

# Den Bakterien auf der Spur

## Marker-gestützte Detektion von Silagebakterien

Die Silierung mit Hilfe ausgewählter Milchsäurebakterien ist ein weitverbreitetes Verfahren. In der Praxis wird die Silierung häufig durch die Verwendung kommerzieller oder selbsterzeugter Starterkulturen unterstützt. Zur Entwicklung neuer Produktionsverfahren für Starterkulturen werden diagnostische Nachweisverfahren zur Detektion der beteiligten Bakterienarten benötigt. Die Anwendung molekulargenetischer Techniken bietet hierbei eine Alternative zu den klassischen, häufig zeitaufwändigen mikrobiologischen Methoden. Exemplarisch wurde ein artspezifisches Assay zum Nachweis häufig verwendeter Milchsäurebakterien auf der Basis der 16S rDNA entwickelt.

Dr. Michael Klocke, Dipl.-Ing. (FH) Alica Knapik und Kerstin Mundt sind Mitarbeiter der Abteilung Bioverfahrenstechnik am Institut für Agrartechnik Bornim e. V. (Wiss. Direktor: Prof. Dr. J. Zasko), Max-Eyth-Allee 100, 14469 Potsdam; e-mail: [mklocke@atb-potsdam.de](mailto:mklocke@atb-potsdam.de)  
 Referierter Beitrag der **LANDTECHNIK**, die Langfassung finden Sie unter **LANDTECHNIK-NET.com**.

### Schlüsselwörter

Silage, Milchsäurebakterien, Lactobacillus, PCR-Assay, 16S rDNA Analyse

### Keywords

Silage, lactic acid bacteria, Lactobacillus, PCR assay, 16SrDNA analysis

### Literatur

Literaturhinweise sind unter LT 04603 über Internet <http://www.landwirtschaftsverlag.com/landtech/lo-cal/literatur.htm> abrufbar.

Die Konservierung von Futtermitteln unter Verwendung von Milchsäurebakterien (Silierung) ist ein weit verbreitetes Verfahren in der Landwirtschaft. In der Praxis wird dieser Prozess durch die gezielte Anwendung speziell ausgewählter Bakterienstämme unterstützt, welche in Form von Flüssigkulturen oder gefriergetrockneten Präparaten direkt zu dem Siliergut hinzugegeben werden [1, 2, 3]. Eine Reihe entsprechender Präparate sind kommerziell verfügbar, ebenso existieren Methoden zur kostengünstigeren, hofeigenen Erzeugung solcher Bakterienkulturen [4]. Für diesen Zweck werden neben *Pediococcus* und *Enterococcus* Arten häufig verschiedene *Lactobacillus* Arten verwendet, vorrangig speziell ausgewählte Stämme der Arten *Lact. plantarum*, *Lact. rhamnosus* und *Lact. buchneri*.

Für die Entwicklung neuer bioverfahrenstechnischer Lösungen zur Herstellung solcher Präparate ist eine zuverlässige und robuste Diagnostik dieser Bakterienarten erforderlich. Klassische Verfahren stoßen hierbei häufig an ihre Grenzen, da es sich um relativ eng miteinander verwandte Arten handelt [5]. So besitzt die Gruppe der Milchsäurebakterien generell nur relativ wenige morphologische Merkmale (Zellform, Form von Zellverbänden), welche sich mit Hilfe

von mikroskopischen Techniken unterscheiden lassen. Zur genaueren Artbestimmung wird daher häufig eine Charakterisierung des zellulären Stoffwechsels vorgenommen (Säuerungsverhalten, Kohlenhydratverwertungsspektrum). Diese Methoden haben allerdings den Nachteil, dass sie nur mit verhältnismäßig hohem Arbeits- und Zeitaufwand umsetzbar sind.

Seit Anfang der 90er Jahre wurden daher Methoden entwickelt, (Mikro-) Organismen anhand ihrer Erbinformation, also ihrer chromosomalen DNA, zu identifizieren. Der molekulare Aufbau der chromosomalen DNA, die DNA-Sequenz, ist für jedes Individuum individuell und, im Unterschied zu morphologischen und physiologischen Eigenschaften, keiner Umweltvarianz unterworfen. Durch die Bestimmung der DNA-Sequenz ist daher eine absolute Zuordnung zu taxonomischen Gruppen bis hin zu einer genauen Analyse der verwandtschaftlichen Beziehung von Stämmen einer Art möglich.

Praktisch ist es häufig ausreichend, nur die DNA-Sequenz eines bestimmten chromosomalen Bereiches mit einer genügend hohen Variabilität zu bestimmen. Als international gebräuchlicher Standard hat sich hierfür die bei allen Bakterien vorkommende 16S rDNA Sequenz etabliert, welche die Riboso-

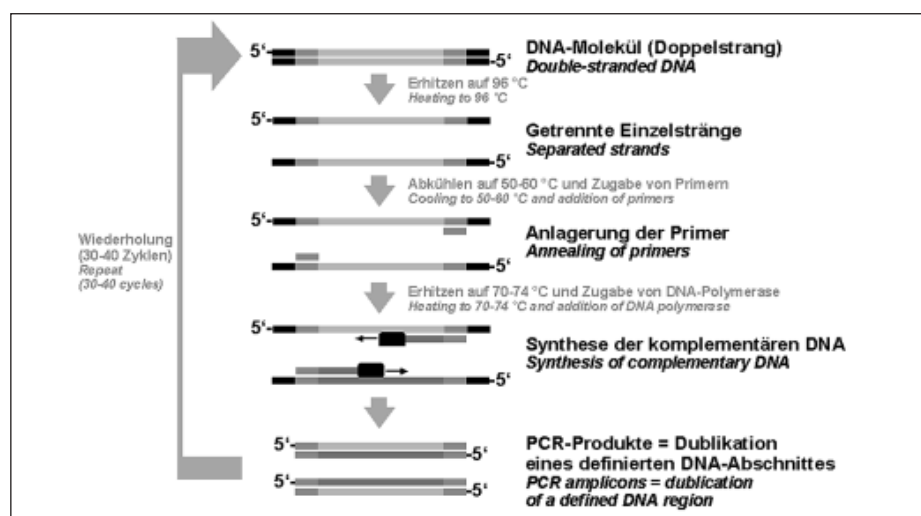


Bild 1: Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion (Abk. PCR) [8]

Fig. 1: Scheme of the polymerase chain reaction (PCR) [8]

men (= Bestandteil des zellulären Protein-synthese-Apparates) kodiert. Mittlerweile konnten für eine Vielzahl von Bakterienarten deren 16S rDNA Sequenz ermittelt werden [URL: <http://rdp.cme.msu.edu/html/>] [6].

Für den Nachweis einzelner Bakterienarten werden gezielt artspezifische Bereiche der 16S rDNA ausgewählt. Mittels einer enzymatischen Reaktion in vitro, der Polymerase-Kettenreaktion (Abk. PCR, Bild 1), kann dann der DNA-Bereich zwischen diesen artspezifischen Bereichen solange vermehrt werden, bis eine DNA-Menge erreicht wird, welche sich leicht optisch nachweisen lässt. Durch eine geschickte Wahl der Startpunkte für die PCR innerhalb der 16S rDNA können zudem PCR-Produkte mit verschiedener Länge erzeugt werden, wodurch die Unterscheidung verschiedener Bakterienarten in einer einzigen Reaktion möglich wird [7].

### Entwicklung eines PCR-Assays zum Nachweis gebräuchlicher Silagebakterien

Voraussetzung für eine PCR ist die Entwicklung von kurzen DNA-Fragmenten, den PCR-Primern, welche komplementär zu den gewünschten Startpunkten sind (Bild 1 und 2). Für den Nachweis der Silagebakterien *Lact. plantarum*, *Lact. rhamnosus* sowie *Lact. buchneri* wurden dazu basierend auf Datenbanksequenzen computergestützt variable Regionen der 16S rDNA ausgewählt (Bild 2), anhand welcher verschiedene, jeweils artspezifische Primerpaare für die PCR abgeleitet wurden. Durch die Kombination dieser Primer sollten abhängig von der jeweiligen DNA verschieden lange PCR-Produkte gebildet werden: ein 979 Basenpaar (Abk. bp) langes Produkt im Falle der Anwesenheit von *Lact. rhamnosus* DNA, ein

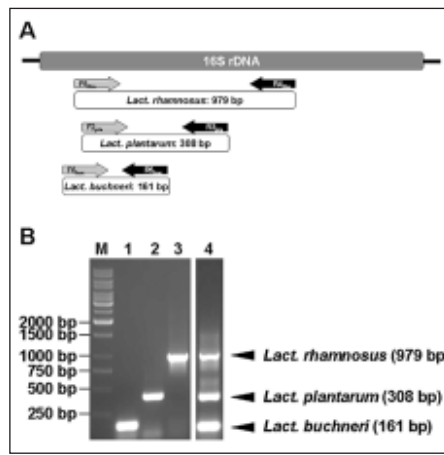


Bild 3: System zum Nachweis der Silagebakterien *Lact. plantarum*, *Lact. rhamnosus* und *Lact. buchneri* auf Basis der 16S rDNA Sequenz. (A) Schematische Darstellung der Produktbildung im Zuge der PCR. (B) Anwendung der PCR-Primer unter Verwendung von DNA-Präparationen von *Lact. buchneri* DSMZ-20057 (1), *Lact. plantarum* DSMZ-20205 (2) und *Lact. rhamnosus* DSMZ-20022 (3) sowie einer Mischung von allen drei DNA-Präparationen (4); M bezeichnet einen Längenstandard.

Fig. 3: System for detecting the ensiling bacteria *Lact. plantarum*, *Lact. rhamnosus* and *Lact. buchneri* based on the sequence of the 16S rDNA. (A) Pattern of the theoretical PCR production. (B) Application of the derived PCR primers using DNA preparations of the strains *Lact. buchneri* DSMZ-20057 (1), *Lact. plantarum* DSMZ-20205 (2) and *Lact. rhamnosus* DSMZ-20022 (3) and a mixture of all DNA preparations (4); M marks a length standard.

308 bp langes Produkt bei Vorliegen von *Lact. plantarum* DNA sowie ein 161 bp kurzes Produkt bei Anwesenheit von *Lact. buchneri* DNA (Bild 3A).

In der Anwendung dieser Primer-Kombinationen auf Referenzstämmen der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig (Abk. DSZM) konnten die theoretisch abgeleiteten Fragmentgrößen experimentell bestätigt werden (Bild 3B). Die PCR-Produkte waren klar

voneinander zu unterscheiden, Nebenprodukte oder Fehlpaarungen traten nicht auf. Die PCR-Primer lieferten dieselben PCR-Produkte ebenfalls bei der Anwendung auf gemischte DNA-Proben.

### Fazit

Die Identifizierung von Mikroorganismen mit Hilfe eines 16S rDNA basierten PCR-Assays ermöglicht einen wesentlich schnelleren und zuverlässigeren Nachweis einzelner Mikroorganismen als bei Anwendung konventioneller mikrobiologischer Techniken. Klassische Techniken erfordern häufig Kultivierungsschritte (etwa auf Selektivmedien), wodurch sich die Bearbeitungszeit häufig auf mehrere Tage ausdehnt. Zudem lassen klassische Techniken im Falle der Milchsäurebakterien aufgrund der teilweise nur geringen phänotypischen Varianz zwischen den Arten oftmals keine eindeutige Artbestimmung zu. Im Unterschied hierzu beruht eine PCR-gestützte Methode nicht auf dem Nachweis lebender Zellen, sondern ausschließlich auf dem Nachweis der bakteriellen DNA. Der Nachweis von ausgewählten Bakterien ist so innerhalb von drei bis fünf Stunden (abhängig von der Art der DNA-Präparation) möglich. So können erstmals zeitnahe Analysen durchgeführt werden, wie sie etwa im Zuge der Prozesskontrolle von Starterkulturen erforderlich sind. Durch die parallele Detektion mehrerer Bakterienarten in einem Assay können zudem erstmals Co-Fermentationen verschiedener Bakterienarten direkt verfolgt werden. Dieses ermöglicht die Entwicklung von neuen und kostengünstigeren Produktionsverfahren für Starterkulturen [9].

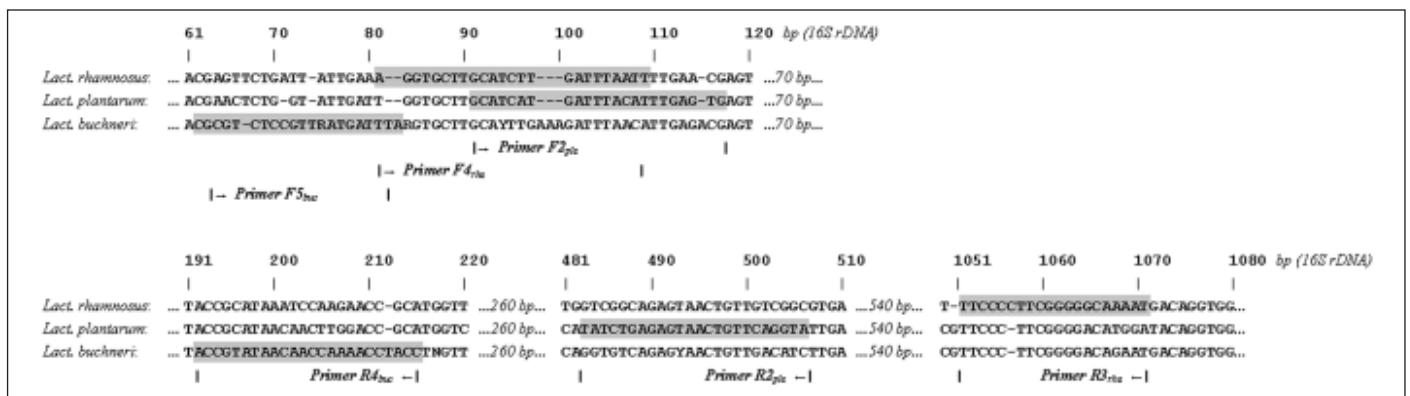


Bild 2: In silico Ableitung von artspezifischen PCR-Primern für *Lact. plantarum*, *Lact. rhamnosus* und *Lact. buchneri* anhand von Datenbank-Sequenzen. Dargestellt sind Consensus-Sequenzen, welche für jede Art aus mindestens zwei individuellen 16S rDNA Sequenzen entwickelt wurden. Komplementäre Bereiche zu den PCR-Primern sind grau unterlegt.

Fig. 2: In silico development of species-specific PCR primers for *Lact. plantarum*, *Lact. rhamnosus* and *Lact. buchneri* based on databank sequences. For this alignment, consensus sequences derived from at least two individual 16S rDNA sequences were used. The primer binding sites are highlighted in grey.