

5 DISKUSSION

5.1 Methodische Erkenntnisse zur Speziesidentifizierung mit Gensonden

Die über das Internet zugänglichen Datenbanken des *NCBI* (**N**ational **C**enter for **B**iotechnology **I**nformation), des *RDP* (**R**ibosomal **D**atabase **P**roject) sowie des *Whitehead Institute for Biomedical Research* erwiesen sich im Verlauf der durchgeführten Untersuchungen als geeignete Grundlagen zur Entwicklung von Gensonden. In den internationalen Datenbanken werden ständig aktualisierte und ergänzte Sequenzierungsergebnisse hinterlegt. Ein Datenaustausch bzw. -vergleich zwischen diesen Institutionen erfolgt auf täglicher Basis (GREEN et al., 1997). Die der Entwicklung von Gensonden zugrunde gelegte Struktur von Sequenzierungen untersuchter Stämme erscheint dabei gewährleistet. Auch andere Autoren bedienten sich dieses Verfahrens der Nutzung von Datenbanken (TANNOCK et al., 1999; CHEN et al., 2000; WALTER et al., 2000).

Die Synthese der Gensonden wurde von der MWG Biotech AG, Ebersberg, durchgeführt, wobei vom Zeitpunkt der Auftragserteilung bis zur Lieferung durchschnittlich 3 Werkzeuge erforderlich waren. Der erforderliche Zeitrahmen für die Synthese von Gensonden durch spezialisierte Biotechnologie-Dienstleistungsunternehmen erscheint auch im Hinblick auf die Anwendung in der Routinediagnostik als durchaus akzeptabel. Zudem reichten die im µg-Maßstab gelieferten Gensonden-Lyophilisate für eine große Anzahl von Hybridisierungsansätzen, da sich die gebräuchlichen Sondenkonzentrationen im Nanogramm-Bereich bewegen.

Die *L. acidophilus*-spezifische Sonde war zunächst nur mit eindeutig der Spezies *L. acidophilus* zuzuordnenden Stämmen geprüft worden. Der gelungene Nachweis dieser Stämme stellte zugleich eine Überprüfung der eingesetzten Pufferlösungen und Reagenzien dar. Die anderen Gensonden wurden nachfolgend ebenfalls zunächst nur mit einer eingeschränkten Anzahl von Stämmen geprüft. In diese Vorversuche wurden überwiegend Kultursammlungs- und Referenzstämme einbezogen, deren Identifizierung bereits im Vorfeld gesichert war, und zwar durch eigene Überprüfung bzw. andere Autoren (PACK, 1997; KLEIN, 1998).

Erst nach Optimierung der Hybridisierungsbedingungen erfolgte der Versuchsansatz mit allen zu prüfenden Stämmen. Insbesondere bei der *L. gasseri*-Sonde mußten mehrere Vorversuche zur Ermittlung der geeigneten Hybridisierungstemperatur

durchgeführt werden, da falsch-positive Reaktionen mit anderen *Lactobacillus*-Spezies auftraten. Spezifitätsprobleme in Form von Kreuzreaktionen traten außer bei der *L. gasseri*-Sonde auch bei der *L. zeae*- und *L. paracasei*-Sonde auf. Diese konnten nur durch die Hybridisierung mit jeweils einer zweiten Sonde (Ausschlußsonde) gelöst werden. Im Falle der *L. zeae*-Sonde unterstützte die positive Hybridisierungsreaktion mit dem *L. casei*-Typstamm (ATCC 393^T) das gegenwärtig vorgeschlagene neue Spezies-Konzept in der *L. casei*-Gruppe (DICKS et al., 1996). Sie kann somit als durchaus erwünschte Kreuzreaktion gewertet werden. Falsch-positive oder -negative Reaktionen sind unter Berücksichtigung früherer Identifizierungen der gleichen Stämme sowie bei den mitgeführten Kultursammlungs- und Referenzstämmen, deren Identifizierung als sicher gilt, nicht aufgetreten. Lediglich die Einstufung der mitgeführten *L. casei*-Stämme bereitete Schwierigkeiten und verdeutlicht die gegenwärtigen taxonomischen Unklarheiten in dieser Gruppe.

Die Anzahl der in die Hauptversuche einbezogenen Stämme zur Prüfung der Sonden aus der *L. acidophilus*-Gruppe (*L. acidophilus*-, *L. gasseri*- sowie *L. johnsonii*-Sonde), deren DNA auf jeweils einen Nitrozellulosefilter aufgetragen wurde, belief sich auf 66 Isolate. Für die Validierung der Sonden der *L. casei*-Gruppe (*L. zeae*-, *L. paracasei*- sowie *L. rhamnosus*-Sonde) wurde für jeden Versuchsansatz die DNA von 47 Stämmen eingesetzt. Das Dot Blot-Hybridisierungsverfahren unter Verwendung einer Blotting-Apparatur im Mikrotiter-Format ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung von bis zu 96 Bakterienstämmen pro Hybridisierungsansatz. Es bietet somit die Möglichkeit des direkten Vergleiches aller zu prüfenden Stämme.

Jede Sonde wurde im Rahmen dieser Versuchsansätze mehrfach geprüft. Dabei wurden jeweils zum Erstansatz identische Hybridisierungsergebnisse erzielt und somit wiederholbare Resultate erzielt. Lediglich geringfügige Abstufungen der Farbtensitäten einzelner Dot Blots traten auf, die jedoch hinsichtlich der Auswertung der erzielten Ergebnisse unbedeutend sind, da schwache Reaktionen gleichwohl als positives Hybridisierungssignal zu werten sind. Auch im Rahmen der Vorversuche bei der Ermittlung standardisierter Parameter (Nährmedien, Inkubationszeiten, Pufferlösungen) war die „Wiederholbarkeit“ der Hybridisierungsergebnisse festzustellen.

Im Hinblick auf die „Vergleichbarkeit“ der durchgeführten Hybridisierungsversuche zeigte sich, daß die Bearbeitung der zu prüfenden *Lactobacillus*-Stämme durch

unterschiedliches Laborpersonal keinerlei Einfluß auf die erzielten Ergebnisse hatte. Insgesamt waren drei einschlägig erfahrene Mitarbeiter bei der Aufarbeitung der Proben eingesetzt. Dies bedeutet keine Vergleichbarkeit im engeren Sinne, da die Untersuchungen nicht in verschiedenen Laboratorien durchgeführt werden konnten. Auch bei anderen Autoren/Arbeitsgruppen ergab die Prüfung von Referenzstämmen mit identischen Gensonden keine Abweichungen hinsichtlich der Hybridisierungsreaktionen (POT et al., 1993; XANTHOPOULOS et al., 1999; ROY et al., 2000).

Ein Vergleich der mittels Gensondentechnik vorgenommenen Identifizierungen von Stämmen mit einigen zur Verfügung stehenden phänotypischen und genotypischen Kennzeichen der gleichen Stämme (REUTER, 1964; PIEHL, 1995; PACK, 1997, KLEIN, 1998) erbrachte weitgehend übereinstimmende Spezies-Zuordnungen und zeigt, daß die Gensondentechnik für die Identifizierung von Laktobazillen auf Spezies-Ebene geeignet ist.

Die von PACK (1997) beschriebene Schwierigkeit der Differenzierung zwischen *L. gasseri*- und *L. johnsonii*-Stämmen mittels Proteinfingerprinting konnte im Rahmen der durchgeführten Hybridisierungen zunächst bestätigt werden. Die sichere Zuordnung konnte erst durch den Einsatz zweier paralleler Gensonden vorgenommen werden.

Für die Synthese einer *L. gasseri*-Sonde war eine andere Vorgehensweise erforderlich, da die bisher angewandte Methodik Kreuzreaktionen mit mehreren anderen *Lactobacillus*-Spezies ergab. Das abgewandelte Verfahren bestand in einer partiellen Sequenzierung des 1960 von REUTER aus Faeces isolierten *L. gasseri*-Stammes F 164 (ATCC 19992; DSM 20077). Die von der MWG Biotech AG, Ebersberg, als Auftragsarbeit durchgeführte Sequenzanalyse ermöglichte dann die Auswahl zweier spezifischer Primer, die für die Amplifikation eines spezifischen Basensequenzabschnittes des Stammes F 164 eingesetzt wurden und die Herstellung einer Sonde mit der PCR-Amplifikation ermöglichten.

Obwohl die Entwicklung einer *L. crispatus*-Sonde nach dem in Kap. 3.2.5. beschriebenen Vorgehen auch möglich erschien, konnte die Herstellung und Prüfung aus arbeitstechnischen Gründen nicht mehr durchgeführt werden. Eine BLAST-Sequenzanalyse hatte nämlich zwei Sequenzabschnitte aufgezeigt, die als Gensonde zur Differenzierung von *L. crispatus* und *L. gasseri* als geeignet erschienen. In Anbetracht der besonderen Bedeutung dieser bei Mensch und Tier

autochthonen Spezies und aufgrund der sich äußerst schwierig gestaltenden Abgrenzung derselben durch phänotypische Methoden sollte dieses Anliegen in weiterführenden Untersuchungen weiter verfolgt werden. Hinsichtlich einer biotechnologischen Anwendung ist die Spezies *L. crispatus* bislang ohne besondere Bedeutung.

Ribosomale RNA-Sequenzen sind im Gegensatz zu anderen Sequenzen in jeder Zelle in einer deutlich höheren Anzahl von Kopien vorhanden (HERTEL et al., 1991; AMANN et al., 1994). Durch die gezielte RNA-Extraktion anstelle der Isolierung der gesamten genomischen DNA wäre eine Verkürzung der Hybridisierungsdauer zu erwarten, da die Zielsequenz für die jeweilige Gensonde in größerer Menge vorhanden ist (AMANN et al., 1995). Eine weitere Beschleunigung des Nachweises mit Gensonden ist von der Reverse Dot Blot-Hybridisierungstechnik (EHRMANN et al., 1994) zu erwarten, bei der eine Kultivierung der nachzuweisenden Bakterien nicht erforderlich ist, und das jeweilige Zielgen durch spezifische Primer vor der Hybridisierung amplifiziert wird und dadurch lediglich kurze Hybridisierungszeiten (2 bis 4h) erforderlich sind.

Die primäre Zielstellung der vorliegenden Arbeit lag jedoch in der *Entwicklung* von Gensonden; der Aspekt des notwendigen Zeitaufwandes für die Hybridisierungen kann in weiteren Arbeiten berücksichtigt werden. Zudem sind Hybridisierungs-Assays unter Verwendung von genomischer DNA weniger störanfällig, da die genomische DNA wesentlich stabiler ist als ribosomale RNA (ANDERSON, 1995). Dies liegt in der Tatsache begründet, daß rRNAsen ubiquitär vorkommen und stabiler sind als DNAsen.

Der stetig zunehmende biotechnologische Einsatz von Bakterienkulturen im Bereich der Lebensmittelindustrie sowie der Einsatz als Futtermittelzusatzstoffe und als pharmazeutische Präparate verlangen die gesicherte Identität der verwendeten Mikroorganismen. Kostengünstige Nachweismethoden mit möglichst geringem Arbeitsaufwand sind von REUTER et al. (2000a) für verschiedene phäno- und genotypische Identifizierungsmethoden aufgeführt worden. Sie ermöglichen die Auswahl eines für die jeweilige Zielstellung geeigneten Untersuchungsverfahrens, Gensonden eingeschlossen (s. Anhangstab. 6).

Obgleich Gensonden zur Identifizierung von Laktobazillen schon eingesetzt worden sind (PETRICK et al., 1988; HERTEL et al., 1991; HENSIEK et al., 1992), ist die

routinemäßige Anwendung aller bisher beschriebenen Techniken im Lebensmittelbereich bislang noch nicht beschrieben worden.

5.2 Identifizierung von Laktobazillen mit Gensonden

5.2.1 Referenz- und Sammlungsstämme aus der *L. acidophilus*-Gruppe

Der *L. acidophilus*-Typstamm (ATCC 4356^T), der als Referenzstamm die Grundlage der Etablierung der Spezies *L. acidophilus* darstellt, erbrachte bereits im Rahmen der Vorversuche mit der *L. acidophilus*-spezifischen Sonde ein positives Hybridisierungssignal und bestätigt die in früheren Untersuchungen (REUTER, 1964; PIEHL, 1995; PACK, 1997; KLEIN, 1998) mittels phänotypischer Untersuchungen, RAPD-PCR und Proteinfingerprinting vorgenommene Identifizierung als *L. acidophilus*. Der bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, hinterlegte *L. acidophilus*-Typstamm (DSM 20079^T) sowie fünf weitere *L. acidophilus*-Kultursammlungsstämme konnten von HENSIEK et al. (1992) ebenfalls mit einer 16S rRNA-Sonde zuverlässig identifiziert werden. Als weitere Referenzstämme wurden die als Biotyp IV resp. I (REUTER, 1964) eingestuft Kultursammlungsstämme ATCC 314 und ATCC 4796 mitgeführt, die ebenfalls ein positives Hybridisierungssignal erbrachten und somit als *L. acidophilus* identifiziert werden konnten. In Hybridisierungsversuchen anderer Autoren wurden sowohl der Typstamm (ATCC 4356^T / DSM 20079^T) als auch die Stämme ATCC 314 und ATCC 4796 mit 23S rRNA zielgerichteten Sonden als *L. acidophilus* identifiziert (POT et al., 1993; ROY et al., 2000). Die von POT et al. (1993) entwickelte *L. acidophilus*-Sonde wurde auch in Untersuchungen von XANTHOPOULOS et al. (1999) eingesetzt und ermöglichte den Nachweis des *L. acidophilus*-Typstamms. Der Stamm ATCC 314 wurde auch von PIEHL (1995) mit der RAPD-PCR untersucht und zeigte unter Verwendung eines spezifischen Primers zum *L. acidophilus*-Typstamm identische Bandenmuster und ermöglichte somit ebenfalls die Identifizierung als *L. acidophilus*.

Die Entwicklung der *L. gasseri*-Sonde nach der in Kap. 3.2.5 beschriebenen Vorgehensweise führte zu unspezifischen Ergebnissen, so daß zur Erfassung aller mitgeführten *L. gasseri*-Stämme eine Polynukleotid-Sonde hergestellt wurde (siehe Kap. 3.2.5.1). Neben dem *L. gasseri*-Typstamm (DSM 20243^T) wurde erwartungsgemäß auch der im Rahmen mikroökologischer Untersuchungen im Jahre 1960

isolierte Stamm F 164 (LERCHE und REUTER, 1962) von der Sonde erfaßt, denn dieser stellte, wie weiter oben beschrieben, die Sequenzgrundlage für die Entwicklung der *L. gasseri*-Sonde dar. Zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Stammsammlung des Institutes wurde dieser Stamm als *L. acidophilus* Biotyp I geführt. Es kann davon ausgegangen werden, daß *L. acidophilus* Biotyp I bei frischen Isolaten von Menschen im Grunde die erst später beschriebene Spezies *L. gasseri* oder in Ausnahmen *L. crispatus* darstellt (pers. Mitteilung, REUTER, 2001). Biotyp II entspricht der ebenfalls erst später beschriebenen Spezies *L. johnsonii* (selten auch *L. acidophilus*), während Stämme des Biotyp III der Spezies *L. acidophilus* sensu stricto angehören, wobei aber auch *L. crispatus* und *L. johnsonii* das für diesen Biotyp kennzeichnende Fermentationsmuster aufweisen können (pers. Mitteilung, REUTER, 2001). Der Stamm F 164 wurde später von FUJISAWA et al. (1992) mit der Untersuchung der DNA-DNA-Homologie als *L. gasseri* bestätigt. Er war bereits 1964 als Referenzstamm in die Kultursammlungen der American Type Culture Collection (ATCC) und nachfolgend der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) unter der Bezeichnung ATCC 19992 bzw. DSM 20077 aufgenommen worden. Dieser Stamm war in früheren Untersuchungen bereits mitgeführt worden und konnte z.B. mit dem Proteinfingerprinting als *L. gasseri* identifiziert werden (PACK, 1997). PIEHL (1995) konnte hingegen mit der RAPD-PCR-Methode keine Typgruppen-spezifischen Amplifikate bei diesem Stamm ermitteln, welche die Identifizierung als *L. gasseri* zugelassen hätten. Hingegen war die Identifizierung des *L. gasseri*-Typstammes (DSMZ 20243^T) in allen RAPD-PCR-Versuchsansätzen möglich (PIEHL, 1995). Dies gelang auch POT et al. (1993), die den Typstamm mit einer *L. gasseri*-spezifischen 23S rRNA-zielgerichteten Sonde sicher erfassen konnten. XANTHOPOULOS et al. (1999) setzten diese Sonde ebenfalls zur Identifizierung des *L. gasseri*-Typstammes (DSMZ 20243^T) erfolgreich ein. Von ROY et al. (2000) konnten sowohl der *L. gasseri*-Typstamm als auch der Stamm ATCC 19992 bzw. DSM 20077 mit einer *L. gasseri*-spezifischen, ebenfalls auf die 23S rRNA zielgerichteten Sonde identifiziert werden. Dies verdeutlicht einerseits die Tatsache, daß die Identifizierung von Bakterienstämmen mit identischen Sonden auch durch verschiedene Arbeitsgruppen gelingt, und zum anderen, daß eine Spezies-Zuordnung von Laktobazillen auch durch unterschiedliche Sonden möglich ist.

Für 5 Kultursammlungsstämmen der CCUG (Culture Collection University of Göteborg), die alle klinischen Ursprungs waren, ergab die Hybridisierung mit der *L. gasseri*-Sonde ebenfalls eine positive Reaktion. Diese Stämme, die alle dem Biotyp I zugeordnet worden waren, zeigten in den Untersuchungen von PIEHL (1995) im Bereich von 820 bp ein für die Spezies *L. gasseri* kennzeichnendes Amplifikat. Diese Identifizierungen konnten mit der eingesetzten *L. gasseri*-Sonde bestätigt werden.

Zusätzlich zu den *L. gasseri*-Stämmen erfaßte die *L. gasseri*-Sonde sämtliche mitgeführten *L. johnsonii*-Stämme, die jedoch durch die Hybridisierung mit der *L. johnsonii*-spezifischen Sonde von den *L. gasseri*-Stämmen abgegrenzt werden konnten. Die Zielsequenz der *L. gasseri*-Sonde war demnach auch bei den untersuchten *L. johnsonii*-Stämmen in großen Teilen vorhanden und ermöglichte die stabile Bildung eines Heteroduplexes zwischen Gensonde und den zumindest weitgehend komplementären 16S rRNA-Sequenzabschnitten mitgeführter *L. johnsonii*-Isolate und somit ein positives Hybridisierungssignal. Diese Kreuzreaktion konnte durch stringenter Hybridisierungsbedingungen, d.h. durch Erhöhung der Hybridisierungstemperatur, nicht unterdrückt werden und deutet den hohen phylogenetischen Verwandtschaftsgrad dieser beiden Spezies an. Das gleiche Phänomen zeigte sich auch in den Untersuchungen von PACK (1997). Die Differenzierung dieser beiden Spezies gestaltete sich ebenfalls schwierig und gelang erst nach Durchführung einer Teilprofilanalyse.

Neben dem *L. johnsonii*-Typstamm (LMG 9436^T) konnten auch zwei weitere *L. johnsonii*-Referenzstämmen (ATCC 332 und DSM 20553) mit der *L. johnsonii*-spezifischen Sonde eindeutig als dieser Spezies zugehörig identifiziert werden. Die Spezies-Zuordnung dieses zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Stammsammlung des Institutes als *L. acidophilus* deklarierten Stamms ATCC 332 bestätigt auch frühere molekularbiologische Identifizierungen (PIEHL, 1995; PACK, 1997; KLEIN, 1998) sowie die Identifizierungen anderer Arbeitsgruppen, die mit 23S rRNA-zielgerichteten *L. johnsonii*-spezifischen Sonden sowohl den *L. johnsonii*-Typstamm (LMG 9436^T) als auch den Stamm ATCC 332 erfassen konnten (POT et al., 1993; ROY et al., 2000). Dieser im Jahre 1962 in die Stammsammlung des Institutes aufgenommene Kultursammlungsstamm war ursprünglich als „*L. acidophilus*“ deklariert worden, da die Spezies *L. johnsonii* noch nicht existierte und erst 30 Jahre später von FUJISAWA et al. (1992) beschrieben wurde.

Für drei weitere Spezies der *L. acidophilus*-Gruppe (*L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*) wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Gensonden entwickelt, da diesen Spezies, mit der Ausnahme von *L. crispatus* in Probiotika derzeit keine Bedeutung zukommt. Bewußt wird *L. crispatus* allerdings nur in pharmazeutischen Präparaten für die vaginale Applikation eingesetzt. Die Identifizierung von *L. crispatus* mit der Gensondentechnik wäre jedoch wünschenswert gewesen, da Vertreter dieser Spezies zur autochthonen Mikroflora von Mensch und Tier gehören (REUTER, 2000). Aufgrund einer höheren Säuretoleranz kommt *L. crispatus* gelegentlich auch als Kontaminant in fermentierten Milcherzeugnissen vor. Diese Tatsache erscheint wegen der gelegentlichen Erwähnungen von *L. crispatus* im Zusammenhang mit klinischen Erkrankungen beachtenswert (BERUFSGENOSSENSCHAFT DER CHEMISCHEN INDUSTRIE, 1997; persönliche Mitteilung, REUTER, 2001). Eine auf die 23S rRNA zielgerichtete *L. crispatus*-spezifische Sonde konnte von EHRMANN et al. (1994) mit der Reverse Dot Blot-Technik erfolgreich eingesetzt werden. Diese 18 Nukleotide umfassende Sonde wurde auch von ROY et al. (2000) im Rahmen eines Vergleiches unterschiedlicher Identifizierungsmethoden für potentiell probiotische Laktobazillen mit Erfolg geprüft. Da Vertreter der Spezies *L. crispatus*, wie bereits weiter oben erwähnt, in Lebensmitteln bislang nicht bewußt zum Einsatz gekommen sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit auf die Prüfung einer *L. crispatus*-spezifischen Sonde verzichtet.

5.2.2 Vergleich der Speziesidentifizierung von Feldstämmen aus der *L. acidophilus*-Gruppe mit den Ergebnissen anderer Autoren

Die im Rahmen der Hybridisierungen ermittelten Speziesidentifizierungen einiger Feldstämme werden nachfolgend mit den Identifizierungen früherer Untersuchungen verglichen (PIEHL, 1995; PACK, 1997; KLEIN, 1998) und bei nicht übereinstimmenden Spezieszuordnungen näher erläutert.

Nicht voll im Einklang mit dem Identifizierungsergebnis vorheriger Untersuchungen steht der aus einem pharmazeutischen Produkt isolierte Stamm „Acid 74“. Dieser reagierte in allen Versuchsansätzen deutlich mit der *L. acidophilus*-spezifischen Sonde, wurde aber beim Proteinfingerprinting mit SDS-PAGE mit Silberdiamin-Färbung von KLEIN (1998) als *L. crispatus* charakterisiert. Aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften (Verwertung von Trehalose, Melibiose und Raffinose)

war dieser jedoch als *L. acidophilus* Biotyp III eingeordnet worden (REUTER, pers. Mitteilung, 2001). Die Einstufung als Biotyp III erlaubt allerdings keine eindeutige Zuordnung zu einer bestimmten Spezies, da dieser Biotyp durchaus bei mehreren Arten vorkommen kann (*L. acidophilus*, *L. johnsonii*). CATO et al. (1983) berichteten, daß die Unterscheidung von *L. acidophilus* und *L. crispatus* allein aufgrund phänotypischer Charakteristika nicht möglich sei. Nach REUTER (REUTER, pers. Mitteilung, 2001) besteht das Problem der Nichtabgrenzbarkeit bei diesen beiden Spezies bei der Auswahl geeigneter Prüfmerkmale jedoch nicht. Hingegen bereitete die Gleichartigkeit biochemischer Tests Schwierigkeiten bei der Unterscheidung von *L. crispatus* und *L. gasseri*. Lediglich die Toleranz gegen NaCl scheint ein phänotypisches Differenzierungskriterium zu sein (HOLZAPFEL et al., 1997). Diese wurde aber im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nicht geprüft, weil die Einhaltung der richtigen NaCl-Konzentrationen in flüssigen Medien schwer zu reproduzieren ist (REUTER, pers. Mitteilung, 2000). Von besonderer Bedeutung bei der Identifizierung von *L. crispatus* und *L. gasseri* kann die Berücksichtigung ökologischer Besonderheiten der jeweiligen Spezies sein. Während *L. crispatus* vor allem in der menschlichen Mundhöhle und Vagina vorkommt, tritt *L. gasseri* bevorzugt im Darmtrakt auf. Grundsätzlich können ökologische Besonderheiten bei gezielten Untersuchungen von Originalhabitaten sich als hilfreich bei der Identifizierung erweisen (REUTER et al., 2000a). Über den Ursprung des „Acid 74“ standen jedoch keine Informationen zur Verfügung. Es handelte sich um einen alten Produktionsstamm.

Der 1962 von REUTER aus dem Darm eines Kindes isolierte Stamm H 18 b wurde auf der Grundlage phänotypischer Untersuchungsergebnisse Biotyp III zugeordnet und zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Instituts-Stammsammlung als *L. acidophilus* identifiziert. Dieser Biotyp ist für einen aus dem Darm isolierten Keim selten, da in diesem Habitat der Biotyp I vorherrscht und als der „eigentliche Darmlaktobazillus“ zu bezeichnen ist (REUTER, 1965a). Dieser Stamm ergab bei der Hybridisierung mit der *L. gasseri*-Sonde ein positives Hybridisierungssignal und auch die Untersuchung mit dem Proteinfingerprinting der löslichen Zellproteine mit SDS-PAGE ermöglichte die Einstufung als *L. gasseri* (PACK, 1997). Die Identifizierung dieses Stammes mit der SDS-PAGE-Technik war allerdings erst nach Durchführung einer sogenannten Teilprofilanalyse möglich, da die Gesamtprofilanalyse der mitgeführten *L. gasseri*- und *L. johnsonii*-Stämme keine eindeutige Spezieszuordnung zuließ. Dies ist ein

Hinweis auf den hohen Verwandtschaftsgrad zwischen diesen beiden Spezies, der sich auch in den beschriebenen Kreuzreaktionen im Rahmen der Hybridisierungsversuche mit der *L. gasseri*-Sonde widerspiegelt.

Ein weiterer von REUTER im Jahre 1961 aus Faeces Isolierter Stamm (F 224) war konventionell als Biotyp I identifiziert worden. Wie schon zuvor erwähnt, entspricht dieser Biotyp bei frischen Isolaten vom Menschen der späteren Spezies *L. gasseri*, bzw. in Ausnahmefällen *L. crispatus*. Zum Zeitpunkt der Isolierung und phänotypischen Charakterisierung erfolgte die Zuordnung als *L. acidophilus*, da die Spezies *L. gasseri* noch nicht beschrieben war. Die Tatsache, daß dieser Stamm bei allen eigenen Versuchsansätzen ausschließlich mit der *L. gasseri*-Sonde hybridisierte, bestätigte die Identifizierung als *L. gasseri*. Eine solche Einstufung durch die RAPD-PCR im Rahmen der Untersuchungen von PIEHL (1995) war nicht möglich gewesen. Mit beiden eingesetzten Primern konnten bei diesem Isolat keine Spezies-kennzeichnenden Amplifikate produziert werden. Die Ursache ist retrospektiv leider nicht zu klären.

Vier weitere *L. acidophilus*-Stämme, die nicht mit der RAPD-PCR bzw. Proteinfingerprinting überprüft worden waren, hybridisierten ausschließlich mit der *L. gasseri*-Sonde. Diese Stämme waren aus Faeces isoliert worden und entsprachen Biotyp I (REUTER, 1964). Das Gensondenverfahren konnte also die früheren phänotypischen Einstufungen bestätigen.

Ein weiterer zu Beginn der sechziger Jahre als *L. acidophilus* in die Kultursammlung des Institutes aufgenommener Stamm war als „Omniflora“ bezeichnet worden und phänotypisch als Biotyp II/III eingestuft worden. Er reagierte bei den hier vorgestellten Untersuchungen deutlich mit der *L. johnsonii*-spezifischen Gensonde. Bei den RAPD-PCR-Untersuchungen von PIEHL (1995) ergaben sich für den Stamm Omniflora beim Einsatz zweier verschiedener Primer in allen Versuchsansätzen identische Fragmente mit einer Größe von ca. 720, 530 bzw. 350 Basenpaaren (bp). Nach PIEHL (1995) waren dies Spezies-kennzeichnende Amplifikate für *L. johnsonii*, die ebenfalls bei dem mitgeführten Referenzstamm ATCC 332 nachweisbar waren. Die Identifizierung als *L. johnsonii* konnte auch von PACK (1997) mit dem Proteinfingerprinting vorgenommen werden, da sich dieser Stamm sowohl in der Gesamtprofilanalyse als auch in der Teilprofilanalyse jeweils in die gleiche Protein-Haupt- bzw. -Untergruppe wie die beiden *L. johnsonii*-Referenzstämme LMG 9436^T

und ATCC 332 einordnen ließ. Die Tatsache, daß dieser Stamm zu Beginn der sechziger Jahre als „*L. acidophilus*“ geführt wurde, ist wiederum darauf zurückzuführen, daß die Beschreibung von *L. johnsonii* erst viel später erfolgte (FUJISAWA, 1992).

Der 1995 unter der Bezeichnung „CNCM 1-1225“ in die institutseigene Stammsammlung aufgenommene *L. acidophilus* La1-Stamm wurde phänotypisch als Biotyp III charakterisiert. Die Überprüfung mit der RAPD-Technik (PIEHL, 1995) und durch PACK et al. (1996) mit Proteinfingerprinting ergab jedoch, daß es sich bei diesem Isolat eindeutig um einen Stamm der Spezies *L. johnsonii* handelte. Diese Identifizierung konnte durch die Hybridisierung mit der *L. johnsonii*-spezifischen Sonde bestätigt werden. Die auf Grund der Untersuchungen von PACK et al. (1996) festgestellte Spezies-Zugehörigkeit zu *L. johnsonii* wurde nachfolgend auch vom Hersteller der probiotischen Milcherzeugnisse übernommen (REUTER, 2001).

Insgesamt neun mitgeführte Stämme, die sich auf Grund ihrer phänotypischen Charakteristika als Vertreter der *L. acidophilus*-Gruppe darstellten, hybridisierten mit keiner der eingesetzten Gensonden. Diese Stämme waren Isolate aus einem Sauermilchprodukt (B 39/4d), Darminhalt (XXIX J), Faeces (F 268 b), einem probiotischen Joghurt (Zott 992/e), einem Produktmuster (He) sowie aus klinischem Material (CCUG 24836, -29549A, -29549B und -30451). Eine Identifizierung erfolgte nur auf Grund der ermittelten Biotypen. Von diesen neun Stämmen entsprachen acht den Biotypen I bzw. III und ein Isolat Biotyp IV. Stämme des Biotyp I können den Spezies *L. gasseri*, *L. crispatus* oder *L. amylovorus* angehören. Gleiches gilt für Biotyp III, der eine Zuordnung zu den Spezies *L. acidophilus* oder *L. johnsonii* zuläßt. Fraglich hinsichtlich der Spezies-Zuordnung sind auch Stämme, deren biochemische Merkmale Biotyp IV entsprechen. Da diese Stämme mit keiner der eingesetzten Sonden der *L. acidophilus*-Gruppe reagierten, weder mit der *L. acidophilus*-, noch mit der *L. johnsonii*- oder *L. gasseri*-Sonde, liegt die Annahme nahe, daß es sich bei diesen Isolaten um Vertreter der Spezies *L. crispatus* handelte. Bestätigt wird diese Annahme für die Stämme B 39/4d und den 1961 von REUTER aus Faeces isolierten Stamm XXIX J durch die Ergebnisse von PIEHL (1995), bei denen ein spezifisches Amplifikat mit einer Fragmentgröße von 280 bp die Zuordnung zu *L. crispatus* ermöglichte. Die gleiche Identifizierung beider Stämme erfolgte von KLEIN (1998) mittels Proteinfingerprinting mit Silberdiaminfärbung. Auch bei PACK (1997) ließ sich der Stamm B 39/4d in die gleiche Proteinuntergruppe wie der *L. crispatus*-Typstamm

(DSM 20584^T) einordnen. Drei der in den Hybridisierungsversuchen mitgeführten, nicht identifizierbaren Isolate aus klinischem Material waren auch Bestandteil der Erhebungen von KLEIN (1998) gewesen. Während die Stämme CCUG 29549A und CCUG 29549B mittels Proteinfingerprinting ebenfalls nicht identifiziert werden konnten, wurde der Stamm CCUG 24836 der Spezies *L. gasseri* zugeordnet, was auch dem Identifizierungsergebnis mit der RAPD-PCR-Technik entsprach (PIEHL, 1995). Die Tatsache, daß dieser Stamm in keinem der Hybridisierungsversuche mit der *L. gasseri*-Sonde reagierte, rechtfertigt gewisse Zweifel hinsichtlich der Identifizierung als *L. gasseri*. Möglicherweise handelt es sich hier um einen Vertreter der Spezies *L. crispatus* oder eine noch nicht beschriebene Stammform in der *L. acidophilus*-Gruppe, denn auch PACK (1997) berichtete von Stämmen, die sich mittels Proteinfingerprinting keiner Spezies zuordnen ließen.

5.2.3 Referenz- und Sammlungsstämme aus der *L. casei*-Gruppe

In der *L. casei*-Gruppe ließ sich mit der *L. zaeae*-Sonde außer dem *L. zaeae*-Typstamm (DSM 20178^T) auch der derzeitige *L. casei*-Typstamm (ATCC 393^T) nachweisen. Das bestätigte somit den von DICKS et al. (1996) und MORI et al. (1997) diskutierten Vorschlag, diesen Stamm der Spezies *L. zaeae* zuzuweisen. Beide Stämme hybridisierten auch mit der *L. paracasei*-Sonde, wie auch die drei mitgeführten *L. paracasei*-Referenzstämme (DSM 5622^T, DSM 20020, LMG 12586). Die Abgrenzung der Spezies *L. paracasei* von *L. zaeae* und dem *L. casei*-Typstamm gelang erst durch den zusätzlichen Einsatz der *L. zaeae*-spezifischen Sonde, da diese keinen der untersuchten *L. paracasei*-Stämme erfaßte und somit als Ausschlußsonde mitgeführt werden mußte. Die Kreuzreaktionen sind auch hier Ausdruck der engen phylogenetischen Beziehung dieser Spezies, die sich in sehr ähnlichen Basensequenzen der 16S rRNA manifestiert und Anlaß zu einer Unterteilung gemäß der Hybridisierungsergebnisse in die Gruppen *L. casei* I bzw. *L. casei* II gab. Der hohe Verwandtschaftsgrad zwischen den Spezies der *L. casei*-Gruppe wurde auch in den Untersuchungen von HERTEL et al. (1993) deutlich, die mit einer 18 bp langen 23S rRNA-Sonde sämtliche untersuchten Stämme der Spezies *L. casei*, *L. paracasei* und *L. rhamnosus* erfaßten. Eine weitere, ebenfalls 18 Nukleotide umfassende Sonde diente dem gleichzeitigen Nachweis von *L. casei*- und *L. rhamnosus*-Isolaten. Letztere, von HERTEL et al. (1993) entwickelte Sonde wurde nachfolgend auch von

XANTHOPOULOS et al. (1999) zur Speziesidentifizierung von Stämmen aus der *L. casei*-Gruppe erfolgreich geprüft.

Mittels phänotypischer Methoden sowie durch Proteinfingerprinting konnten KLEIN (1998) und KLEIN et al. (1998a) die oben erwähnten *L. paracasei*-Referenzstämme DSM 5622^T, DSM 20020 und LMG 12586 ebenfalls als *L. paracasei* identifizieren. Der Kultursammlungsstamm DSM 20020 wurde auch in RAPD-PCR Untersuchungen von PIEHL (1995) mitgeführt und konnte ebenfalls als *L. paracasei* identifiziert werden. Auf der Grundlage einer partiellen Sequenzierung der 23S rRNA eines als *L. paracasei* ssp. *paracasei* deklarierten Stammes wurde von HERTEL et al. (1993) eine Gensonde entwickelt, die ausschließlich mit den 24 untersuchten *L. paracasei*-Isolaten hybridisierte. Die Beschreibung von *L. zeaе* als Nomen revictum durch DICKS et al. (1996) war zu diesem Zeitpunkt allerdings noch nicht erfolgt, so daß diese Spezies in den Untersuchungen von HERTEL et al. (1993) nicht mitgeführt wurde.

Die für die Spezies *L. rhamnosus* entwickelte Gensonde reagierte eindeutig mit dem *L. rhamnosus*-Typstamm, denn dieser stellte die Sequenzgrundlage für die Entwicklung der Sonde dar. Ein weiterer Kultursammlungsstamm (DSM 7133), der als Probiotikum bei Schweinen Anwendung findet, erbrachte ebenfalls ein deutliches Hybridisierungssignal. Da ein Großteil (9 von insgesamt 13) der phänotypisch als *L. rhamnosus* eingestuften Stämme der CCUG (Culture Collection University of Göteborg), die alle aus klinischem Material stammten, mit der *L. paracasei*-Sonde reagierte, wurde eine Unterteilung in die Gruppen *L. rhamnosus* I und *L. rhamnosus* II vorgenommen. Die Gruppe *L. rhamnosus* I setzte sich aus Isolaten zusammen, die lediglich mit der *L. rhamnosus*-Sonde hybridisierten. Als *L. rhamnosus* II wurden Stämme bezeichnet, die außer mit der *L. rhamnosus*-Sonde auch mit der *L. paracasei*-Sonde kreuzreagierten. Während die eine Hälfte dieser Stämme mit der *L. paracasei*-Sonde ein deutliches Hybridisierungssignal erbrachte, reagierte die andere Hälfte der Stämme in allen Versuchsansätzen lediglich schwach. Betrachtet man zusätzlich die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen, ist die enge Verwandtschaft dieser Stämme offensichtlich. Über die Herkunft dieser Stämme ist nur bekannt, daß sie aus Kliniken aus dem Raum Göteborg stammen. Hinsichtlich einer eventuellen Identität dieser Isolate kann daher keine abschließende Aussage getroffen werden.

In RAPD-PCR-Untersuchungen von PIEHL (1995) resultierten beim Einsatz eines spezifischen Primers bei den Stämmen CCUG 27405, CCUG 27772, CCUG 30069, CCUG 28262 sowie CCUG 28641 nahezu identische Bandenspektren, die auch auf den hohen Verwandtschaftsgrad zwischen diesen Isolaten hinweisen. In den Untersuchungen von KLEIN et al. (1995b) gruppieren sich nach Zellwand-Analysen sämtliche auch in dieser Arbeit als *L. rhamnosus* mitgeführten CCUG-Isolate in einer Proteingruppe, was ebenfalls eine enge Beziehung dieser klinischen Stämme andeutet.

Die phylogenetisch eng verwandten Vertreter der Spezies *L. zaeae*, *L. casei* und *L. paracasei* konnten mit der *L. rhamnosus*-Sonde sicher abgegrenzt werden. Auch die weiteren mitgeführten Kontrollstämme, die sich aus 13 anderen *Lactobacillus*- und 2 *Weissella*-Typstämmen zusammensetzten, ergaben keinerlei Kreuzreaktionen, so daß die Spezies-Spezifität der *L. rhamnosus*-Sonde anzunehmen ist.

Die Identifizierung von *L. rhamnosus*-Isolaten, die überwiegend aus den Kultursammlungen des LMG (Laboratorium voor Microbiologie, Universität Gent) sowie der BMF (Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel) stammten, gelang auch HERTEL et al. (1993) mit einer 23S rRNA-Sonde. Allerdings erfaßte die Sonde auch drei mitgeführte *L. casei*-Sammlungsstämme. XANTHOPOULOS et al. (1999) setzten die gleiche Sonde zur Identifizierung von Stämmen ein, die aus Faeces isoliert worden waren. Sie konnten die zuvor biochemisch und mittels SDS-PAGE vorgenommene Spezies-Zuordnung zu *L. rhamnosus* mittels Dot Blot-Hybridisierungstechnik bestätigen. Jedoch wurde auch hier ein mitgeführter *L. casei*-Stamm (ATCC 393^T) von der Sonde erfaßt, so daß eine Abgrenzung von *L. casei* und *L. rhamnosus*-Isolaten mit dieser Sonde ebenfalls nicht gelang.

5.2.4 Vergleich der Speziesidentifizierung von Feldstämmen aus der *L. casei*-Gruppe mit den Ergebnissen anderer Autoren

Auch für die mitgeführten Feldstämme aus der *L. casei*-Gruppe kann ein Vergleich mit früheren Identifizierungen mittels anderer molekularbiologischer Methoden herangezogen werden.

Die Hybridisierungsergebnisse von drei als *L. casei* deklarierten Stämmen veranschaulichen die bereits erwähnten taxonomischen Probleme in der *L. casei*-Gruppe. Das führte in der vorliegenden Arbeit zu der Unterteilung in zwei *Lactobacillus casei*-Stammformen, nämlich *L. casei* I und II. Drei als *L. casei* deklarierte Stämme (Shirota, Yakult, Actimel 563) reagierten in den Hybridisierungsversuchen mit der *L. paracasei*-Sonde; sie wurden deshalb als *L. casei* II bezeichnet. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Untersuchungen von KLEIN (1998), bei dem sich *L. casei*-Stämme (bzw. als solche deklarierte) in Dendrogrammen, die auf der Basis von Proteinanalysen erstellt wurden, mit *L. paracasei* Referenz- und Sammlungstämmen gruppieren. Der *L. casei*-Typstamm (ATCC 393^T) grupperte sich hingegen mit dem *L. zaeae*-Typstamm (DSM 20178^T) in einem separaten Protein-Cluster. Dieses entspricht exakt dem eigenen Hybridisierungsergebnis mit der *L. zaeae*-spezifischen Gensonde. Neben den bereits weiter oben erwähnten *L. paracasei*-Kultursammlungstämmen erbrachte auch der 1962 von REUTER aus Faeces isolierte Stamm F 10 a mit der *L. paracasei*-Sonde ein positives Hybridisierungssignal. Diese Identifizierung stimmt ebenfalls mit den von PIEHL (1995) und KLEIN (1998) mittels RAPD-PCR resp. Proteinfingerprinting erzielten Ergebnissen überein, so daß diese mit drei unterschiedlichen molekularbiologischen Methoden ermittelte Spezies-Zuordnung als gesichert angesehen werden kann.

Die Frage, ob die drei oben genannten Stämme auf Grund des positiven Hybridisierungsergebnisses mit der *L. paracasei*-Sonde auch als Vertreter der Spezies *L. paracasei* definiert werden sollten, läßt sich vorerst nicht klären. Hierzu wäre die Entwicklung einer *L. casei*-spezifischen Gensonde notwendig, was zunächst die Festlegung eines repräsentativen Typstammes für die Spezies *L. casei* durch die Judicial Commission des International Committee on Systematic Bacteriology (ICSB) erfordern würde. Festzuhalten bleibt, daß die Benennung der *L. paracasei*-Sonde als „Lpara“ lediglich auf der Tatsache basiert, daß ein in der Datenbank des

NCBI/GenBank als *L. paracasei* geführter Stamm (JCM 8130) die Sequenzgrundlage für diese Sonde darstellte.

Einen Sonderfall bei den mitgeführten Feldstämmen dieser Gruppe stellt der Stamm P 898 dar. Weil dieser als *L. rhamnosus* deklarierte Stamm mit der *L. paracasei*-Sonde reagierte, wurde er einer neuen Untergruppe *L. rhamnosus* II zugeordnet. Dieser aus einem Leberabszeß isolierte Stamm grupperte sich in den Erhebungen von KLEIN (1998) auch im *L. paracasei*-Cluster, wurde jedoch auf der Grundlage seiner biochemischen Eigenschaften weiter als *L. rhamnosus* geführt. Da dieses klinische Isolat mit der *L. rhamnosus*-spezifischen Sonde kein Hybridisierungssignal erbrachte, erfolgte im Rahmen der eigenen Gensonden-Untersuchungen die Einstufung als *L. paracasei*. Auch bei PIEHL (1995) ergaben unterschiedliche Primer bei diesem Stamm in allen Versuchsansätzen *L. casei/paracasei*-spezifische Amplifikate bei 470 resp. 510 bp, die auch der mitgeführte *L. paracasei*-Typstamm aufwies. Das Hybridisierungsergebnis als *L. casei/paracasei* erscheint also gerechtfertigt.

Bei den übrigen mitgeführten *L. rhamnosus*-Feldstämmen, die aus probiotischen Joghurts, klinischem Material sowie aus einem pharmazeutischen Produkt isoliert worden waren, zeigte der Vergleich der mit den anderen Untersuchungsmethoden vorgenommenen Identifizierungen vollständige Übereinstimmung.

Die Hybridisierungsergebnisse verdeutlichen, daß die Probleme der Zuordnung von Stämmen zu Spezies innerhalb der *L. casei*-Gruppe nach den taxonomischen Neugruppierungen durch COLLINS et al. (1989) und DICKS et al. (1996) noch immer nicht gelöst sind. Insbesondere die Benennung der Spezies, in denen alle bisherigen *L. casei*-Stämme bzw. ehemals *L. paracasei*-Stämme, wie von DICKS et al. (1996) gefordert, zusammengefaßt werden sollen, bedarf weiterer Klärung.

5.2.5 Reaktionen mitgeführter Kontrollstämme

Mit Ausnahme eines in der institutseigenen Kultursammlung als *L. leichmannii* geführten Isolates hybridisierte keiner der zur Validierung der Gensonden mitgeführten Kontrollstämme mit den eingesetzten Gensonden. Dieser als ATCC 4797 bezeichnete Kultursammlungsstamm stellte einst den Typstamm der Spezies *L. leichmannii* dar und erbrachte bei der Hybridisierung mit der *L. paracasei*-Sonde ein schwaches Hybridisierungssignal. Der ursprünglich aus Käse isolierte Stamm wies eine biochemische Ähnlichkeit mit *L. lactis* Typ II auf (REUTER, 1964). Da sich *L. leichmannii* jedoch nach BERGEY (1957) durch eine fehlende Laktose-Vergärung auszeichnen sollte, folgerte REUTER (1964) anhand eigener biochemischer Daten, daß dieser Stamm nicht als dieser Spezies zugehörig anzusehen sei. GASSER und JANVIER (1980) berichteten allerdings von einigen Stämmen dieser Spezies, die Laktose langsam fermentieren können. Die bei der Hybridisierung mit der *L. paracasei*-Sonde wiederholt aufgetretene schwache Kreuzreaktion zeigt, daß die Gensonde zum Teil an die DNA dieses Stammes bindet. Eine engere Verwandtschaft dieses Isolates zur *L. casei*-Gruppe ist hierdurch jedoch nicht zu belegen und könnte allenfalls durch die Ermittlung der DNA-Homologie zu anderen Spezies bzw. Stämmen der *L. casei*-Gruppe aufgezeigt werden. *L. leichmannii* kommt jedoch keine praktische Bedeutung zu, da diese Spezies in Probiotika nicht eingesetzt wird.

5.2.6 Taxonomische Erkenntnisse

5.2.6.1 *L. acidophilus*-Gruppe

Aufgrund der eigenen Hybridisierungsergebnisse mit den Sonden der *L. acidophilus*-Gruppe ergaben sich für insgesamt 9 Stämme Abweichungen der Spezies-Zuordnung im Vergleich zur Identifizierung zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Stammsammlung des Institutes. Mit Ausnahme des Produktionsstammes CNCM 1-1225 („*L. acidophilus* 1“) liegen diese Abweichungen in der Tatsache begründet, daß vor der Neubeschreibung von Spezies aus der *L. acidophilus*-Gruppe durch JOHNSON et al. (1980), LAUER et al. (1980) und FUJISAWA et al. (1992) häufig eine pauschale Identifizierung als *L. acidophilus* vorgenommen wurde, obwohl es sich in vielen Fällen um erst später beschriebene Spezies gehandelt haben dürfte.

5.2.6.2 *L. casei*-Gruppe

Da der jetzige *L. casei*-Typstamm (ATCC 393^T) mit der *L. zeae*-spezifischen Gensonde deutlich reagierte, scheint eine Änderung der von COLLINS et al. (1989) vorgeschlagenen und derzeit noch gültigen Einteilung der *L. casei*-Gruppe bzw. die Reklassifizierung des Stammes ATCC 393^T angebracht. Die Tatsache, daß der von anderen Autoren vorgeschlagene Neo-Typstamm von *L. casei* (ATCC 334) in den Untersuchungen von COLLINS et al. (1989) gar nicht mitgeführt wurde, dieser aber nach DELLAGLIO et al. (1991), DICKS et al. (1996), MORI et al. (1997) sowie CHEN et al. (2000) im Gegensatz zum Stamm ATCC 393^T als Typstamm von *L. casei* als geeigneter angesehen wird, unterstreicht diese Forderung. Nach DICKS et al. (1996) lassen die von COLLINS et al. (1989) selbst gelieferten DNA-DNA-Hybridisierungsdaten die Schlußfolgerung zu, daß es sich bei dem Stamm ATCC 393^T nicht um einen *Lactobacillus casei*-Stamm handelt.

Berücksichtigt man die taxonomischen Lösungsvorschläge in der *L. casei*-Gruppe, so wird deutlich, daß die für eine Neugruppierung sprechenden wissenschaftlichen Daten durchaus vorhanden sind. Danach kann der jetzige *L. casei*-Typstamm (ATCC 393^T) der Spezies *L. zeae* zugeordnet werden, zu dem er eine hohe DNA-

Homologie aufweist (DICKS et al., 1996; MORI et al., 1997; KLEIN, 1998). Die eigenen Hybridisierungsergebnisse unterstützen diesen Vorschlag.

Als *L. rhamnosus* II bezeichnete Stämme reagierten außer mit der *L. rhamnosus*-spezifischen Sonde zusätzlich mit der *L. paracasei*-Sonde. Diese Isolate waren alle in der Lage, Rhamnose zu verwerten, was nach klassischen phänotypischen Kriterien die Identifizierung als *L. rhamnosus* erlaubt. Die Tatsache, daß 10 der als *L. rhamnosus* deklarierten Isolate auch mit der *L. paracasei*-Sonde reagierten, zeigt erneut den hohen Verwandtschaftsgrad der Spezies innerhalb der *L. casei*-Gruppe auf.

Zur Klärung der Taxonomie in der *L. casei*-Gruppe ist der Einsatz einer *L. casei*-Sonde angezeigt. Eine spezifische Gensonde für diese in fermentierten Milchprodukten wichtige Spezies ist bislang in der Literatur nicht beschrieben. Zwei von HERTEL et al. (1993) entwickelte Gensonden erfaßten außer *L. casei*- auch *L. rhamnosus*- resp. *L. rhamnosus*- und *L. paracasei*-Stämme. Ferner war die Anzahl der mitgeführten *L. casei*-Stämme mit 3 Isolaten gering. Wichtig erscheint in diesem Zusammenhang die Notwendigkeit der Benennung eines adäquaten Neo-Typstammes von *L. casei*, da der bisherige Typstamm (ATCC 393^T) als wenig repräsentativ für diese Spezies angesehen wird (DELLAGLIO et al., 1991; DICKS et al., 1996; MORI et al., 1997; CHEN et al., 2000).

5.3 Einsatz von Gensonden zur Identifizierung probiotischer Stämme

Die zunehmende Verwendung probiotischer Kulturen in Lebensmitteln, Arzneimitteln und im Tierfutter erfordert den sicheren und möglichst schnell durchführbaren Nachweis der eingesetzten Mikroorganismen. Die Notwendigkeit der sicheren Identifizierung in Lebensmitteln ergibt sich insbesondere aufgrund des lebensmittelrechtlichen Aspektes der korrekten Deklaration der verwendeten Kulturen. Aber auch die Tatsache, daß nur bestimmte Spezies in den entsprechenden Habitaten des Menschen vorkommen, verlangt den zuverlässigen Nachweis von Spezies, denn ein als Probiotikum eingesetzter Stamm muß nach überlebter Passage des Magens in der Lage sein, am Wirkort (z.B. im Darm) zu haften und zu überleben, um überhaupt einen (probiotischen) Effekt hervorrufen zu können. In diesem Zusammenhang kommt der Habitat-Ökologie eine besondere Bedeutung zu, weil ein beispielsweise aus dem Darm eines Tieres stammender Stamm für den probiotischen Einsatz beim Menschen nicht unbedingt geeignet sein muß.

Für Hersteller von probiotischen Lebensmitteln stellt sich im Rahmen der Eigenverantwortung für die Werbeaussagen und der vorgeschriebenen Eigenkontrolle der Produktion das Problem der sicheren Identifizierung der eingesetzten und deklarierten probiotischen Kulturen. Das gleiche gilt auch für die amtliche Lebensmittelüberwachung.

Für die Identifizierung auf Spezies-Ebene hat sich die Anwendung der Hybridisierungstechnik zur Identifizierung von probiotischen Bakterienkulturen als geeignet erwiesen. Dies zeigt auch ein Vergleich mit Identifizierungen von Stämmen, die zuvor mit anderen Verfahren untersucht worden waren (PIEHL, 1995; PACK, 1997; KLEIN, 1998). Der Kosten- und Arbeitsaufwand erscheint im Vergleich zu anderen molekularbiologischen Methoden als durchaus akzeptabel, wobei in dieser Hinsicht auf den beschleunigten Nachweis in Form der Reverse Dot Blot-Hybridisierung (EHRMANN et al., 1994) hingewiesen sei.