bifidobacteria in fermented milk
 Shokuhin Eiseigaku Zasshi 27, Nr. 3, 238-244
- SOZZI, T. (1985):
 Culture de bifidobactéries résistantes à l'acide
 EPA 192986. Société des Produits Nestlé SA
- SOZZI, T., P. BRIGIDI, O. MIGNOT u. D. MATTEUZI (1990):
 Use of dicloxacillin for the isolation and counting of bifidobacteria from dairy products
 Lait 4, 357-361
- STACKEBRANDT, E. u. C. R. WOESE (1981):
 Towards a phylogeny of the actinomycetes and related organisms
 Curr. Microbiol. 5, 197-202

- TAKAHASHI, N., J.-Z. XIAO, K. MIYAI T. YAESHIIMA, A. HIRAMATSU, K. IWATSUKI, S. KOKUBO u. A. HOSONO (2004):
 Selection of acid tolerant bifidobacteria and evidence for a low-pH-inducible acid tolerance response in *Bifidobacterium longum*
 J. Dairy Res. 71, 340-345
- TAKAHASHI, T., T. OKA, H. IWANA, T. KUWATA u. Y. YAMAMOTO (1993):
 Immune response of mice to orally administered lactic acid bacteria
 Biosci. Biotech. Biochem. 57, 1557-1560
- TANAKA, R. u. M. MUTAI (1980):
 Improved medium for selective isolation and enumeration of *Bifidobacterium*
 Appl. Environ. Microbiol., 40, 866-869
- TANNOCK, G. W. (2004):
 Minireviews: A special fondness for Lactobacilli
 Appl. Environ. Microbiol. 70, Nr. 6, 3189-3194
- TERAGUCHI, S., M. UEHARA, K. OGASA u. T. MITSUOKA (1978):
 Enumeration of bifidobacteria in dairy products
 Nihon Saikingaku Zasshi 33, 753-761
- TERAGUCHI, S., T. KAWASHIMA u. M. KUBOYAMA (1982):
 Test tube method for counting bifidobacteria in commercial dairy and pharmaceutical bacterial products
 Shokuhin Eiseigaku Zasshi 23, Nr. 1, 39-44
- TERZAGHI, B. E. U. W. E. SNADINE (1975):
 Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages
 Appl. Microbiol. 29, Nr. 6, 807-813
- TESSEMA, D. A., R. ROSEN, R. PEDAZUR, S. BELKIN, J. GUN, I. EKELTCHIK u. O. LEV (2006):
 Freeze-drying of sol-gel encapsulated recombinant bioluminescent *E. coli* by using lyo-protectants
 Sensors Actuators B113, 768-773
- THARMARJA, N. u. N. P. SHAH (2003):
 Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*
 J. Dairy Sci. 86, 2288-2296

TISSIER, H. (1900):

Recherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourrisson

Thèse, Paris, 1-253, zit. nach EUZÉBY, J. P. (2006):

List of prokariotic names with standing in nomenclature

<http://www.bacterio.cict.fr>

TROVATELLI, L. D., F. CROCIANI, M. PEDINOTTI u. V. SCARDOVI (1974):

Bifidobacterium pullorum sp. nov.: a new species isolated from chicken feces and a related group of bifidobacteria isolated from rabbit feces

Arch. Microbiol. 98, 187-198

TUOHY, K. M., H. M. PROBERT, C. W. SMEJKAL u. G. R. GIBSON (2003):

Using probiotics and prebiotics to improve gut health

Drug Disc. Tod. 8, Nr. 15, 692-700

TYÖPÖNEN, S., E. PETÄJÄ u. T. MATTILA-SANDHOLM (2003):

Bioprotectives and probiotics for dry sausages

Int. J. Food Microbiol. 83, 233-244

UKENA, S. N., A. M. WESTENDORF, W. HANSEN, M. ROHDE, R. GEFFERS, S.

COLDEWEY, S. SUERBAUM, J. BUER u. F. GUNZER (2005):

The host response to the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917: specific up-regulation to the proinflammatory chemokine MCP-1

BMC Medical Genetics 6, 43

VALET, G. (2007):

Die Durchflußzytometrie im Wandel der Forschungskonzepte

In: SACK, U., A. TARNOK u. G. ROTHE (Hrsg.) (2007): Zelluläre Diagnostik

Karger Verlag, Basel u. Freiburg, 1-26

VAN DER WEIL-KORSTANJE, J. A. A. U. J. C. WINKLER (1970):

Method for differential count of the anaerobic flora in human faeces

Appl. Microbiol. 20, Nr. 1, 168-169

VAN NIEL, C. W., C. FEUDTNER, M. M. GARRISON u. D.A. CHRISTAKIS (2002):

Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis

Pediatrics 109, Nr.4, 678-684

VANDENBERGH, P. A. (1993):

Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth

FEMS Microbiol. Rev. 12, 221-238

VAUGHAN, E. E. (1999):

Probiotics in the new millennium

Nahrung 43, 148-153

- VAUGHAN, E. E., M. C. DE VRIES, E. G. ZOETENDAL, K. BEN AMOR, A. D. L. AKKERMANS u. W. M. DE VOS (2002):
The intestinal LABs
Antonie van Leeuwenkoek 82, 341-352
- VAUGHAN, E. E., H. G. H. J. HEILIG, K. BEN-AMOR u. W. M. DE VOS (2005):
Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches
Fed. Europ. Microbiol. Soc. 29, 477-490
- VENTLING, B. L. u. V. V. MISTRY (1993):
Growth characteristics of bifidobacteria in ultrafiltered milk
J. Dairy Sci. 76, 962-971
- VESCOVO, M., S. TORRIANI, G. SCOLARI u. L. M. T. DICKS (1995):
Lactobacillus casei and related species: a review
Ann. Microbiol. Enzimol. 45, 51-83
- VIRTA, M., S. LINERI, P. KANKAANPÄÄ, M. KARP, K. PELTONEN, J. NUUTILA u. E.-M. LILIUS (1998):
Determination of complement-mediated killing of bacteria by viability staining and bioluminescence
Appl. Environ. Microbiol. 64, Nr. 2, 515-519
- VON HUNGER, W. (1986):
Äsculin-Cellobiose-Agar für die Keimzahlbestimmung von *Lactobacillus acidophilus*
Milchwissenschaft 41, Nr. 5, 283-285
- WALLNER, G., R. ERHART u. R. AMANN (1995):
Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes
Appl. Environ. Microbiol. 61, Nr. 5, 1895-1866
- WATABE, J., Y. BENNO u. T. MITSUOKA (1983):
Bifidobacterium gallinarum sp. nov.: a new species isolated from the ceca of chickens
Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 127-132
- WIJSMAN, M. R., J. L. P. M. HEREIJGERS u. J. M. F. H. DE GROOTE (1989):
Selective enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products
Neth. Milk Dairy J. 43, 395-405
- WILLIAMS, G. B., J. C. WEAVER u. A. L. DEMAIN (1990):
Rapid microbial detection and enumeration using gel microdroplets and colorimetric or fluorescence indicator systems
J. Clin. Microbiol. 28, Nr. 5, 1002-1008

- YAESHIMA, T., T. FUJISAWA u. T. MITSUOKA (1991):
Differential characteristics of *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium animalis*
Syst. Appl. Microbiol. 14, 169-172
- YAESHIMA, T., T. FUJISAWA u. T. MITSUOKA (1992):
Bifidobacterium globosum, subjective synonym of *Bifidobacterium pseudolongum*, and
description of *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *pseudolongum* comb. nov. and
Bifidobacterium pseudolongum subsp. *globosum* comb. nov.
Syst. Appl. Microbiol. 15, 380-385
- YASUI, H., N. NAGAOKA, A. MIKE, K. HAYAKAWA u. M. OHWAKI (1992):
Detection of Bifidobacterium strains that induce large quantities of IgA
Microbiol. Ecol. Health Dis. 5, 155-162
- YU, J., J. LIN, W. H. BENJAMIN, Jr., K. B. WAITES, C.-h. LEE u. M. H. NAHM
(2005):
Rapid multiplex assay for serotyping pneumococci with monoclonal and polyclonal
antibodies
J. Clin. Microbiol., 43, Nr. 1, 156-162
- ZACCONI, C., G. L. SCOLARI u. A. REBECCHI (1990):
XXIII Int. Dairy Congr. 1, 201
- ZHU, L., W. LI u. X. DONG (2003):
Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences and
proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* subsp. nov.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 1619-1623
- ZUBKOV, M.V., B.M. FUCHS, H. EILERS, P.H. BURKILL u. R. AMANN (1999):
Determination of total protein content of bacterial cells by SYPRO staining and flow
cytometry
Appl. Environ. Microbiol. 6, Nr. 7, 3261-3257
- ZŮŇINGA, M., I. PARDO u. S. FERRER (1993):
An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative
lactic acid bacteria
Int. J. Food Microbiol. 18, 37-42

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Günter Klein danke ich für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die wissenschaftliche Betreuung und Förderung sowie die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung meiner Dissertation.

Frau Dr. Christine Bonaparte gilt mein herzlicher Dank für die wahrhaft unermüdliche Geduld und immer freundliche Hilfsbereitschaft bei der Betreuung und für das Einführen in das wissenschaftliche Arbeiten und Schreiben. Ohne Sie hätte ich niemals die „Bifs“ lieben gelernt!

Herrn Dr. Matthias Upmann gilt mein Dank für Transferdienste, das jederzeit offene Ohr, die Anregungen und Hilfestellungen beim Anfertigen der Dissertation und im fachlichen Alltag.

Der tierärztlichen Belegschaft des Doktorandenzimmers Dr. Valérie Lusch, Annika Boulaaba und Christiane Rüben danke ich für die schönen gemeinsamen Jahre (!) sowie für die Korrektur der Arbeit. Meiner Kollegin Dr. Asmien Brix und Manfred Merle gilt zusätzlich besonderer Dank für angewandte Formatierungskünste.

Herrn Dr. Nils Grabowski sei gedankt für die Unterstützung beim Erstellen der Summary.

Frau Dr. Astrid Sulzer gilt mein Dank für das Heranführen an das Mysterium FACS.

Frau Sigrid Kirchsclager-Heine und Frau Susanne Mock danke ich für die Einarbeitung im Labor und die Hilfe bei mikrobiologischen Fragen.

Besonderer Dank gilt der Immunologie in Form von Herrn Dr. Schubert für die zahlreichen fachlichen Ratschläge und Hilfestellungen bei allen FACS-Themen. Ebenso bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Angelika Fischer, Frau Dr. Eva Siffrin und Sonja Meyer für das Näherbringen der Auswertungsprogramme und Beistand bei FACS-Versagen.

Fine HermaNess danke ich für das jederzeit gutgelaunt Da-Sein, die Geduld bei zeitlichen Diskrepanzen, das Neutralisieren von Missstimmungen und die unersetzlichen gemeinsamen Bewegungseinheiten.

DANKSAGUNG

Meinen Eltern, Großeltern und Geschwistern danke ich, dass sie immer an den glücklichen Ausgang der Mission geglaubt haben.

Meinem Mann Wolfram danke ich für die Nach- und Durchsicht bei Milchmädchen-Rechnungen und anderen promotionsbedingten Herausforderungen.

Ohne Dich wäre alles Nichts.

ISBN 978-3-939902-71-3



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
e-mail: Geschaeftsstelle@dvg.net · Homepage: <http://www.dvg.net>**