

DNS/DNS-Homologiestudien innerhalb der Gattung *Pediococcus*

Werner Back¹ und Erko Stackebrandt²

¹ Döhler GmbH & Co. KG, Mikrobiologische Abteilung, Riedstr. 9, D-6100 Darmstadt, Bundesrepublik Deutschland*

² Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Teilsammlung München, der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, Menzinger Str. 67, D-8000 München 19, Bundesrepublik Deutschland

DNA-DNA Homology Studies on the Genus *Pediococcus*

Abstract. 17 strains of *Pediococcus*, including new isolates and strains from various collections, were investigated by nucleic acid hybridisation. Most of the newly isolated strains, selected from about 500 strains according to physiological and biochemical characters, could be attributed to known species. The reassociation data demonstrate the separate status of *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. parvulus* and *P. halophilus*. The proposed neotype strain of *P. acidilactici* NCDO 1859, however, has been found to be in reality a genuine *P. pentosaceus*. *P. dextrinicus*, formerly described as *P. cerevisiae* var. *dextrinicus* showed a remarkable lack of relationship to any of the strains tested. Two isolates exhibiting a high phenotypic similarity to *P. parvulus* show little genetic relationship to this and especially to all other species.

Key words: *Pediococcus* – Taxonomy – Genetic relationship – DNA-DNA homology.

Zusammenfassung. An 17 Stämmen der Gattung *Pediococcus*, die auf Grund charakteristischer physiologisch-biochemischer Merkmale aus einer Anzahl von etwa 500 Kulturen unterschiedlicher Herkunft ausgewählt wurden, werden mit Hilfe der DNS/DNS-Hybridisierung die verwandtschaftlichen Beziehungen untersucht. Dabei wird die Eigenständigkeit der Arten *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *P. parvulus*, *P. damnosus* und *P. halophilus* bestätigt. Der für *P. acidilactici* vorgeschlagene Neotyp-Stamm NCDO 1859 ist jedoch nach den vorliegenden Ergebnissen ein echter *P. pentosaceus*. Ein Stamm von *P. dextrinicus*, der früher bereits als *P. cerevisiae* var. *dextrinicus* beschrieben wurde,

Abkürzungen. CTAB = N-cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid; EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure; PPO = 2,5-Diphenyloxazol; POPOP = 1,4-Bis-(5-phenyl-2-oxazolyl)-benzol; SSC = Saline-Trinatriumcitrat (0,15M NaCl, 0,015M Trinatriumcitrat, pH 7,0); Tris = Tris(hydroxymethyl)-amino-methan; T_m = mittlere Schmelztemperatur der DNS

* Adresse für Sonderdruck-Anforderungen

zeigt zu keiner untersuchten Art eine genetische Verwandtschaft auf der Basis der DNS/DNS-Homologie. Zwei aus Bier und Bierhefe isolierte Stämme, die hinsichtlich des Phänotyps *P. parvulus* nahestehen, zeigen weder zu dieser Art noch zu allen anderen bisher beschriebenen Arten hinsichtlich des Genotyps einen hohen Verwandtschaftsgrad.

Seit der Erstbeschreibung von *Pediococcus cerevisiae* durch Balcke (1884) bestanden hinsichtlich der Pediokokken-Systematik teilweise stark divergierende Vorstellungen, die sich auch noch in neuerer Zeit in den einzelnen Bestimmungsbüchern niederschlagen. So wird die Gattung *Pediococcus* in Bergey's Manual von Kitahara (1974) in die 5 Arten *Pediococcus cerevisiae*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. halophilus* und *P. urinae-equi* eingeteilt, während Sharpe et al. (1966) die von Coster u. White (1964) vorgeschlagene Systematik weitgehend befolgen und insgesamt 6 Arten unterscheiden, nämlich *P. cerevisiae*, *P. parvulus*, *P. damnosus*, *P. halophilus* und *P. homari* (oder *Aerococcus viridans*) sowie die unbenannte Gruppe III von Günther u. White (1961).

Diese stark voneinander abweichenden Auffassungen sind insbesondere auf die unterschiedliche Wertung physiologisch-biochemischer Merkmale zurückzuführen. Hinzu kommen noch die unterschiedlichen Vorstellungen, die sich mit dem Namen ‚*cerevisiae*‘ verbinden, weshalb sich auch die Schiedskommission des Internationalen Komitees für Systematische Bakteriologie (1976) entsprechend der Argumentation von Garvie veranlaßt sah, *Pediococcus damnosus* Claussen als Typenart zu erhalten und andererseits den Namen *P. cerevisiae* Balcke als „nicht gültig veröffentlicht“ anzusehen.

Bei vorausgegangenen Untersuchungen an zahlreichen Eigenisolaten und Sammlungsstämmen zeigte sich, daß eine zufriedenstellende Klassifizierung aller Stämme mit Hilfe der bisher üblichen Bestimmungs-

Tabelle 1. Übersicht über die untersuchten Stämme

Bezeichnung	DSM Nr.	Weitere Sammlungsnummern	Herkunft
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	20281	B 260a	Gerste
<i>P. pentosaceus</i>	20282	B 201a	Gerste
<i>P. pentosaceus</i>	20336	NCDO 990←Günther←Techn. Hoogeschool Delft←van Niel	getrocknete Bierhefe
<i>P. pentosaceus</i> ssp. <i>intermedius</i>	20280	B 243d	Bierhefe
<i>P. pentosaceus</i> ssp. <i>intermedius</i>	20283	B 247c	Gerste
<i>P. acidilactici</i>	20284	B 213c	Gerste
<i>P. acidilactici</i>	—	B Sa14d	Jugoslawische Salami
<i>P. acidilactici</i>	20333	NCDO 1859, IFO 3884 ←Kitahara P.lin.	Sake-Maische
<i>P. parvulus</i>	20332	ATCC 19371, NCDO 1634 NCIB 9447←White S182	Silage
<i>P. species</i> (Gr. IVa)	20285	B 236b	Bierhefe
<i>P. species</i> (Gr. IVa)	20287	B 206c	Bier
<i>P. damnosus</i> (<i>P. cerevisiae</i>)	20289	B 144a	persisches Bier
<i>P. damnosus</i> (<i>P. cerevisiae</i>)	20291	B 38b	Bier
<i>P. damnosus</i> (<i>P. cerevisiae</i>)	20292	B 51a	Bier
<i>P. damnosus</i> (<i>P. cerevisiae</i>)	20331	NCDO 1832←Coster Be1 ←Williamson	Bierhefe
<i>P. dextrinicus</i>	20335	NCDO 1561←Coster ←Günther L95 Günther u. White, Gr.III	Silage
<i>P. halophilus</i>	20339	NCDO 1635, Tc1 Mees	Pökel-Anschovis

NCDO = National Collection of Dairy Organisms, Reading England

NCIB = National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen, Scotland

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U.S.A.

IFO = Institute for Fermentation, Osaka, Japan

B = Institut für Brauereitechnologie und Mikrobiologie der Technischen Universität München, D-8050 Freising-Weihenstephan (isoliert von Back, Dissertation, 1974)

schlüssel nicht möglich war. Unter Berücksichtigung zusätzlicher Kriterien, insbesondere der Zusammensetzung des Peptidoglycans der Zellwand und der elektrophoretischen Beweglichkeit der Lactat-Dehydrogenasen, wird von Back u. Weiß (Manuskript in Vorbereitung) die Einteilung der Gattung *Pediococcus* in folgende 6 Arten vorgeschlagen: *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *P. parvulus*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus* und *P. halophilus*. *P. urinae-equi* bzw. *P. homari* wurden dabei auf Grund der fehlenden Asparaginsäure im Peptidoglycan (L-Lys-direkt-Typ) von den übrigen Pediokokken (L-Lys-D-Asp-Typ) abgetrennt.

In der vorliegenden Arbeit wird die Richtigkeit der bisher nur auf der Basis phänotypischer Merkmale getroffenen Differenzierung mit Hilfe von DNS/DNS-Homologie-Untersuchungen überprüft und zur Pediokokken-Systematik Stellung genommen.

Material und Methode

1. Organismen

Mit einer Ausnahme wurden Stämme der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM), Teilsammlung München, verwendet. Die

Nomenklatur basiert auf den Ergebnissen von Back u. Weiß (Manuskript in Vorbereitung). Weitere Einzelheiten gehen aus Tabelle 1 hervor. Bei der Auswahl der Stämme wurden möglichst stark voneinander abweichende Merkmalskombinationen berücksichtigt. Vor den Homologie-Untersuchungen wurden die charakteristischen physiologisch-biochemischen Eigenschaften überprüft.

2. Medium und Kulturbedingungen

Alle Stämme wurden in MRS-Medium (de Man et al., 1960) kultiviert. Die Anzucht von *P. halophilus* erfolgte in Gegenwart von 4% NaCl. Außer *P. damnosus*, der bei 22° C ein optimales Wachstum zeigte, wurden alle Arten bei 30° C bebrütet.

3. Enzyme und Radioisotope

Proteinase K wurde von Merck (Darmstadt), Lysozym und Ribonuclease A wurden von Serva (Heidelberg) bezogen. ³H-Thymidin (10,5 Ci/mMol; 43 mCi/mg) wurde von New England Nuclear bezogen.

4. Isolierung der DNS

Für die Isolierung unmarkierter DNS wurden die Organismen aus 15–20 l Medium nach Erreichen der mittleren logarithmischen Phase ($E_{578} = 0,8–1,0$) geerntet. Die Zellen wurden zweimal in Saline/EDTA-Puffer (0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA, pH 8,0) gewa-

schon. Zur Lyse wurden 15 g Frischzellen in 150 ml desselben Puffers in Gegenwart von 15 mg Lysozym 30 min lang bei 37° C inkubiert. Totale Lyse konnte durch die Zugabe von 2% (w/v) Natriumlaurylsulfat bewirkt werden. Die weiteren Schritte der Extraktion und Reinigung der DNS wurden nach der Beschreibung von Marmur (1961) durchgeführt. Kleine Modifikationen hinsichtlich der Reinigung bestanden lediglich in der Einführung eines selektiven Fällungsschrittes der DNS mit Hilfe von CTAB nach Darby et al. (1970). Der Rohextrakt wurde auf 1 M NaCl gebracht und mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 v/v) 20 min lang kräftig geschüttelt. Nach Zentrifugation (20 min bei 12 000 g) wurde die klare obere DNS-haltige Phase auf 1% CTAB gebracht. Nach Erniedrigung der NaCl-Konzentration auf 0,6 M fielen die CTAB-Salze der DNS aus und konnten durch Zentrifugieren gesammelt werden. Der Rückstand wurde in 1 M NaCl gelöst und das CTAB durch Ausschütteln mit Chloroform entfernt.

RNS wurde nach Zugabe von 50 µg RNase/ml (12 h bei 37° C) bereitigt. Protein, das den Chloroform-Ausschüttelungen und dem CTAB-Schritt widerstanden hatte, wurde mit Proteinase K (50 µg/ml) bei 37° C 12 h lang verdaut. Nach der letzten Isopropanol-Fällung wurde die gelöste DNS gegen SSC/EDTA-Puffer (0,15 M NaCl, 0,015 M Tri-natriumcitrat, 0,2 M EDTA, pH 8,0) 48 h lang dialysiert.

³H-markierte DNS wurde aus Zellen isoliert, die zuvor in MRS-Medium mit 1 mCi ³H-Thymidin/300 ml kultiviert worden waren. Die Zellen wurden bei Erreichen der spätlogarithmischen Phase geerntet. Nach Zerschlagen der Zellen mit Glasperlen in einem Zellhomogenisator (Bühler) wurde die Reinigung, wie oben beschrieben, durchgeführt. Die spezifischen Aktivitäten der ³H-markierten DNS bewegten sich zwischen 2 × 10⁴ und 2 × 10⁵ Cpm/µg DNS.

Die Mengenbestimmung der DNS wurde nach der Methode von Burton (1968) mit Kälberthymus-DNS als Standard durchgeführt. Die gereinigte DNS wurde in Gegenwart einiger Tropfen Chloroform bei 4° C aufbewahrt.

5. Beladen der Nitrocellulosefilter

Die Denaturierung der unmarkierten DNS erfolgte nach der Methode von Birnstiel et al. (1972). 1 ml der DNS-Lösung, die 150 µg DNS enthielt, wurde mit 1 ml einer 1 N NaOH-Lösung 20 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz durch Zugabe von 8 ml einer kalten Pufferlösung (2 Teile 1 N NaCl; 1 Teil 1 N HCl; 1 Teil 1 M Tris) neutralisiert und verdünnt. Diese DNS-Lösung wurde bei mäßiger Geschwindigkeit (1 ml/3 min) und niedriger Temperatur durch einen Nitrocellulosefilter (Schleicher & Schüll, Porengröße 0,2 µ, Durchmesser 25 mm) filtriert. Der Filter wurde zuvor 30 min lang in 3 × SSC vorinkubiert. Nach dem Filtrieren wurden die Filter dreimal mit kalter 3 × SSC-Lösung gewaschen.

Die Bindungseffizienz der DNS am Filter betrug 88–95%. Mehr als 80% der DNS blieb während der Inkubation unter Hybridisierungsbedingungen am Filter gebunden. Die Bindungseffizienz wurde durch den Vergleich der Absorption der DNS-Lösung bei 260 nm vor und nach der Filtration der Lösung bestimmt.

Nach dem Beladen wurden die Filter über Nacht luftgetrocknet und anschließend im Vakuumschrank bei 80° C (250 Torr) für 4 h nachbehandelt. Die Aufbewahrung der Filter erfolgte in Exsikkatoren mit Phosphorpentoxid als Trocknungsmittel bei 4° C. Vor Versuchsbeginn wurden aus den Filtern mit Hilfe einer Lochzange 8 kleine Teilfilter (Ø 5,5 mm) herausgestanzt. Jeder kleine Filter enthielt etwa 15 µg DNS.

6. DNS/DNS-Hybridisierung

Die Filter mit der gebundenen DNS wurden in kleinen Plastikgefäßen (Eppendorf, Volumen 1,5 ml) in Gegenwart von 0,5 ml Präinkubationslösung nach Denhardt (1966) bei Hybridisierungstemperatur

inkubiert. Der Hybridisierungsversuch wurde wie bei Conaughy et al. (1969) beschrieben durchgeführt. Nach 4 h wurde das Präinkubationsgemisch durch 0,2 ml Reaktionsgemisch, das 0,1 µg denaturierte markierte DNS in 3 × SSC-Formamid (10%) enthielt, ersetzt. Die markierte DNS wurde vorher mit Hilfe einer Frenchpress (Aminco) bei 20 000 psi fragmentiert. Die Denaturierung der markierten DNS wurde in geschlossenen Pyrexgläsern durchgeführt und wurde durch dreimaliges Aufkochen der DNS-Lösung (10 µg/ml in 0,1 × SSC) für je 10 min mit zwischenzeitlicher Abkühlung auf 0° C bewirkt.

Bei der Ermittlung der Inkubationstemperatur wurde ein G+C-Verhältnis von 39% zugrunde gelegt, obgleich die als *P. acidilactici* bezeichneten Stämme, mit Ausnahme von Stamm DSM 20333, einen um durchschnittlich 4% höheren G+C-Anteil aufweisen. Die Inkubation wurde daher, falls nicht anders angegeben, bei 61° C (25° unter *T_m*) 36 h lang durchgeführt. Nach Versuchsende wurden die Filter dreimal mit kalter 3 × SSC-Lösung gewaschen und im Vakuumofen bei 70° C getrocknet.

Die Messung der Radioaktivität erfolgte in Gegenwart von 4 ml Scintillationsflüssigkeit (3 g PPO, 250 mg POPOP auf 1 l Toluol) mit Hilfe eines Flüssigkeits-Scintillationszählers (Packard Tricarb 4388). Die Homologiewerte wurden in Prozent ausgedrückt und nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Homologiewert} = \frac{\text{Prozent gebundene } ^3\text{H-DNS im heterologen System}}{\text{Prozent gebundene } ^3\text{H-DNS im homologen System}} \times 100.$$

Ergebnisse und Diskussion

1. Ermittlung der Hybridisierungsbedingungen

Zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Hybridisierung wurden an filtergebundener DNS (15 µg) des Stammes *Pediococcus pentosaceus* ssp. *intermedius* (DSM 20280) mit ³H-Tritium-markierter DNS (0,1 µg) desselben Stammes bei verschiedenen Salz- und Formamid-Konzentrationen Reassoziationsversuche durchgeführt.

Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, ist bei den Versuchen ohne Formamidzusatz die Bindung in hohem Ausmaß vom Salzgehalt des Inkubationsgemisches abhängig. Während in 1 × SSC die Reassoziationsdauer langsam ansteigt und nach 46 h mit 28% nur eine geringe Bindung erreicht, liegen die in 3 × und 6 × SSC ausgeführten Versuche schon nach 6,5 h deutlich höher und erreichen nach 22 h ihr Maximum. Längere Hybridisierungszeiten bewirken jedoch ein Ablösen der Duplices vom Filter, wie die Bestimmung der filtergebundenen DNS nach Versuchsende zeigte. Der Zusatz von Formamid, das durch die Reduzierung der thermischen Stabilität (Conaughy et al., 1969) eine Hybridisierung bei tieferen Temperaturen ermöglicht, weist gegenüber den Versuchen ohne Formamid deutliche Vorteile auf. Zwar liegt die Bindung am Anfang des Versuches unter derjenigen, die in 6 × SSC erreicht wurde, jedoch ist die Bindung der Duplices am Filter auch nach 46 h noch stabil. Da steigende Mengen Formamid eine Viskositätserhöhung

aber auch aus Bierhefe und gärendem Gemüse isoliert worden waren, wurden diejenigen mit extrem voneinander abweichenden Merkmalskombinationen sowie der von Garvie (1974) für *P. pentosaceus* vorgeschlagene Neotyp-Stamm NCDO 990 (= DSM 20336) berücksichtigt.

Die fünf untersuchten Stämme von *P. pentosaceus* (DSM 20280, DSM 20281, DSM 20282, DSM 20283 und DSM 20336) zeigen untereinander so hohe Homologie-Werte (86–100%), daß sie als genetisch identisch angesprochen werden können. Gegenüber allen anderen *Pediococcus*-Stämmen wurden Homologiewerte unter 25% gefunden, was für eine deutliche Abgrenzung der Art *P. pentosaceus* gegenüber den anderen Arten der Gattung spricht.

Nach der bisher üblichen Interpretation der DNS/DNS-Hybridisierungsergebnisse sprechen Homologiewerte von über 65% für einen hohen Verwandtschaftsgrad (Stämme einer Art), wobei die Abtrennung von Unterarten insbesondere im Bereich um 70% diskutiert werden kann. Dagegen weisen Homologiewerte zwischen 25 und 65% auf eine mäßige Verwandtschaft hin (Stämme verschiedener Arten) und bei Homologiewerten unter 25% liegen nur entfernt verwandtschaftliche Beziehungen vor (Steigerwalt et al., 1976).

Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, daß die von Back u. Weiß (Manuskript in Vorbereitung) wegen der mit Ausnahme der Ribose fehlenden Pentosen-Vergärung als *P. pentosaceus* ssp. *intermedius* beschriebenen Stämme DSM 20280 und DSM 20283 eine hohe Homologie (87–98%) mit den typischen Vertretern der Art *P. pentosaceus* aufweisen. Wenn auch die Hybridisierungsergebnisse gegen eine Unterart „*intermedius*“ sprechen, so ist auf Grund der deutlichen Unterschiede im Phänotyp eine Abtrennung dieser Stämme als Unterart durchaus sinnvoll, zumal auch Stämme mit vergleichbaren Merkmalskombinationen in der Literatur bisher meist nicht als *P. pentosaceus* identifiziert wurden, sondern den hinsichtlich ihres Zuckerspektrums nahestehenden Arten *P. damnosus* oder *P. parvulus* zugeordnet wurden.

Insgesamt zeigten sich bei den fünf untersuchten Stämmen Unterschiede in der Vergärung von Arabinose, Xylose, Rhamnose, Trehalose, Lactose, Saccharose, Melibiose, Raffinose, Salicin und Amygdalin. Derartige Diskrepanzen zwischen der Homologie im Genotyp einerseits und Unterschieden im Phänotyp, speziell im Spektrum vergärbare Kohlenhydrate andererseits wurden auch bei DNS/DNS-Homologie-Untersuchungen im entfernteren Verwandtschaftskreis der Pediokokken gefunden (*Bifidobacterium globosum*-Gruppe, Crociani et al., 1970; *Lactobacillus sake*, Lauer, pers. Mitteilung; *Bifidobacterium lactentis*-Gruppe, Lauer u. Kandler, Manuskript in Vorbereitung).

2.2. *Pediococcus acidilactici* (Lindner, 1887)

Von insgesamt 15 Stämmen, die alle die für *P. acidilactici* charakteristischen Merkmale aufweisen (Wachstum bei 50°C sowie überdurchschnittlich hohes G + C-Verhältnis von 42–43%) und untereinander Unterschiede in der Verwertung von Xylose, Rhamnose, Trehalose, Lactose und Mannit zeigen, wurden die Kulturen DSM 20284 und B Sal1d für die Homologieuntersuchungen herangezogen. Als Sammlungstamm wurde der von Garvie (1974) für *P. acidilactici* vorgeschlagene Neotyp-Stamm NCDO 1859 (= DSM 20333) berücksichtigt.

Die beiden Stämme DSM 20284 und B Sal1d, von denen letzterer durch eine schwache Arabinose-Vergärung sowie fehlende Xylose- und Rhamnose-Vergärung besonders auffiel, weisen mit 83 bzw. 88% Homologie in ihrer DNS eine hohe genetische Verwandtschaft auf. Zu allen anderen *Pediococcus*-Stämmen besteht dagegen mit maximal 23% Homologie nur eine geringe Verwandtschaft.

Bemerkenswerterweise zeigt der für *P. acidilactici* vorgeschlagene Neotyp-Stamm DSM 20333 mit Homologiewerten unter 20% nur geringe verwandtschaftliche Beziehungen zu den beiden anderen Stämmen von *P. acidilactici*, während mit den Stämmen von *P. pentosaceus* mit 93 bzw. 100% Homologie eine hohe Verwandtschaft im Genotyp besteht. Auch bei den vorausgegangenen physiologisch-biochemischen Untersuchungen verhielten sich dieser Stamm ebenso wie der von Kitahara als *P. acidilactici* erhaltene Stamm P.lin (die beiden Stämme sind vermutlich identisch) wie typische Vertreter der Art *P. pentosaceus*.

Wenn auch die beiden Stämme DSM 20284 und B Sal1d mit denen von *P. pentosaceus* mit ca. 20% gegenüber allen übrigen Teststämmen mit weniger als 10% Homologie eine gewisse Verwandtschaft erkennen lassen, so können wir uns dennoch nicht der Meinung von Coster u. White (1964) anschließen, die die Berechtigung einer eigenen Art *P. acidilactici* ablehnen und diese Stämme der Art *P. cerevisiae* (im Sinne dieser Autoren) zuordnen. Homologiewerte von nur 20% sprechen auf jeden Fall für deutlich differenzierte Arten.

2.3. *Pediococcus parvulus* (Günther u. White, 1961)

Der Typstamm der Art *P. parvulus* (NCDO 1634 = DSM 20332) zeigte bei unseren Untersuchungen zu keiner anderen Art eine hohe genetische Verwandtschaft. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zur Auffassung von Kitahara (1974), wonach es sich bei *P. parvulus* um ein Synonym von *P. pentosaceus* handelt. So wurden zwischen diesen beiden Arten Homologie-

werte von nur 6–7% gefunden. Eine mäßige Verwandtschaft besteht dagegen zu der bierschädlichen Art *P. damnosus* (30–36%) sowie zu zwei ebenfalls bierschädlichen und als *Pediococcus* species (Gruppe IVa) bezeichneten Stämmen (30–40%).

2.4. *Pediococcus* Species (Gruppe IVa)

Zwei Stämme (DSM 20285 und DSM 20287), die aus einer Gesamtzahl von 12 aus Wein, Bier, Bierhefe und Sauerkraut isolierten Kulturen ausgewählt wurden, zeigen untereinander mit 90% eine so hohe Homologie, daß sie als genetisch identisch angesprochen werden müssen. Diese beiden Stämme unterscheiden sich in der Verwertung von Dextrin und α -Methylglucosid, im Wachstum bei 37°C sowie in Gegenwart von 6% NaCl und in der Acetoinbildung. Phänotypisch stehen sie *P. parvulus* nahe. Unterschiede zu dieser Art bezüglich klassischer Merkmale bestehen in der Vergärung von Galaktose und Lactose, außerdem in der unterschiedlichen Mobilität der Lactat-Dehydrogenasen, weshalb diese Stämme bei vorausgegangenen Untersuchungen (Back u. Weiß, Manuskript in Vorbereitung) in der physiologischen Gruppe IVa zusammengefaßt wurden.

Ähnlich wie *P. parvulus* zeigen auch diese bislang nicht beschriebenen Stämme eine gewisse Verwandtschaft zu den Stämmen von *P. damnosus* (38–54%). Zu allen übrigen Teststämmen besteht dagegen mit Homologiewerten unter 10% nur eine geringe Übereinstimmung hinsichtlich des Genotyps.

Wie bereits erwähnt, weisen Homologiewerte zwischen 25 und 65% lediglich auf eine mäßige Verwandtschaft hin. Legt man also diese Richtwerte bei der Beurteilung zugrunde, so erscheint eine Abtrennung der vorliegenden Stämme als eigene Art sinnvoll. Da uns aber bisher nur insgesamt 12 Isolate zur Verfügung stehen, soll die taxonomische Stellung dieser Gruppe vorerst noch offen gelassen werden.

2.5. *Pediococcus damnosus* (Claussen, 1903)

Aus einer Gesamtzahl von über 400 aus Bier und Bierhefe isolierten und als *P. damnosus* bestimmten Stämmen, die sich insbesondere in der Vergärung einiger Kohlenhydrate, wie Galaktose, Maltose, Trehalose, Saccharose, Melecitose, Maltotriose, α -Methylglucosid, Salicin und Amygdalin unterscheiden, wurden für diese Untersuchung drei Stämme mit stark voneinander abweichenden Merkmalskombinationen sowie der von Garvie (1974) vorgeschlagene Neotyp-Stamm NCDO 1832 (= DSM 20331) ausgewählt.

Die Hybridisierungsergebnisse zeigen, daß ähnlich wie bei *P. pentosaceus* die Unterschiede in physiologischen Leistungen bei den Reassoziationsversuchen nicht zum Ausdruck kommen. Alle vier Stämme weisen

untereinander Homologiewerte von über 80% auf, so daß sie als genetisch hoch verwandte Stämme angesehen werden müssen.

Wie bereits oben erwähnt, bestehen gewisse verwandtschaftliche Beziehungen zu *P. parvulus* und zu den beiden Stämmen der Gruppe IVa, während gegenüber allen anderen *Pediococcus*-Stämmen keine nähere Verwandtschaft festgestellt werden konnte (Homologiewerte unter 10%).

2.6. *Pediococcus dextrinicus*¹

Von insgesamt 6 Kulturen, die aus Silagen und Bier isoliert worden waren und Unterschiede in der Vergärung von Trehalose, Lactose, Inulin und α -Methylglucosid aufweisen, wurde der Stamm DSM 20335 für die Homologiestudien ausgewählt. Dieser Stamm, den Günther u. White (1961) der von ihnen aufgestellten Gruppe III zuordneten und der später von Coster u. White (1964) als „Variation“ von *P. cerevisiae* beschrieben wurde, zeigte aber sowohl zu *P. cerevisiae* (im Sinne der genannten Autoren) als auch zu den anderen Arten mit 4–8% Homologie eine nur weit entfernte Verwandtschaft.

Eine besondere taxonomische Stellung des Stammes DSM 20335 wird auch dadurch unterstrichen, daß bei der Verwertung von Kohlenhydraten reines L-Lactat gebildet wird, während die anderen *Pediococcus*-Arten, mit Ausnahme von *P. halophilus*, DL-Lactat bilden. Darüber hinaus ist im Gegensatz zu allen anderen *Pediococcus*-Arten die L-Lactat-Dehydrogenase mit Fructose-1,6-di-Phosphat aktivierbar (Back u. Weiß, in Vorbereitung). Auffallend ist außerdem die schnelle und kräftige Dextrin- und Stärke-Vergärung. Im Gegensatz dazu wird von Kitahara (1974) bei der Gattungsbeschreibung ausdrücklich darauf hingewiesen, daß Stärke von keiner *Pediococcus*-Art vergoren wird.

Diese auf Grund phänotypischer Merkmale zum Ausdruck kommende Eigenständigkeit, die gleichermaßen auch für die aus Bier isolierten Stämme gilt, veranlaßte Back (1974), eine neue Art, nämlich *Pediococcus dextrinicus*, aufzustellen. Diese Auffassung konnte nunmehr durch die DNS/DNS-Homologieuntersuchungen eindeutig bestätigt werden.

2.7. *Pediococcus halophilus* (Mees, 1934)

Von drei als *P. halophilus* bezeichneten Sammlungsstämmen wurde der Stamm DSM 20339, der laut NCDO-Katalog mit dem Originalstamm Tc.1 (*Tetradococcus* No. 1 Orla Jensen) von Mees (1934) identisch ist,

¹ Die Beschreibung und Benennung des Typ-Stammes von *Pediococcus dextrinicus* ist in Vorbereitung

in die Untersuchungen einbezogen. Diese Stämme, unter denen sich auch zwei früher als *P. soyae* (Sakaguchi, 1958) beschriebene Kulturen befanden, unterscheiden sich in der Verwertung von Lactose, Melibiose, Raffinose, Mannit und Sorbit. Gemeinsam ist allen Stämmen die Fähigkeit, bis 20% NaCl im Medium zu tolerieren. Wie *P. pentosaceus* vergären alle drei Stämme Arabinose und Ribose. Andererseits besteht in der Verwertung von Melecitose eine Übereinstimmung mit fast allen Stämmen von *P. damnosus*.

Die Homologiedaten zeigen jedoch deutlich, daß weder mit diesen Arten noch mit irgendeiner anderen untersuchten Art eine Verwandtschaft besteht (Homologiewerte zwischen 2 und 6%).

Danksagung. Wir danken Herrn Prof. Dr. O. Kandler für seine wertvollen Ratschläge während der Durchführung und Niederschrift der Arbeit sowie Frl. Ingrid Pomper für ihre gewissenhafte Hilfe bei der Präparation der DNS.

Literatur

- Back, W.: Zur Artzugehörigkeit bierschädlicher Kokken. Diss., Techn. Univ. München (1974)
- Balcke, J.: Über fauligen Geruch des Bieres. Wochenschr. Brau. **1**, 257 (1884)
- Birnstiel, M. L., Seels, B. H., Purdom, I. F.: Kinetic complexity of RNA molecules. J. Mol. Biol. **63**, 21–39 (1972)
- Burton, K.: Determination of DNA concentration with diphenylamine. In: Methods in Enzymology. Vol. XII, Part B (L. Grossman, K. Moldave, eds.), pp. 163–166. New York: Academic Press 1968
- Claussen, N. H.: Etude sur les bactéries dites sarcines et sur les maladies qu'elles provoquent dans la bière. C. R. Trav. Lab. Carlsberg **6**, 64–83 (1903)
- Conaughy Mc, B. L., Laird, C. D., Mc Carthy, B. J.: Nucleic acid reassociation in formamid. Biochemistry **8**, 3289–3295 (1969)
- Coster, E., White, H. R.: Further studies of the genus *Pediococcus*. J. Gen. Microbiol. **37**, 15–31 (1964)
- Crociani, F., Scardovi, V., Trovatelli, L. D.: Mannitol fermenting bifids from rumen and their DNA homology relationships. Ann. Microbiol. Enzimol. **20**, 99–106 (1970)
- Darby, G. K., Jones, A. S., Kennedy, J. F., Walker, R. T.: Isolation and analysis of the nucleic acids and polysaccharides from *Clostridium welchii*. J. Bacteriol. **103**, 159–165 (1970)
- Denhardt, D. T.: A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. **23**, 641–646 (1966)
- Flavell, R. A., Birfelder, E. J., Sanders, J. P. M., Borst, P.: DNA-DNA hybridisation on nitrocellulose filters. 1. General considerations and non-ideal kinetics. Eur. J. Biochem. **47**, 535–543 (1974)
- Garvie, E. I.: Nomenclatural problems of the pediococci. Request for an opinion. Int. J. Syst. Bacteriol. **24**, 301–306 (1974)
- Günther, H. L., White, H. R.: The cultural and physiological characters of the pediococci. J. Gen. Microbiol. **26**, 185–197 (1961)
- Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology: Opinion 52. Conservation of the generic name *Pediococcus* Claussen with the type species *Pediococcus damnosus* Claussen. Int. J. Syst. Bacteriol. **26**, 292 (1976)
- Kitahara, K.: Genus III. *Pediococcus* Balcke 1884, 257. In: Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. (R. E. Buchanan, N. E. Gibbons, eds.), pp. 513–515. Baltimore: Williams and Wilkins 1974
- Lindner, P.: Über ein neues in Malzmaischen vorkommendes, Milchsäure bildendes Ferment. Wochenschr. Brau. **4**, 437–440 (1887)
- Man, J. C. de, Rogosa, M., Sharpe, M. E.: A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bact. **23**, 130–135 (1960)
- Marmur, J.: A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganisms. J. Mol. Biol. **3**, 208–218 (1961)
- Mees, R. H.: Onderzoekingen over de biersarcina. Diss., Techn. Hochsch. Delft (1934)
- Sakaguchi, K.: Studies on the activities of bacteria in soy sauce brewing. Part III. Taxonomic studies on *Pediococcus soyae* nov. sp., the soy sauce lactic acid bacteria. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan **22**, 353–362 (1958)
- Sharpe, M. E., Fryer, T. F., Smith, D. G.: Identification of the lactic acid bacteria. *Pediococcus*. In: Identification methods for microbiologists, Part A (B. M. Gibbs, F. A. Skinner, eds.), pp. 70–71. London-New York: Academic Press 1966
- Steigerwalt, A. G., Fanning, G. R., Fife-Asbury, M. A., Brenner, D. J.: DNA relatedness among species of *Enterobacter* and *Serratia*. Can. J. Microbiol. **22**, 121–137 (1976)

Eingegangen am 14. November 1977