

Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Institut für Mikrobiologie und Weinforschung

**Entwicklung und Anwendung molekularbiologischer
Methoden zur Art- und Stamm-Identifizierung
pro- und eukaryotischer Organismen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Jens Pfannebecker
geb. am 31.10.1978 in Mainz

Mainz, 2008

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von August 2005 bis Juni 2008 am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Dekan:

1. Berichterstatter

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Dezember 2008

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind teilweise in folgenden Publikationen und Posterpräsentationen veröffentlicht:

Pfannebecker, J., Fröhlich, J., 2008. Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of pediococci. *International Journal of Food Microbiology* 128, 288-296.

Fröhlich, J., Röder, C., König, H., Pfannebecker, J., 2008. Verbreitung und Nachweis der Hefe *Brettanomyces bruxellensis* in rheinhessischen Rotweinen. In Jahresbericht 2007. Forschungsring des Deutschen Weinbaus (FDW) bei der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft (DLG) e. V. Fachzentrum Land- und Ernährungswissenschaft, Frankfurt am Main.

Fröhlich, J., Pfannebecker, J., 2007. Species-independent DNA fingerprint analysis with primers derived from the *NotI* identification sequence. Patent application WO 2007/131776.

Fröhlich, J., Pfannebecker, J., 2006. Spezies-unabhängiges Nachweisverfahren für biologisches Material. Deutsche Patentanmeldung DE 10 2006 022 569 A1.

Fröhlich, J., Röder, C., Pfannebecker, J., Hirschhäuser, S., 2005. Nachweis eines Lebenskünstlers. *Das deutsche Weinmagazin* 21, 26-28.

Fröhlich, J., Pfannebecker, J., Röder, C., König, H., 2008. Identification and discrimination of species and strains by a new PCR cluster method: Nested specific amplified polymorphic DNA-PCR (nSAPD-PCR). Posterpräsentation. 14. Internationales Oenologisches Symposium, Trier.

Pfannebecker, J., Fröhlich, J., 2008. Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of pediococci. Posterpräsentation. VAAM-Jahrestagung, Frankfurt.

Fröhlich, J., Pfannebecker, J., 2007. Identification and discrimination of species and strains by a new PCR-cluster-method: Nested specific amplified polymorphic DNA-PCR (nSAPD-PCR). Posterpräsentation. VAAM-Jahrestagung, Osnabrück.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Hefen und Milchsäurebakterien in der Weinbereitung	1
1.2 Durch Milchsäurebakterien und Hefen verursachte Weinfehler	3
1.3 Die Gattung <i>Pediococcus</i>	7
1.4 Methoden zur Identifizierung von Mikroorganismen	9
1.4.1 Phänotypische Methoden	10
1.4.2 Molekularbiologische Methoden	11
1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit	16
2. Material und Methoden	19
2.1 Geräte und Hilfsmittel	19
2.2 Chemikalien	20
2.3 Biochemikalien, Enzyme und Kits	21
2.4 Oligonukleotide (Primer)	22
2.5 Oligonukleotide (Cy3-markierte Sonden)	25
2.6 Puffer und Lösungen	25
2.6.1 DNA-Isolierung	25
2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese	26
2.6.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung	26
2.6.4 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese	27
2.7 Nährmedien	28
2.8 Organismen	29
2.8.1 <i>Pediococcus</i> -Stämme aus Kultursammlungen	29
2.8.2 <i>Pediococcus</i> -Eigenisolate aus Wein	31
2.8.3 <i>Oenococcus oeni</i> -Stämme	33
2.8.4 Weitere Milchsäurebakterien	34
2.8.5 Hefe-Stämme	36
2.8.6 Weinreben	38
2.8.7 Mäuse	39
2.8.8 Mensch	39
2.9 Kultivierung	40
2.9.1 Isolierung und Kultivierung der Milchsäurebakterien	40
2.9.2 Qualitativer Nachweis der Exopolysaccharid-Synthese	41

2.9.3 Isolierung und Kultivierung der Hefen.....	42
2.10 DNA-Isolierung.....	42
2.10.1 DNA-Isolierung aus Gram-positiven Bakterien.....	42
2.10.2 DNA-Isolierung aus Hefen.....	43
2.10.3 DNA-Isolierung aus Weinreben.....	43
2.10.4 DNA-Isolierung aus Gewebe (<i>Mus musculus</i>).....	43
2.10.5 DNA-Isolierung aus menschlichen Blutzellen.....	43
2.10.6 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit.....	44
2.11 Analyse ribosomaler Gensequenzen.....	44
2.11.1 Amplifizierung der 16S rDNA (Milchsäurebakterien).....	45
2.11.2 Amplifizierung der ITS-Regionen (Hefen).....	46
2.11.3 Amplifizierung der 23S rDNA zur Sequenzierung (<i>Pediococcus</i>).....	46
2.11.4 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	46
2.11.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	47
2.11.6 Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	47
2.12 Phylogenetische Untersuchung der Gattung <i>Pediococcus</i>.....	48
2.13 Identifizierung von Pediokokken mit spezifischen PCR-Primern.....	48
2.13.1 Gattungs-Identifizierung.....	48
2.13.2 Art-Identifizierung durch Multiplex PCR.....	49
2.14 Generierung von rRNA-Sekundärstrukturen mit Structure Star.....	51
2.15 Fluoreszenz in situ Hybridisierung.....	53
2.16 Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese.....	55
2.17 Untersuchung von Genen zur Exopolysaccharid-Synthese.....	57
2.18 Nested Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR.....	58
2.18.1 Durchführung der SAPD-PCR.....	58
2.18.2 Durchführung der nested SAPD-PCR.....	60
2.18.3 Agarose-Gelelektrophorese zur (nested) SAPD-PCR.....	60
2.18.4 Cluster-Analyse.....	61
2.19 Sequence Characterized Amplified Region-PCR.....	62
2.19.1 Aufreinigung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen.....	63
2.19.2 Klonierung.....	63
2.19.3 Plasmid-Isolierung.....	64
2.19.4 Sequenzierung, Sequenzanalyse und Primer Design.....	64
2.19.5 PCR mit spezifischen SCAR-Markern.....	64

3. Ergebnisse	67
3.1 Sequenzierung ribosomaler Gensequenzen	67
3.1.1 16S rDNA (Milchsäurebakterien).....	67
3.1.2 ITS-Region (Hefen)	68
3.1.3 23S rDNA (<i>Pediococcus</i>)	68
3.2 Phylogenetische Analyse der Gattung <i>Pediococcus</i>	69
3.3 Identifizierung der Pediokokken durch spezifische PCR-Primer	71
3.3.1 Gattungs-Identifizierung	71
3.3.2 Art-Identifizierung durch Multiplex PCR	72
3.4 Erstellung der 23S rRNA-Sekundärstrukturen	78
3.5 Identifizierung der <i>Pediococcus</i>-Arten durch FISH.....	78
3.6 DGGE zur Differenzierung von Milchsäurebakterien	81
3.7 Untersuchung der Gene zur Exopolysaccharid-Synthese.....	82
3.8 Genotypisierung durch nested SAPD-PCR.....	84
3.8.1 Art-Identifizierung und Cluster-Analyse der Pediokokken	84
3.8.2 Identifizierung neu isolierter <i>Oenococcus oeni</i> -Stämme aus Wein.....	87
3.8.3 Cluster-Analyse der <i>Oenococcus oeni</i> -Stämmen aus Starterkulturen	88
3.8.4 Identifizierung der Milchsäurebakterien aus Starterkulturen	92
3.8.5 Differenzierung weiterer Milchsäurebakterien.....	92
3.8.6 Differenzierung der <i>Dekkera</i> / <i>Brettanomyces bruxellensis</i> -Stämme.....	94
3.8.7 Differenzierung von Hefen unterschiedlicher Gattungen.....	98
3.8.8 <i>Pediococcus parvulus</i> - und <i>Brettanomyces bruxellensis</i> -Isolate aus denselben Weinproben	101
3.8.9 Differenzierung verschiedener Weinreben	104
3.8.10 Cluster-Analyse mit Mäusen	106
3.8.11 Cluster-Analyse menschlicher Individuen.....	107
3.9 Art-Identifizierung durch SCAR-PCR.....	110
3.9.1 Generieren artspezifischer SCAR-Marker.....	110
3.9.2 SCAR-PCR mit spezifischen Primern	115
3.9.3 Multiplex PCR mit SCAR-Primern	120
4. Diskussion	121
4.1 Art-Identifizierung durch vergleichende rDNA-Sequenzanalysen.....	121
4.2 Die Phylogenie der Gattung <i>Pediococcus</i>	122
4.3 Identifizierung der Pediokokken auf Basis von 23S rDNA-Sequenzen.....	123

4.4 Generierung von rRNA-Sekundärstrukturen	125
4.5 Identifizierung der Pediokokken durch FISH	126
4.6 Differenzierung der Milchsäurebakterien durch DGGE.....	127
4.7 Nachweis der Gene zur Exopolysaccharid-Synthese.....	129
4.8 Die Anwendung der nested SAPD-PCR	131
4.8.1 Milchsäurebakterien	132
4.8.2 Hefen.....	140
4.8.3 <i>Brettanomyces bruxellensis</i> - und <i>Pediococcus parvulus</i> -Stämme aus denselben Weinproben	144
4.8.4 Höhere Eukaryoten	146
4.9 Entwicklung Art-spezifischer SCAR-Marker	149
5. Ausblick.....	152
6. Zusammenfassung.....	153
7. Literatur	155
8. Anhang	174
8.1 Ribosomale Gensequenzen	174
8.1.1 16S rDNA-Sequenzen (Milchsäurebakterien).....	174
8.1.2 ITS-Sequenzen (Hefen)	177
8.2 Alignment der 23S rDNA-Sequenzen (Milchsäurebakterien).....	178
8.3 23S rRNA-Sekundärstrukturen der <i>Pediococcus</i>-Typstämme	202
8.4 DNA Fingerprint-Bandenmuster der Pediokokken	212
8.5 Datenmatrizen zur Cluster-Analyse	213
8.5.1 <i>Pediococcus</i> -Typstämme	213
8.5.2 <i>Oenococcus oeni</i> -Stämme aus Starterkulturen	214
8.5.3 <i>Dekkera</i> / <i>Brettanomyces bruxellensis</i> -Stämme	215
8.5.4 Hefe-Stämme unterschiedlicher Gattungen	216
8.5.5 <i>Brettanomyces bruxellensis</i> - und <i>Pediococcus parvulus</i> -Stämme aus denselben Weinproben	217
8.5.6 Mäuse.....	218
8.5.7 Menschliche Individuen.....	218
8.6 Gensequenzen zum Generieren der Primer für die SCAR-PCR.....	219

Abkürzungen

ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
Abb.	Abbildung
AFLP	Amplified Fragment-Length Polymorphism
AP-PCR	Arbitrarily Primed PCR
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Cy3	Fluoreszenzfarbstoff Indocarbocyanin
DABCO	1,4 Diazabicyclo-[2.2.2]oktan
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid-Hydrat
deion.	Deionisiert
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese
DIR-PCR	Diverged Inverted Repeats-PCR
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPS	Exopolysaccharid
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GC	Guanin + Cytosin-Gehalt [%]
ITS	Internal Transcribed Spacer
Kap.	Kapitel
KBE	Koloniebildende Einheiten
kDa	Kilodalton
LSU	Large Subunit (große Untereinheit)
M	Molar
min	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MSB	Milchsäurebakterien
NCBI	National Center of Biotechnology Information
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatpuffer)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
rDNA	Ribosomal Desoxyribonucleic Acid (ribosomale Desoxyribonukleinsäure)

REP	Repetitive Extragenic Palindromic
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid (ribosomale Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
s	Sekunden
SAPD	Specifically Amplified Polymorphic DNA
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
SSU	Small Subunit (kleine Untereinheit)
STR	Short Tandem Repeat
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T _m [° C]	melting temperature (Schmelztemperatur)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween 80	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monooleat
U	Unit/s (Einheiten)
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
V	Volt
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid
YPG	Yeast extract-Peptone-Glucose

1. Einleitung

1.1 Hefen und Milchsäurebakterien in der Weinbereitung

Das Wachstum und die biochemische Aktivität von Mikroorganismen während der Weinfermentation ist abhängig von sich verändernden physischen und chemischen Bedingungen wie pH-Wert, Temperatur und Nährstoffversorgung in der Mikroumgebung des Mosts. Darüber hinaus wirken sich Interaktionen zwischen Mikroorganismen auf das Wachstum einzelner Organismen aus. Da während des komplexen Prozesses der Weinfermentation eine Vielzahl unterschiedlicher Hefen und Bakterien beteiligt sein können, ist eine genaue Abschätzung des Vorkommens bestimmter Mikroorganismen oft sehr schwierig.

Die apiculate Hefe *Hanseniaspora uvarum* und deren asexuelle anamorphe Form *Kloeckera apiculata* sind die vorherrschenden Hefen auf den Weintrauben und machen dort üblicherweise mehr als die Hälfte der Hefeflora aus (Pretorius et al., 1999). Weitere wichtige Hefen, die auf Weintrauben und im Weinberg zu finden sind, umfassen die Gattungen *Metschnikowia*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Torulopsis*, *Sporobolomyces*, *Kluyveromyces* und *Hansenula* (Barnett et al., 1972; Davenport, 1974, Rosini et al., 1982; Moore et al., 1988). *Saccharomyces*-Hefen sind auf beschädigten Trauben in Zellenzahlen von 10^5 bis 10^6 Koloniebildende Einheiten (KBE) pro Beere zu finden (Mortimer & Polsinelli, 1999). Sobald die Trauben verarbeitet werden, kann es zu einer Kontaminierung mit weiteren Mikroorganismen kommen, da Pilze, Hefen und Bakterien über Geräte und Leitungen auf die Weintrauben übertragen werden können (Peynaud & Domerco, 1959). Der Most enthält schließlich eine komplexe Flora bestehend aus unterschiedlichen Hefen und Bakterien. Häufig vorkommende Hefen in Traubenmost und Wein gehören den Gattungen *Metschnikowia*, *Dekkera* / *Brettanomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia*, *Torulasporea*, *Debaryomyces*, *Saccharomycodes*, *Zygosaccharomyces* und *Schizosaccharomyces* an. Darüber hinaus können weitere Hefen vorkommen. Die während der alkoholischen Gärung dominierende Hefe ist *Saccharomyces cerevisiae*.

Neben Hefen spielt das Wachstum von Milchsäurebakterien (MSB) während der Weinfermentation eine wichtige Rolle. Intakte, unbeschädigte Weintrauben enthalten $< 10^3$ KBE pro Gramm, daher sind die Zellzahlen in Traubenmost zu Beginn der Verarbeitung gering (Lanfong-Lafourcade et al., 1983). Sobald die Beeren gepresst werden, beginnt das Wach-

stum der Milchsäurebakterien, wobei unterschiedliche Arten zu verschiedenen Zeiten der Weinherstellung dominieren können. Die Milchsäurebakterien in Traubenmost und Wein lassen sich zwei Familien zuordnen: Die der *Lactobacillaceae*, welcher die Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus* angehören, und die Familie der *Leuconostocaceae*, die die Gattungen *Leuconostoc*, *Weissella* und *Oenococcus* umfasst. Die Milchsäurebakterien unterscheiden sich morphologisch in Stäbchen und Kokken. Bezüglich ihres Stoffwechsels können sie in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden: homofermentative, fakultativ heterofermentative und heterofermentative Milchsäurebakterien (Tab. 1).

Tab. 1. Häufig vorkommende Milchsäurebakterien in der Weinbereitung (Quellen: Dittrich & Großmann, 2005; Ribéreau-Gayon et al., 2006; Fugelsang & Edwards, 2007)

Familie	Form	Stoffwechsel	Spezies
<i>Lactobacillaceae</i>	Stäbchen	fakultativ heterofermentativ	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
		obligat heterofermentativ	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus buchneri</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus fructivorans</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i>
	Kokken	obligat homofermentativ	<i>Pediococcus damnosus</i> <i>Pediococcus parvulus</i> <i>Pediococcus inopinatus</i>
		fakultativ heterofermentativ	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Leuconostocaceae</i>	Kokken	obligat heterofermentativ	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>W. paramesenteroides</i> <i>Oenococcus oeni</i>

In einer umfangreichen Studie von Costello et al. (1983) wurden die Arten *Lactobacillus hilgardii*, *L. plantarum*, *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. jensenii*, *Oenococcus oeni* und Arten der Gattung *Pediococcus* zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Fermentierung aus Traubenmost und Wein isoliert. In ähnlichen Studien konnten weitere Arten wie *L. casei*, *L. curvatus* und *Leuconostoc mesenteroides* isoliert werden (Fleet et al., 1984; Davis et al., 1986; Sieiro et al., 1990; Lonvaud-Funel et al., 1991).

Das Wachstum und der Rückgang der einzelnen Milchsäurebakterien-Arten ist abhängig von vielen Faktoren. Hohe pH-Werte (> 3,5) begünstigen das Wachstum der *Lactobacillus*-

und *Pediococcus*-Arten, während niedrigere pH-Werte ($< 3,5$) das Wachstum der Spezies *Oenococcus oeni* fördern (Fleet, 1998; Osborne & Edwards, 2005). Weitere Bedingungen, die das Wachstum der Milchsäurebakterien im Wein beeinflussen sind neben dem Nährstoffangebot, dem Alkoholgehalt, der Temperatur und der Zugabe von SO_2 und Lysozym auch die Wechselwirkungen mit Hefen, Pilzen und anderen Bakterien. So kommt es infolge der Ethanol-Bildung durch *Saccharomyces cerevisiae* zu einem starken Rückgang der Milchsäurebakterien in den ersten Wochen der alkoholischen Gärung. Typischerweise kommt es erst nach dem Ende der alkoholischen Gärung zu einem starken Anstieg der Bakterienpopulation, da die autolytierten Hefen das Wachstum der Milchsäurebakterien durch Freisetzung ihrer Zellinhaltsstoffe fördern.

1.2 Durch Milchsäurebakterien und Hefen verursachte Weinfehler

Die Stoffwechselaktivität einiger Milchsäurebakterien kann zur Bildung unerwünschter Verbindungen führen, die Weinfehler verursachen können. Der Essigstich, d.h. die Bildung sensorisch wahrnehmbarer Konzentrationen an flüchtiger Säure, ist der häufigste und folgenschwerste Weinfehler (Dittrich, 1984). Acetat ist die Hauptkomponente flüchtiger Säure. Essigsäurebakterien der Gattungen *Acetobacter*, *Gluconobacter* und *Gluconacetobacter* produzieren eine Mischung aus Acetat, Ethylacetat und Acetaldehyd durch die Oxydation von Glucose und Ethanol (Osborne & Edwards, 2005; Ribéreau-Gayon et al., 2006). Die wichtigsten Verursacher des Essigstichs im Wein sind jedoch die Milchsäurebakterien (Sponholz et al., 1982). Beim Abbau der Glucose durch heterofermentative Bakterien wie *O. oeni*, *L. kunkeei* und *L. brevis* entsteht Acetat als Nebenprodukt. Darüber hinaus kann Acetat beim Abbau von Citrat durch homo- und heterofermentative Milchsäurebakterien entstehen (Liu, 2002).

Ein weiterer durch Milchsäurebakterien verursachter Weinfehler ist der Milchsäureton, der im Wesentlichen durch Diacetyl geprägt wird (Dittrich & Großmann, 2005). Diacetyl zeichnet sich durch ein „Butteraroma“ aus mit einer sensorischen Wahrnehmungsgrenze von 0,2 bis 2,8 mg pro Liter in Weißweinen (Martineau et al., 1995). Während eine niedrige Diacetyl-Konzentration (1-3 mg / l) sensorisch als „butterartig“ oder „nußartig“ wahrgenommen wird, dominiert diese Verbindung das Weinaroma in Konzentrationen von 5 bis 7 mg pro Liter, was zu einem ausgeprägten Weinfehler führt (Rankine et al., 1969). Diacetyl entsteht entweder als Nebenprodukt beim homo- oder heterofermentativen Zucker-

Abbau oder beim Abbau von Citrat (Fugelsang & Edwards, 2007). Dabei wird Citrat zunächst zu Acetat und Oxalacetat gespalten. Durch die Decarboxylierung des Oxalacetats entsteht Pyruvat. Letzteres wird erneut decarboxyliert und durch die Bindung an Thiamin Pyrophosphat (TPP) in „aktives Acetaldehyd“ umgewandelt. Diese Verbindung reagiert mit einem zweiten Molekül Pyruvat zu α -Acetolactat, das durch oxidative Decarboxylierung in Diacetyl umgewandelt wird (Ramos et al., 1995; Bartowsky & Henschke, 2004). Diacetyl kann weiter zu Acetoin und weiter zu 2,3-Butandiol reduziert werden (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Vor allem in säurearmen, trockenen Weinen kann das Wachstum von Milchsäurebakterien der Gattungen *Pediococcus* und *Lactobacillus* zur Exopolysaccharid-Bildung führen (Fugelsang & Edwards, 2007). Auch einige Stämme der Arten *Oenococcus oeni* und *Leuconostoc mesenteroides* sind zur Bildung von Exopolysacchariden in Wein fähig (Van Vuuren & Dicks, 1993; Montersino et al., 2008). Das daraus resultierende „Zäh- oder Lindwerden“ des Weines (engl.: „ropiness“ oder „oilness“) macht sich durch eine erhöhte Zunahme der Viskosität bemerkbar (Walling et al., 2005). Bei der Struktur des Exopolysaccharids der Spezies *Pediococcus parvulus* (Stamm 2.6) handelt sich um ein extrazelluläres β -D-Glucan mit einer Molekülgröße von ca. 800 kDa. Es besteht aus einer Hauptkette aus β -1,3-glycosidisch verknüpften Glucose-Monomeren, an der sich an jedem zweiten Glucosemolekül β -1,2-glycosidisch verknüpfte Seitenketten anschließen (Llaubères et al., 1990; Lonvaud-Funel, 1999; Werning et al., 2006; Abb. 1).

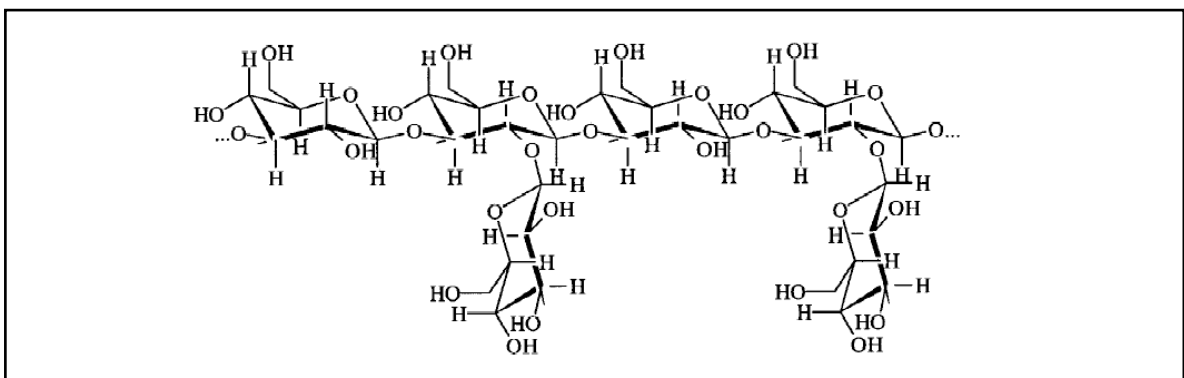


Abb. 1. Struktur des β -D-Glucans der Spezies *P. parvulus*, Stamm 2.6 (Lonvaud-Funel, 1999).

Die Strukturaufklärung des Exopolysaccharids eines *P. pentosaceus*-Stammes zeigte, dass neben Glucose auch andere Monosaccharide wie Fructose und Galactose vorkommen können (Manca de Nadra & Strasser de Saad, 1995). Bedingungen im Wein, die zu einer Zunahme des Bakterienwachstums führen, wie pH-Werte über 3,5 begünstigen auch die Zunahme der Exopolysaccharid-Bildung durch *P. damnosus* (Walling et al., 2005). Die

Ethanol-Toleranz einiger *Pediococcus*-Stämme beträgt oft mehr als 12 Vol. %. Außerdem zeigen einige Stämme noch ein normales Wachstum bei einem pH-Wert von 3,7 und einer Konzentration an freiem SO₂ bis 30 mg pro Liter (Lonvaud-Funel & Joyeux, 1988). Das Problem der Exopolysaccharid-Bildung kann während der Gärung und Lagerung des Weines auftreten (Du Toit & Pretorius, 2000). Bereits sehr niedrige Glucose-Konzentrationen (50-100 mg / l) reichen zur Exopolysaccharid-Bildung aus. Dies erklärt teilweise die Tatsache, dass das Zähwerden des Weines erst einige Monate nach der Abfüllung auftreten kann (Fugelsang & Edwards, 2007). Mit 10⁶ bis 5·10⁶ (*P. damnosus*) Zellen pro ml kann ein Wein beginnend bis deutlich zäh werden. Ab 5·10⁶ Zellen ist er schwer fehlerhaft (Dittrich & Großmann, 2005). Ab 10⁷ KBE pro ml ist ein Wein schließlich deutlich viskos (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Die Glucan-Bildung lässt sich in nährstoffarmen Medien wie Wein verstärkt beobachten. Zum Beispiel wurde in einem Medium, das 0,1 g Glucose pro Liter enthielt dreimal so viel Glucan gebildet wie in einem Medium mit 3 g Glucose. Außerdem wird bei gleicher Glucose-Konzentration in stickstoffarmen Medien mehr Glucan gebildet (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Biogene Amine können durch die enzymatische Decarboxylierung von Aminosäuren durch bestimmte Milchsäurebakterien während und nach dem biologischen Säureabbau gebildet werden. Vor allem Bakterien der Gattungen *Pediococcus* und *Lactobacillus* sind an der Bildung dieser Verbindungen beteiligt (Delfini, 1989; Moreno-Arribas et al., 2000, 2003; Arena & Manca de Nadra, 2001). Die Decarboxylase-Aktivität einiger *Oenococcus oeni*-Stämme kann ebenfalls zur Bildung biogener Amine führen (Lonvaud-Funel & Joyeux, 1994; Coton et al., 1998; Lonvaud-Funel, 2001). Biogene Amine wurden auch in anderen fermentierten Lebensmitteln wie Käse, Wurst, Sauerkraut und Soja-Sauce (Stratton et al., 1991; Lonvaud-Funel, 2001) nachgewiesen. Hohe Konzentrationen biogener Amine werden auch immer wieder in Lebensmitteln wie Fisch entdeckt, die leicht durch Bakterien kontaminiert werden. In einigen Weinproben konnten Histamin, Tyramin, Putrescin, Cadaverin, Phenylethylamin und andere biogene Amine nachgewiesen werden (Lonvaud-Funel, 2001). Der übermäßige Verzehr von Lebensmitteln, die biogene Amine enthalten kann zu Kopfschmerzen führen. In extrem hohen Konzentrationen (> 10 mg) können biogene Amine zu Atemnot, Herzklopfen und Blutdruckabfall (Hypotonie) führen und Pseudoallergien auslösen (Silla Santos, 1996). In der Schweiz ist bereits ein Richtwert von maximal 10 mg Histamin pro Liter Wein festgelegt. Die Europäische Union plant ebenfalls die Einführung eines Grenzwertes für Histamin (Lehtonen, 2002).

Ein weiterer, durch Milchsäurebakterien und einige Hefen verursachter Weinfehler ist der „Mäusel“-Ton, der durch die Bildung bestimmter Aminosäure-Derivate, den Tetrahydropyridinen und durch Pyrrole entsteht (Snowdon et al., 2006). Die Indikator-Substanzen sind schon in wenigen Mikrogramm pro Liter sensorisch wahrnehmbar (2-Acetyltetrahydropyridin: 328-580 µg/l; 2-Acetyl-1-pyrrolin < 50 µg/l; 2-Ethyltetrahydropyridin < 10 µg/l). Der Geruch der betroffenen Weine erinnert an Mäuseharn (Dittrich & Großmann, 2005). Vor allem heterofermentative Milchsäurebakterien wie *L. hilgardii*, *L. brevis* und *O. oeni* sind an der Bildung dieser Substanzen beteiligt, während die homofermentativen Milchsäurebakterien wie *P. damnosus* nur geringe Mengen dieser Substanzen bilden (< 37 µg/l). Auch die Weinhefe *Brettanomyces bruxellensis* ist zur Synthese dieser Verbindungen fähig (Grbin & Henschke, 2000).

Der „*Brettanomyces*“- oder „Pferdeschweiß“-Ton wird durch bestimmte Sekundärmetabolite (flüchtige Phenole) der Hefe *Brettanomyces* hervorgerufen. *Dekkera* bezeichnet die sporenbildende (telomorphe) Form bestimmter Arten der Gattung *Brettanomyces* (Van der Walt, 1964). Zimtsäurederivate (insbesondere p-Cumarsäure und Ferulasäure) können als Precursor-Verbindungen durch *Brettanomyces* / *Dekkera*-Arten zu den flüchtigen Ethylphenolen umgewandelt werden, die schließlich das charakteristische „Brett-Aroma“ hervorrufen (Chatonnet et al., 1995). Die Hydroxyzimtsäuren gelangen aus den Beerenhäuten, Kernen und Stielen der Weintrauben in den Most. Durch die Mikroorganismen im Wein können diese Verbindungen zu flüchtigen Phenolen umgewandelt werden (Suárez et al., 2007). Zwei Enzyme sind an der Bildung flüchtiger Phenole aus Hydroxyzimtsäuren beteiligt. Der erste enzymatische Schritt kann von vielen Bakterien, Hefen und Pilzen durchgeführt werden. Dabei werden die Verbindungen p-Cumarsäure und Ferulasäure in 4-Vinylphenol bzw. 4-Vinylguajakol umgewandelt. In Wein wurde diese Aktivität bei einigen Stämmen der Milchsäurebakterien *L. brevis*, *L. plantarum*, *O. oeni*, den *Pediococcus*-Arten und bei der Hefe *B. bruxellensis* gefunden. Im zweiten enzymatischen Schritt werden 4-Vinylphenol bzw. 4-Vinylguajakol durch die Vinylphenol-Reduktase zu 4-Ethylphenol bzw. 4-Ethylguajakol reduziert. Die Vinylphenol-Reduktase wurde bei den weinrelevanten Hefen bisher nur in *Dekkera bruxellensis*, *D. anomala*, *Pichia guilliermondii*, sowie in drei *Candida*-Arten nachgewiesen (Chatonnet et al., 1995; Chatonnet et al., 1997; Dias et al., 2003). Einige Stämme der Milchsäurebakterien *P. pentosaceus*, *L. plantarum* und *L. brevis* waren begrenzt dazu in der Lage, Vinylphenole zu den entsprechenden Ethylphenolen zu reduzieren (Chatonnet et al., 1992, 1995; Cavin et al., 1993). Die Menge an gebildeten

Ethylphenolen blieb jedoch unter dem Grenzwert von ungefähr 420 Mikrogramm pro Liter, bei dem der *Brettanomyces*-Ton gerade noch als positiv empfunden wird.

1.3 Die Gattung *Pediococcus*

Pediokokken sind typische Gram-positive, Katalase- und Oxidase-negative Milchsäurebakterien (MSB). Sie wachsen unter fakultativ aeroben bis mikroaerophilen Bedingungen (Garvie, 1986 b). Pediokokken sind bezüglich ihres Glucose-Stoffwechsels homofermentativ, sie bilden als Endprodukt ausschließlich Lactat aus Glucose. Einige *Pediococcus*-Arten können jedoch auch Pentosen über den Pentosephosphatweg abbauen, sie sind fakultativ heterofermentativ (vgl. Tab. 1). Pediokokken zeichnen sich durch eine kokkoide Zellform aus, die niemals oval oder gestreckt ist (Günther & White, 1961). Die einzelnen Zellen besitzen einen Durchmesser von 0,5 - 1,5 µm. Von allen anderen Milchsäurebakterien unterscheiden sie sich durch die Bildung von Tetraden. Die Tetradenbildung entsteht durch die abwechselnde Zellteilung in zwei rechtwinkligen Ebenen (Garvie, 1986 b). Der Name „*Pediococcus*“ wurde von Balcke (1884) vorgeschlagen: Er beruht auf der Beobachtung, dass die Zellen sich in einer Ebene teilen (lat. *pedium* = Planfläche). Die Gattung *Pediococcus* wurde erstmals 1903 bei der Untersuchung von verdorbenem Bier erwähnt (Claussen, 1903). In der heutigen Zeit sind elf Arten gültig beschrieben. Es handelt sich um die Arten *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus*, *P. cellicola*, *P. ethanolidurans*, *P. siamensis*, *P. claussenii*, *P. stilesii*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* und *P. dextrinicus*. Die Spezies *P. dextrinicus* wird wegen der Bildung von ausschließlich L(+) Lactat aus Glucose durch eine Fructose-1,6-Bisphosphat induzierbare L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH) und der Verwertung von Gluconat als atypische Art bezeichnet (Back, 1978 a; Simpson & Taguchi, 1995). Mit Ausnahme der beiden Arten *P. claussenii* und *P. dextrinicus*, bilden alle *Pediococcus*-Arten DL-Lactat als Hauptprodukt aus dem Abbau von Glucose (Holzapfel et al., 2006).

Die typischen *Pediococcus*-Arten sind auf Basis von SSU rDNA-Sequenzvergleichen sehr eng verwandt (Holzapfel et al., 2006). Dagegen ist *P. dextrinicus* nur entfernt verwandt mit den typischen Pediokokken (Dobson et al., 2002). Obwohl diese Spezies immer noch der Gattung *Pediococcus* angehört, unterstützen phäno- und genotypische Daten die Zuordnung zu einer neuen Gattung (Holzapfel et al., 2006). Auch wurde bereits vorgeschlagen diese

Art in die Gattung *Lactobacillus* zu klassifizieren (Collins et al., 1991, Stiles & Holzapfel, 1997).

Die beiden Arten *P. acidilactici* und *P. pentosaceus* sind in geringen Zellzahlen auf Pflanzen und Früchten zu finden. (Mundt et al., 1969; Back, 1978 b; Dellaglio et al., 1981). Während der Fermentierung von Pflanzenmaterial wie Silage, Gurken, Oliven, Getreide und Fleisch kommt es meist zu einem starken Anstieg der Population dieser Arten. Oft treten diese *Pediococcus*-Arten zusammen mit Arten der Gattungen *Lactobacillus*, *Leuconostoc* und *Weissella* auf. Obwohl die Pediokokken überwiegend auf Pflanzen und Pflanzenprodukten zu finden sind, wurden Stämme der Arten *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* und *P. parvulus* bereits aus dem Verdauungstrakt und dem Kot verschiedener Geflügelarten (Harrison & Hansen, 1950; Coster & White, 1964; Juven et al., 1991; Kurzak et al., 1998) und aus entsprechenden menschlichen Proben (Ruoff et al., 1988; Walter et al., 2001; Heilig et al., 2002) und menschlichem Speichel (Sims, 1986) isoliert bzw. molekularbiologisch nachgewiesen. Des Weiteren wurden Stämme der Arten *P. acidilactici* und *P. pentosaceus* aus unterschiedlichen klinischen Proben isoliert (Barros et al., 2001). Pediokokken sind keine typischen pathogenen Bakterien, dennoch können sie durch Antibiotikaresistenzen wie gegen Vancomycin eine Rolle als opportunistische Krankheitserreger spielen (Riebel & Washington, 1990; Edlund & Barkholt, 1997).

Über die schädliche Wirkung des Wachstums von *Pediococcus damnosus* während der Fermentierung von Bier wurde seit langer Zeit berichtet (Balcke, 1884; Mees, 1934; Shimwell, 1948; Andrews & Gilliland, 1952; Coster & White, 1964; Back, 1978 b; Dobson et al., 2002). Seltener wurden die beiden Arten *P. inopinatus* und *P. dextrinicus* im Zusammenhang mit verdorbenem Bier erwähnt (Back, 1978 a; Back, 1978 b). Das Auftreten der Arten *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* und *P. parvulus* wurde ebenfalls während der Bierherstellung beobachtet, jedoch wurden diese Arten immer nur in frühen Stadien des Brauprozesses während der Herstellung der Stammwürze isoliert (Barney et al., 2001). Fehler, die während der Fermentierung von Bier durch das Wachstum der Pediokokken verursacht werden, sind Trübungen, begleitet von Geschmacksveränderungen aufgrund der Diacetyl-Bildung (Donhauser, 1993; Sakamoto & Konings, 2003). Außerdem kann es zu einer Erhöhung der Viskosität durch die Bildung von Exopolysacchariden kommen (Simpson & Taguchi, 1995).

Aus Wein und Weinhefe wurden in der Vergangenheit vor allem Stämme der Art *P. damnosus* isoliert (Peynaud & Domercq, 1967; Weiller & Radler, 1970; Back, 1978 b; Beneduce et al., 2004). Meistens waren diese Weine durch einen Milchsäureton (Diacetyl

und Acetoin) oder eine erhöhte Viskosität (β -D-Glucan) aufgefallen. Vor allem bei höheren pH-Werten ($> 3,5$) konnten auch Stämme der Arten *P. parvulus* und *P. inopinatus* aus Most und Wein isoliert werden (Edwards & Jensen, 1992; Rodas et al., 2003). Seltener wurde über das Vorkommen der Art *P. pentosaceus* in Wein berichtet (Eliseeva et al., 2001; Rodas et al., 2003). Aufgrund ihrer hohen Ethanol-Toleranz (> 12 Vol. %) und der Toleranz an freiem SO_2 (30-50 mg / l) können einige *Pediococcus*-Stämme während der Gärung und Lagerung des Weines wachsen. Obwohl sie am Biologischen Säureabbau im Wein beteiligt sein können, sind sie wegen ihrer Fähigkeit zur Bildung von Diacetyl in hohen Konzentrationen unerwünscht (Wibowo et al., 1985). Eine weitere negative Beeinflussung der Weinqualität ist die Bildung biogener Amine wie Histamin (Weiller & Radler, 1976; Landete et al., 2005), als Ergebnis der Decarboxylierung von Aminosäuren durch einige Stämme (Bover-Cid & Holzapfel, 1999). Einige *Pediococcus*-Arten sind darüber hinaus in der Lage, Glycerin zu Acrolein abzubauen, eine Substanz die mit Anthocyanen reagieren kann, was zur Bildung bitterer Substanzen führt (Davis et al., 1988; Sponholz et al., 1993; Du Toit & Pretorius, 2000).

Stämme der Arten *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* und *P. parvulus* werden häufig als Starterkulturen zur Fermentierung von Fleisch (Raccach, 1987, Luchansky et al., 1992, Kang & Fung, 1999), Milch (Bhowmik & Marth, 1990; Back, 1999), und pflanzlichen Produkten wie Silage (Langston & Bouma, 1960; Günther & White, 1961), Sauerkraut (Coster & White, 1964; Back, 1978 b) und anderen Gemüsesorten eingesetzt. Neben der Lactat- und Diacetyl-Bildung führt die Stoffwechselaktivität einiger *P. acidilactici*-Stämme zur Bildung antibakterieller Verbindungen (Stiles, 1996, Albano et al., 2007). Durch die Bildung dieser Bacteriocine, den so genannten Pediocinen können sie das Wachstum von Krankheitserregern wie z.B. *Listeria monocytogenes* unterdrücken.

1.4 Methoden zur Identifizierung von Mikroorganismen

Für die Nahrungsmittelindustrie ist die Kontrolle des Wachstums der Mikroorganismen während der Fermentierung bestimmter Lebensmittel von großer Bedeutung. Die Hauptanwendungen zur Analyse von Lebensmittelproben und Starterkulturen sind gezielte Identifizierung bestimmter Arten und Stämme, Bestimmung der Gesamtkeimzahl, und Identifizierung der mikrobiellen Flora zu bestimmten Zeitpunkten der Fermentation. Um wachsende Vorschriften bezüglich der Qualität und Sicherheit bestimmter Lebensmittel

erfüllen zu können, müssen sichere und schnelle Nachweisverfahren für die Kontrolle der Fermentationsprozesse entwickelt werden. Dazu gehört neben der Überwachung des Wachstums von Produktionsstämmen auch eine gezielte Identifizierung unerwünschter Mikroorganismen, um rechtzeitig Gegenmaßnahmen ergreifen zu können (Fleet, 1999).

1.4.1 Phänotypische Methoden

Die Morphologie eines Mikroorganismus liefert oft nur wenige Informationen über dessen Art-Zugehörigkeit. Zwar kann die Charakterisierung eines Stammes durch mikroskopische Untersuchungen unter Verwendung von Färbungen (z.B. Gram-Färbung) erleichtert werden, dennoch reichen diese Informationen in der Regel nicht für eine sichere Identifizierung aus. Analytische Methoden, wie die Fettsäure-Analyse und die Protein-Zusammensetzung der Zellen, können zur Identifizierung herangezogen werden. Neben diesen Untersuchungen gehören physiologische Tests zu den klassischen Identifizierungs-Methoden. Ein unbekannter Stamm lässt sich charakterisieren anhand der Fähigkeit bestimmte Substrate abzubauen und Stoffwechselprodukte zu bilden. Häufig verwendete Tests zur Identifizierung Gram-positiver Bakterien sind der API 50 CHL-Test (Bio-Mérieux, Nürtingen) und der GP2 Microplate™ Test (Biolog Inc., Hayward, USA). Für die Identifizierung von Hefen stehen entsprechende Produkte wie der API 20C und ATB 32C Test (Bio-Mérieux, Nürtingen), sowie der YT MicroPlate™ Test (Biolog Inc., Hayward, USA) zur Verfügung. Eine schnelle Identifizierung durch phänotypische Tests wird oft durch das Problem der Kultivierung erschwert. Um genügend Zellmaterial für einen Nachweis zu erhalten, müssen die Stämme oft mehrmals überimpft werden. Außerdem können sich die Ergebnisse physiologischer Tests zwischen zwei Stämmen einer Art unterscheiden und damit eine sichere Identifizierung erschweren. Da die Substrat-Verwertung bzw. die Bildung bestimmter Produkte abhängig von Enzymreaktionen ist, kann es zu Problemen kommen, wenn einzelne Enzyme einer Enzymkaskade nicht exprimiert werden. Je nach verwendetem Kultivierungsmedium können die Ergebnisse in Abhängigkeit vom Nährstoffangebot und den individuellen Anpassungen des Mikroorganismus unterschiedlich ausfallen. Konventionelle physiologische Identifizierungs-Methoden für Milchsäurebakterien und Hefen sind aus diesen Gründen zeit- und materialaufwendig, schwierig durchzuführen und liefern häufig mehrdeutige Ergebnisse (Deak, 1995; Ribéreau-Gayon et al., 2006).

1.4.2 Molekularbiologische Methoden

Herkömmliche Methoden zur Auszählung, Identifizierung und Charakterisierung sind nicht ausreichend, um Mikroorganismen in komplexen Mischkulturen präzise zu überwachen. Langsam wachsende und nicht-kultivierbare Mikroorganismen können durch klassische Methoden oft nur sehr schwer beziehungsweise überhaupt nicht erfasst werden. Die Entwicklung molekularbiologischer Identifizierungsmethoden für Mikroorganismen hat den Nachweis unbekannter Arten wesentlich erleichtert, und darüber hinaus präziser gemacht. Die DNA-Zusammensetzung eines Stammes ist spezifisch und nicht vom Nährstoffangebot des Kulturmediums abhängig. Wiederholtes Überimpfen eines Stammes kann zwar zu Mutationen führen, jedoch ist die Wahrscheinlichkeit dass diese Mutationen die Identifizierung beeinflussen sehr gering.

Durch den Vergleich ihrer DNA mit der DNA von Referenzstämmen, können unbekannte Mikroorganismen identifiziert werden. Vergleichende Sequenzanalysen der 16S ribosomalen (r)DNA in Bakterien bzw. der 18S rDNA in Eukaryoten (Woese, 1987) sind immer noch Standard zur phylogenetischen Untersuchung. Ihr Auflösungsvermögen erreicht aber bestenfalls das Subspezies-Niveau (DeParasis & Roth, 1990). Bei einigen Bakterien wie z.B. den Pseudomonaden und einigen Enterobakterien, sowie anderen Bakterien-Gruppen und vor allem bei Hefen wird allerdings auch der Spezies-Level nicht ausreichend aufgelöst (Fox et al., 1992). In Hefen sind die ribosomalen Gene als 18S-5,8S-26S Operons organisiert, die 50- bis 200-mal pro haploidem Genom tandemartig wiederholt werden (Planta & Raué, 1988). Die zwei Internal Transcribed Spacer-Regionen (ITS1 und ITS2) trennen die 18S rDNA und die 26S rDNA von der 5,8S rDNA. ITS-Regionen sind aufgrund eines geringeren Selektionsdruckes weniger konserviert (Musters et al., 1990) und können daher benutzt werden, um Hefen auf Spezies- und teilweise sogar Subspeziesniveau zu unterscheiden. Zum Beispiel wurden weinrelevante Hefen der Gattungen *Saccharomyces* und *Brettanomyces* durch vergleichende Sequenzanalysen der ITS-Regionen differenziert (Montrocher et al., 1998; Egli & Henick-Kling, 2001).

Zur Erstellung phylogenetischer Studien Gram-positiver Bakterien wurden neben den Genen der kleinen ribosomalen Untereinheit und der ITS-Bereiche auch vergleichende Sequenzanalysen mit den Genen anderer Makromoleküle wie der 23S rRNA (Ludwig & Schleifer, 1994), dem Elongationsfaktor Tu und der β -Untereinheit der ATPase (Ludwig et al., 1993) durchgeführt. In den letzten Jahren haben vor allem die Sequenzierung der 16S und 23S rDNA und die DNA-DNA-Hybridisierung dazu beigetragen, die Verwandtschaft zwischen verschiedenen Milchsäurebakterien-Gattungen aufzuklären (Holzapfel et al.,

2006). Die DNA-DNA-Hybridisierung misst den Grad der Sequenzähnlichkeit. Die Bestimmung des GC-Basenverhältnisses informiert über den Prozentsatz jedes Nukleotids, das in der DNA eines bestimmten Organismus vorhanden ist, liefert aber keinerlei Information über die Sequenz der Nukleotide. Zwei Organismen mit ähnlichen oder identischen Nukleotidsequenzen hybridisieren proportional zur Ähnlichkeit ihrer Sequenzen miteinander. Homologiewerte über 65-75 % zeigen, dass zwei verschiedene Stämme zur gleichen Art gehören (Stackebrandt & Goebel, 1994). Stammvariationen können mit dieser Methode jedoch nicht aufgelöst werden.

Durch die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) mit rRNA-gerichteten Sonden können einzelne Zellen in ihrer Umgebung identifiziert werden. Zur Hybridisierung werden geeignete Sonden mit einem Fluoreszenzmarker gekoppelt. Nach Denaturierung der Sonden und Zellen wird der Ansatz unter kontrollierten Bedingungen bei einer bestimmten Temperatur inkubiert. Die einzelsträngigen Sonden hybridisieren mit den komplementären Nukleinsäuresequenzen der Zellen. Das Konstrukt aus Sonde und Zielsequenz lässt sich durch die Anregung des Markers mit UV-Licht mikroskopisch nachweisen. Aufgrund schneller Durchführbarkeit und hoher Empfindlichkeit ist die FISH eine leistungsfähige Methode zur Durchführung phylogenetischer, diagnostischer und ökologischer Studien in der Mikrobiologie (Amann et al., 1990 und 2001; Moter & Göbel, 2000). Der größte Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, Mikroorganismen ohne Kultivierung oder DNA-Isolierung direkt zu detektieren.

Die Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) ist eine Elektrophoresemethode zur Nukleinsäure-Auftrennung. Im Unterschied zur Agarose-Gelelektrophorese werden die PCR-Amplifikate durch DGGE nicht ihrer Länge nach aufgetrennt, sondern aufgrund der Denaturierungseigenschaften von DNA mit unterschiedlicher Basenpaarzusammensetzung (Muyzer et al., 1993). Die Denaturierung der DNA wird durch einen ansteigenden Gradienten denaturierender Agenzien (meist Harnstoff und Formamid) im Polyacrylamidgel erreicht. Während der Wanderung durch das Gel treffen die PCR-Amplifikate auf eine stetig ansteigende Konzentration, bis sie schließlich eine Konzentration erreicht haben, bei der die DNA-Doppelstränge vollständig getrennt sind. Die Trennung der DNA-Doppelhelix führt zu einer starken Verlangsamung der Migration durch das Gel. Aufgrund unterschiedlicher Basenpaarzusammensetzungen kommt es so zur Separierung der PCR-Amplifikate. Unter Verwendung geeigneter Primer für die Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften können variable Genbereiche amplifiziert und durch DGGE aufgetrennt werden. Jede Gelbande im Polyacrylamidgel repräsentiert im Idealfall einen Organismus aus der Gemeinschaft (Muy-

zer et al., 1998). Im Bereich der Weinmikrobiologie wurde die PCR-DGGE bisher zur Verfolgung der Änderung der mikrobiellen Diversität weinrelevanter Hefen (Cocolin et al., 2000; Renouf et al., 2006 b), Bakterien (Lopez et al., 2003; Renouf et al., 2006 a) und zur Untersuchung des Vorkommens von Mikroorganismen auf Weintrauben (Renouf et al., 2007) angewandt.

Durch den Einsatz von DNA Fingerprint-Verfahren wird eine Genotypisierung auch für unbekannte Arten und Stämme ermöglicht. Neben hochkonservierten Regionen, die innerhalb einer Population bzw. einer Art unverändert vorliegen, gibt es solche, für die in einer Population mehrere Varianten, sogenannte Polymorphismen vorliegen. Unterschiede in der DNA-Sequenz können auf dem Austausch, der Insertion oder Deletion einzelner Basen oder ganzer DNA-Abschnitte beruhen. Unter Verwendung geeigneter Methoden lässt sich basierend auf diesen Polymorphismen ein DNA-Profil eines Individuums erzeugen. Diese, auch als genetische Fingerabdrücke bezeichneten DNA-Bandenmuster, sind in hohem Maße charakteristisch für eine Art oder einzelne Stämme und können daher zu deren Identifizierung bzw. Differenzierung herangezogen werden.

Die Analyse von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) gehört zu den sensitivsten Fingerprint-Methoden zur Stammidentifizierung. Bei der RFLP-Methode wird die DNA eines Genes oder des gesamten Genoms durch Restriktionsenzyme an genau definierten, meist palindromischen Sequenzen geschnitten. Die entstehenden Restriktionsfragmente haben eine durch die Lage der Spaltstellen definierte Länge und können durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden (Jeffreys et al., 1985 a). Bei der Wahl geeigneter Restriktionsenzyme können Arten und Stämme anhand der Anzahl und Länge der entstehenden DNA-Abschnitte identifiziert werden. Mehrere RFLP-basierende Methoden wurden zur Identifizierung von Hefen (Guillamon et al., 1998; Granchi et al., 1999), Milchsäurebakterien (Rodas et al., 2003) und Essigsäurebakterien (Poblet et al., 2000) aus Wein beschrieben.

Die Analyse kurzer, tandemartig angeordneter, repetitiver Sequenzmotive (Minisatelliten) wird als VNTR-Polymorphismus (engl. variable number of tandem repeats) bezeichnet (Jeffreys et al., 1985 b). Die Identifizierung aufgrund von VNTR-Polymorphismen beruht darauf, dass verschiedene Individuen einer Population an bestimmten Stellen im Genom unterschiedlich viele, tandemartig wiederholte Sequenzmotive mit einer Länge von ca. 10-15 bp besitzen. VNTRs sind oft an den Telomeren der Chromosomen konzentriert und wenig über das Genom verteilt. Durch die Ermittlung der Anzahl der Wiederholungseinheiten an den untersuchten VNTR-Loci kann der Genotyp eines Individuums bestimmt werden.

Die Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) PCR basiert auf der Vervielfältigung von DNA unter Verwendung eines zufällig ausgewählten Primers in einer PCR (Williams et al., 1990). Die zur RAPD PCR verwendeten Primer bestehen aus 8-12 Nukleotiden und binden an komplementäre Stellen im Genom. Die Länge der vervielfältigten DNA-Abschnitte hängt von den Bindungsstellen der Primer auf der DNA-Matrize ab. Die stattfindende Amplifikation ist zwar willkürlich, da sie von willkürlich ausgewählten Primern dirigiert wird; sie ist aber nicht zufällig, da sich die Primer an spezifischen Stellen auf der DNA-Matrize anlagern. Bei der Wahl geeigneter Primer ergeben sich durch Elektrophorese individuelle Bandenmuster, die es erlauben, die DNA unterschiedlicher Organismen zu vergleichen, ohne diese im Detail zu kennen. Eine ähnliche Methode, die Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) wurde von Welsh (1990) vorgestellt. Das Prinzip dieser Methode ähnelt dem der RAPD PCR, jedoch werden Primer mit einer Länge von mindestens 18 Nukleotiden verwendet. Die durch RAPD PCR und AP-PCR erzeugten DNA Fingerprint-Bandenmuster weisen Amplifikate auf, die in zwei Kategorien aufgeteilt werden können: diejenigen, die konserviert sind und diejenigen, die individuell spezifisch sind. Ein Problem, das die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse betrifft, stellt das Auftreten oder Verschwinden einzelner PCR-Amplifikate bei der Wiederholung der gleichen Reaktion dar, das in einigen Fällen beobachtet werden konnte.

Eine der RAPD PCR verwandte Methode ist der Längenpolymorphismus amplifizierter (DNA-) Fragmente (AFLP). Die AFLP-Technik basiert auf der selektiven Amplifikation von Restriktionsfragmenten. Im Anschluss an den Restriktionsverdau wird eine PCR mit Primern durchgeführt, die zum einen die Restriktions-Erkennungsschnittstelle enthalten müssen und zum anderen eine willkürlich ausgewählte Sequenz, die etwa drei Nukleotide weit in die Restriktionsfragmente hineinreicht (Zabeau & Vos, 1993; Vos et al., 1995). Durch den spezifischen, zur Restriktions-Erkennungsschnittstelle komplementären Teil der Primer kommt es zu einer stabilen Bindung, während die zufällig ausgewählte Sequenz der Primer zur Amplifikation einiger Genfragmente führt. Die AFLP-Analyse ist eine der stabilsten Fingerprint-Verfahren zur Genomanalyse (Koeleman et al., 1997).

Die nested Specifically Amplified Polymorphic DNA (SAPD)-PCR (Pfannebecker, 2005; Fröhlich & Pfannebecker, 2006, 2007; Pfannebecker & Fröhlich, 2008) ist ein Spezies-unabhängiges DNA Fingerprint-Verfahren, mit dessen Hilfe sich die genetische Verwandtschaft beliebiger Organismen ermitteln lässt. Die Methode findet sowohl bei Mikroorganismen, als auch bei Tieren und Pflanzen Anwendung und kann zur Identifizierung bzw. Differenzierung von Arten, Stämmen oder Serovaren herangezogen werden. Die

nested SAPD-PCR entstand durch Weiterentwicklung des Prinzips der RAPD PCR (Williams et al. 1990). Ähnlich der RAPD PCR wird auch bei der nested SAPD-PCR nur jeweils ein Primer pro Reaktion verwendet. Alle Primer (10-mere, 11-mere) enthalten hauptsächlich die 8 bp-lange palindrome Erkennungssequenz der *Not* I-Restriktionsendonuklease (5'-GCGGCCGC-3'). Um die Konzentration stammrelevanter, schwächerer Amplifikate zu erhöhen, kann das Produkt der SAPD-PCR für eine zweite Amplifikation mit spezifischen Primern in der nested SAPD-PCR eingesetzt werden. Durch die gleichzeitige Amplifikation mehrerer Genorte entsteht nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte in Agarosegelen und Visualisierung im UV-Licht nach Färbung mit Ethidiumbromid ein DNA Fingerprint-Bandenmuster (Abb. 2). In der Regel wird nach der SAPD-PCR das Subspezies-Niveau berührt. Durch den Vergleich der DNA Fingerprint-Bandenmuster mit den Bandenmustern bekannter Arten können Organismen identifiziert werden. Nach der nested SAPD-PCR ist das Bandenmuster für jeden Stamm einer Art spezifisch. Die Muster können daher zur Differenzierung von Stämmen herangezogen werden. Durch die Auswertung der Bandenmuster mit Geldokumentations- und Phylogenie-Programmen können Cluster-Analysen erstellt werden.

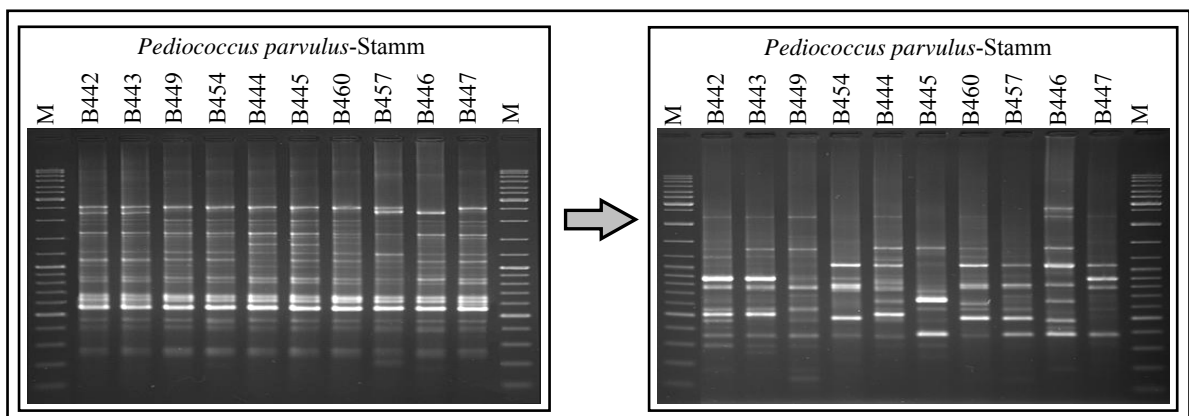


Abb. 2. Prinzip der DNA-Fingerprint Methode nested SAPD-PCR. Für die erste PCR wurden Primer mit einer Sequenz-Länge von 10 bp verwendet. In der Abbildung links ist das Ergebnis der SAPD-PCR zur Analyse von *Pediococcus parvulus*-Stämmen nach gelelektrophoretischer Auftrennung gezeigt. Die PCR wurde mit dem Primer G-Not (Tab. 7) durchgeführt. Das Ergebnis der nested SAPD-PCR ist in der Abbildung rechts gezeigt. Für die nested PCR diente das PCR-Produkt der SAPD-PCR als DNA-Template. Die PCR erfolgte unter Verwendung des Primers G-Not-C (Tab. 7).

Sequence characterized amplified regions (SCARs) sind Marker, die genetisch genau definiert sind und durch die Amplifizierung genomischer DNA mit spezifischen Primerpaaren in einer PCR identifiziert werden können (Paran & Michelmore, 1993). Genetische Marker können entweder durch spezifische Primer von bekannten DNA-Sequenzen abgeleitet werden oder durch DNA-Amplifizierung mit zufällig ausgewählten Primern. Bei der RAPD

PCR (Williams et al., 1990) oder der nested SAPD-PCR (Pfannebecker, 2005; Fröhlich & Pfannebecker 2006, 2007; Pfannebecker & Fröhlich, 2008) werden mehrere Genorte gleichzeitig in einer Reaktion amplifiziert. Die amplifizierten DNA-Sequenzen können nur in einem Organismus auftreten, sie können aber auch bei Organismen-Gruppen oder bei allen untersuchten Organismen einer Population beobachtet werden. So lassen sich je nach Zielsetzung geeignete Marker generieren. Versuche zur RAPD PCR und SAPD-PCR haben gezeigt, dass diese Methoden sehr empfindlich auf die Veränderung der Reaktionsbedingungen reagieren. Bei der Entwicklung der SAPD-PCR wurde eine sogenannte „Rampe“, also die langsame Erhöhung der Temperatur zwischen Annealing und Elongation des Primers eingeführt. Durch diese Maßnahme wurde die Reproduzierbarkeit der Methode verbessert. Auf der anderen Seite wurde dadurch aber auch die gesamte PCR-Dauer verlängert. Um einen schnellen, spezifischen PCR-Nachweis bestimmter Gruppen oder einzelner Individuen auf Basis der nested SAPD-PCR durchführen zu können, kann die SCAR-PCR (Paran & Michelmore, 1993) angewendet werden. Zur Generierung von Primern für die SCAR-PCR wird zunächst ein geeigneter Marker aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Der Marker wird anschließend kloniert und sequenziert. Basierend auf der DNA-Sequenz können neue, spezifische Primer konstruiert werden, die eine schnelle und sichere Identifizierung in einer PCR zulassen.

1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Forschungsarbeit werden molekularbiologische Methoden zur Art-Identifizierung von Milchsäurebakterien der Gattungen *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Oenococcus* und *Leuconostoc* weiterentwickelt und angewendet. Eine DNA-Fingerprintmethode, die nested SAPD-PCR (Pfannebecker, 2005; Fröhlich & Pfannebecker, 2006, 2007; Pfannebecker & Fröhlich, 2008) wird zur Art-Identifizierung verschiedener Milchsäurebakterien und Hefen verwendet und es werden Cluster-Analysen zur Unterscheidung von Stämmen dieser Arten durchgeführt.

Im Rahmen eines von der Stiftung Rheinland-Pfalz für Innovation geförderten Projektes zur Untersuchung Exopolysaccharid-bildender Milchsäurebakterien aus Wein soll ein PCR-basierendes Nachweissystem zur Identifizierung von neun Arten der Gattung *Pediococcus* entwickelt werden. Da sich die Pediokokken durch 16S rDNA-Sequenzvergleiche nur sehr schwer unterscheiden lassen, soll untersucht werden, ob die 23S rDNA eine höhere Se-

quenzvariabilität aufweist. Neben dem kompletten 23S rRNA-Gen der Spezies *P. pentosaceus* (ATCC 25745) sind bisher nur wenige 23S rDNA-Teilsequenzen der einzelnen *Pediococcus*-Arten in Datenbanken hinterlegt. Daher müssen die kompletten LSU rRNA-Gensequenzen der neun *Pediococcus*-Typstämme sequenziert werden. Die neu ermittelten Gensequenzen werden nach Erstellen eines Alignments zum Auffinden spezifischer Sequenzbereiche herangezogen, die sich für eine Art-Identifizierung eignen. Außerdem sollen die Sequenzen zur Erstellung einer phylogenetischen Analyse mit verwandten Milchsäurebakterien verwendet werden. Basierend auf den 23S rDNA-Sequenzen wird schließlich ein Multiplex PCR-Nachweissystem zur simultanen Identifizierung der untersuchten *Pediococcus*-Arten entwickelt (Pfannebecker & Fröhlich, 2008). Die praktische Anwendbarkeit der entwickelten Methode soll durch Überprüfung einer möglichst großen Anzahl aus Wein isolierter *Pediococcus*-Stämme abgesichert werden. Bei neu isolierten Stämmen soll die Häufigkeit des Auftretens, sowie die regionale Verbreitung der Kontaminationen untersucht werden. Ferner soll überprüft werden, ob im Wein ein Zusammenhang des Vorkommens der Pediokokken mit dem Auftreten der Schädlingshefe *Brettanomyces bruxellensis* besteht.

Da Exopolysaccharid-Bildung der bedeutendste durch Pediokokken verursachte Weinfehler ist, sollen die *Pediococcus*-Stämme mit klassischen und molekularbiologischen Methoden auf ihre Fähigkeit zur Exopolysaccharid-Synthese überprüft werden. Neben Kultivierungsversuchen werden bereits beschriebene PCR-Methoden zum Nachweis bestimmter Gene durchgeführt.

Um neue Sonden für eine Identifizierung durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) generieren zu können, werden LSU rRNA-Sekundärstrukturen von neun *Pediococcus*-Arten erstellt. Die rRNA-Sekundärstrukturen sind notwendig zur optimalen Generierung von FISH-Sonden nach dem Helfer-Prinzip mit unmarkierten Oligonukleotidsonden (Fuchs et al., 2000) oder nach dem Gemeinschafts-Sonden Konzept (Fröhlich et al., 2003). Zur Erstellung der rRNA-Sekundärstrukturen wird die neu entwickelte Software Structure Star 1.0 (Fröhlich, pers. Mitteilung) verwendet. Die Generierung der Sekundärstrukturen erfolgt dabei durch die Übertragung der rDNA-Sequenzen auf bereits bestehende rRNA-Sekundärstrukturen (Gutell et al., 1993). Auf Grundlage dieser Sekundärstrukturen können FISH-Sonden zum Nachweis der *Pediococcus*-Arten generiert werden.

Zur Identifizierung weinrelevanter Milchsäurebakterien durch Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) sollen geeignete Genbereiche untersucht werden. Basierend auf dem LSU rDNA-Alignment der Milchsäurebakterien werden geeignete Primer entwickelt,

die einen hochvariablen Bereich des 23S rRNA-Gens amplifizieren. Die Amplifikate sollen anschließend durch DGGE differenziert werden.

Durch nested SAPD-PCR soll untersucht werden, ob sich die neun *Pediococcus*-Typstämme differenzieren lassen, und ob die Ergebnisse zur Durchführung einer Cluster-Analyse verwendet werden können. Die Identifizierungsergebnisse der 23S rDNA basierenden Multiplex PCR sollen durch die SAPD-PCR verifiziert werden. Aus Weinen, die einen spontanen Biologischen Säureabbau durchgeführt haben, sollen *Oenococcus oeni*-Stämme isoliert und anhand des Vergleichs ihrer SAPD-PCR Fingerprint-Bandenmuster identifiziert werden. Mit verschiedenen Oenokokken aus Starterkulturen soll eine Cluster-Analyse auf Basis der Stamm-Differenzierung durch nested SAPD-PCR durchgeführt werden.

Durch 16S rDNA-Sequenzierung und Datenbankvergleich wird die Art-Zugehörigkeit verschiedener Milchsäurebakterien aus der institutseigenen Kulturensammlung überprüft, die in der SAPD-PCR ein untypisches DNA Fingerprint-Bandenmuster gezeigt hatten. Außerdem werden Milchsäurebakterien aus verschiedenen Starterkulturen isoliert und durch die Kombinierung vergleichender 16S rDNA-Sequenzanalysen und SAPD-PCR identifiziert.

Die nested SAPD-PCR wird darüber hinaus zur Identifizierung und Differenzierung weinrelevanter Hefen der Gattungen *Brettanomyces* und *Saccharomyces* verwendet. Durch Cluster-Analyse soll die regionale Verbreitung der Hefe *B. bruxellensis* im Weinanbaugebiet Rheinhessen untersucht werden. Im Hinblick auf die Gattung *Saccharomyces* soll durch die Anwendung der SAPD-PCR erforscht werden, ob sich die nah verwandten Arten *S. cerevisiae*, *S. bayanus* und *S. pastorianus* differenzieren lassen. Anschließend soll die Art-Zugehörigkeit einiger kommerziell erhältlicher Hefen aus Starterkulturen überprüft werden.

Weitere Versuche der nested SAPD-PCR sollen zeigen, ob diese Methode zur Differenzierung höherer Eukaryoten wie Weinreben, Mäuse und Menschen geeignet ist, und ob die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb dieser Organismen gegebenenfalls durch Cluster-Analysen nachvollzogen werden können.

Des Weiteren soll zur Art-Identifizierung weinschädlicher Milchsäurebakterien der Gattungen *Pediococcus*, *Lactobacillus* und *Leuconostoc* eine auf die SAPD-PCR aufbauende Methode, die Sequence Characterized Amplified Region (SCAR)-PCR, durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Hilfsmittel

- Agarose-Elektrophorese-Einheit Bio-Rad, München
 - Gelkammer: Sub Cell Modell 96
 - Spannungsgerät: Power Pac Basic
- DGGE-Elektrophorese-Einheit (DCode™) Bio-Rad, München
 - Elektrophorese-Apperatur
 - Gel-Gießstand
 - Gradientenmischer (Modell 475)
- Digitalkamera Coolpix 4500 Nikon, Tokyo, Japan
- Fluoreszenzmikroskop Axiophot 2 Zeiss, Göttingen
 - Filter F41-007 AHF Analystechnik, Tübingen
 - Kombinationsfilter 28 Zeiss, Göttingen
- Geldokumentationseinheit BioVison CN 3000 incl. Bedienungssoftware: Vision Capt 14.1 Vilber-Lourmat, Eberhardzell
- Hybridisierungsöfen Sheldon, Oregon, USA
- Inkubator G 25 New Brunswick Scientific, Nürtingen
- Mikroliterküvette LabelGuard™ Cell Implen, München
- Mikroskop Laborlux 11 Leitz, Wetzlar
- pH-Meter CG840 Schott, Mainz
- Photometer Specord 50 Analytic Jena, Jena
- Reinstwasseranlage: Milli-RO Plus 30 und Milli-Q Plus 185 Millipore, Eschborn
- Software
 - Bio-1D 12.09 Vilber-Lourmat, Eberhardzell
 - ClustalX 1.83 Thompson et al., 1997
 - GeneDoc Nicholas und Nicholas, 1997
 - Mfold Zuker, 1999
 - PHYLIP Package 3.65 Felsenstein, 1989
 - Structure Star 1.0 Fröhlich, persönliche Mitteilung
 - Tree View 1.6.6 Page, 1996
- Thermocycler
 - Mastercycler gradient Eppendorf, Hamburg
 - MJ Mini Bio-Rad, München
- Thermomixer 5436 Eppendorf, Hamburg
- Vortex Gerät Vibrofix VF1 Electronic Ika Labortechnik, Staufen

- Zentrifuge 5403 Eppendorf, Hamburg

2.2 Chemikalien

- Acrylamid / Bisacrylamid (40 %) Roth, Karlsruhe
- Agar Hartge, Hamburg
- Agarose: peqGold Standard-Agarose Peqlab, Erlangen
- Ammoniumpersulfat Roth, Karlsruhe
- β -Mercaptoethanol Roth, Karlsruhe
- Borsäure Roth, Karlsruhe
- Cycloheximid Sigma, München
- DABCO Sigma, München
- DAPI Fluka, Neu-Ulm
- Di-Ammoniumhydrogencitrat Merck, Darmstadt
- Di-Kaliumhydrogenphosphat Roth, Karlsruhe
- Di-Natriumhydrogenphosphat Roth, Karlsruhe
- Dimethylformamid Sigma, München
- EDTA Roth, Karlsruhe
- Essigsäure Roth, Karlsruhe
- Ethanol Roth, Karlsruhe
- Ethidiumbromid Roth, Karlsruhe
- Fleischextrakt Merck, Darmstadt
- Formamid Sigma, München
- Glucose Roth, Karlsruhe
- Harnstoff Roth, Karlsruhe
- Hefeextrakt (Typ 900) Hartge, Hamburg
- Isopropanol Roth, Karlsruhe
- Kaliumchlorid Roth, Karlsruhe
- Kaliumdihydrogenphosphat Roth, Karlsruhe
- Magnesiumsulfat Roth, Karlsruhe
- Mangansulfat Roth, Karlsruhe
- Natriumacetat Roth, Karlsruhe
- Natriumchlorid Roth, Karlsruhe
- Natriumdodecylsulfat Roth, Karlsruhe
- Natronwasserglas (35 %) Roth, Karlsruhe
- Pepton aus Casein (tryptisch verdaut) Hartge, Hamburg
- Pepton aus Fleisch Hartge, Hamburg
- Sorbitol Roth, Karlsruhe

- Stickstoff Linde, München
- TEMED Roth, Karlsruhe
- Trinatriumcitrat Roth, Karlsruhe
- TRIS Roth, Karlsruhe
- TritonX[®]-100 Merck, Darmstadt
- Tween 80 Merck, Darmstadt
- Wasser (deion.): Milli RO Plus Millipore, Eschborn

2.3 Biochemikalien, Enzyme und Kits

Biochemikalien:

- Ampicillin Sigma, München
- DNA-Längenstandard Fermentas, St. Leon-Rot
 - GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331
- dNTP-Mix Peqlab, Erlangen
 - dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 10 mM)
- Enhancer Solution P (5 x) Peqlab, Erlangen
- Magnesiumchlorid-Lösung (25 mM) Peqlab, Erlangen
- MassRuler™ (6 x) Loading Dye Solution Fermentas, St. Leon-Rot
- Oligonukleotide (100 µM)
 - PCR-Primer Operon, Köln
 - FISH-Sonden, Cy3 modifiziert (5'-Ende) Eurofins-MWG, Ebersberg
- PCR-Puffer (10 x) Peqlab, Erlangen
- Q-Solution (5 x) Qiagen, Hilden
- Taq-Polymerase SAWADY (5 U / µl) Peqlab, Erlangen
- Wasser für die Molekularbiologie Roth, Karlsruhe
- X-Gal Roth, Karlsruhe

Enzyme:

- Lysozym aus Hühnereiweiß Sigma, München
- Lyticase Fluka, Neu-Ulm

Kits:

- DNeasy[®] Blood & Tissue Kit Qiagen, Hilden
- innuPREP Plant DNA Kit Analytik Jena, Jena
- Qiagen[®] Multiplex PCR Kit Qiagen, Hilden
- QIAprep[®] Spin Miniprep Kit Qiagen, Hilden

- QIAquick[®] Gel Extraction Kit Qiagen, Hilden
- QIAquick[®] PCR Purification Kit Qiagen, Hilden
- TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing Invitrogen, Karlsruhe

2.4 Oligonukleotide (Primer)

Zur Berechnung der mittleren Schmelztemperatur (T_m) der Oligonukleotide wurde die Länge der Oligonukleotide (L), die Anzahl (n) an Guanin (G) und Cytosin (C) und die Natrium-Konzentration berücksichtigt. Formel zur T_m -Berechnung (Operon, Köln):

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 81,5 + 16,6 \cdot \log [\text{Na}^+] + \frac{41 \cdot (\text{nG} + \text{nC})}{L} - \frac{650}{L}$$

Tab. 2. Verwendete Primer zur Sequenzierung der 16S rDNA und der 23S rDNA

Primer ^a	Sequenz (5'→3')	bp	GC (%)	T_m (°C) ^b
Primer zur 16S rDNA Sequenzierung				
PurEubak3 (R)	AGA AAG GAG GTG ATC C	16	50	54,1
PurEubak5 (F)	AGA GTT TGA TCM TGG CT	17	44	53,5
Primer für die schrittweise Sequenzierung der 23S rDNA				
P23S_F1	GTT AAG TTA TAA AGG GCG CAT G	22	40	58,9
P23S_R1	GGG TGC TTT TCA CCT TTC C	19	52	60,1
P23S_F2	GGA AAG GTG AAA AGC ACC C	19	52	60,1
P23S_R2	CTA GTG AGC TAT TAC GCA C	19	47	58,0
P23S_F3	GTG CGT AAT AGC TCA CTA G	19	47	58,0
P23S_R3	CGA GTT CCT TAA CGA GAG	18	50	57,6
P23S_F4	CTC TCG TTA AGG AAC TCG	18	50	57,6
P23S_R4	CAT TCT GAG GGA ACC TTT G	19	47	58,0
P23S_F5	CAA AGG TTC CCT CAG AAT G	19	47	58,0
P23S_F5-PPA	CAA AGG TTC TCT CAG AAT GG	20	45	58,3
P5S_R	GCA TGG CAA CGT CCT AC	17	58	59,6

^a Primer-Bezeichnung: F: Forward; R: Reverse.

^b Mittlere Schmelztemperaturen laut Angaben des Herstellers.

Tab. 3. Verwendete Primer zur Sequenzierung des ITS1-5,8S rDNA-ITS2 Bereichs (Hefen)

Primer ^a	Sequenz (5'→3')	bp	GC (%)	T_m (°C) ^b
ITS1 (F)	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	19	63	64,4
ITS4 (R)	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	20	45	58,3

^a Primer-Bezeichnung: F: Forward; R: Reverse.

^b Mittlere Schmelztemperaturen laut Angaben des Herstellers.

Tab. 4. Verwendete Primer zur 23S rDNA basierenden Identifizierung

Primer ^a	Sequenz (5'→3')	bp	GC (%)	T _m (° C) ^b
Primer zur Identifizierung der Gattung <i>Pediococcus</i>				
Pedio23S_F	GAA CTC GTG TAC GTT GAA AAG TGC TGA	27	44	64,6
Pedio23S_R	GCG TCC CTC CAT TGT TCA AAC AAG	24	50	64,5
PDE23S_F	CAA GGC GTA GTC GAT GGC AAG	21	57	64,5
PDE23S_R	GGG CTT CAA TTC GTA CCT TTG GGT	24	50	64,5
Primer für die Multiplex PCR				
PDA23S_F	GTT ACC GCC ACG TGA ATA CAT AA	23	43	60,9
PST23S_F	GTT CTT GAA ACC ATG TGC CTA CAA A	25	40	61,3
PPE23S_F	CCA GGT TGA AGG TGC AGT AAA AT	23	43	60,9
PPA23S_F	TTA GGG CTA GCC TCG GAT TA	20	50	60,4
PCE23S_F	AAC AAG TCT GGT GGA GAG TG	20	50	60,4
PIN23S_F	GAG GAG AGT ATC CTA AGG TGT	21	47	60,6
PCL23S_F	AGG TCA GCC GCA GTG AAG	18	61	62,1
PAC23S_F	GTT TCG GAG GAG GCG CAA	18	61	62,1
P23S_R	CTG TCT CGC AGT CAA GCT C	19	57	62,3

^a Primer-Bezeichnung: F: Forward; R: Reverse.

^b Mittlere Schmelztemperaturen laut Angaben des Herstellers.

Tab. 5. Verwendete Primer zur Amplifizierung eines 23S rDNA-Teilbereichs für die DGGE

Primer ^a	Sequenz (5'→3')	bp	GC (%)	T _m (° C) ^b
DGGE_F1	(GC-Klammer) ^b – GTT AGT CGG GAC CTA AG	17	55	59,9
DGGE_R1	ATT TTG CCG AGT TCC TTA AC	20	40	56,3

^a Primer-Bezeichnung: F: Forward; R: Reverse.

^b GC-Klammer (40 bp): 5'- CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CGG CCG CCC C -3'.

^c Mittlere Schmelztemperaturen laut Angaben des Herstellers.

Tab. 6. Verwendete Primer zum Nachweis von Genen für die Exopolysaccharid-Synthese

Primer ^a	Sequenz (5'→3')	bp	GC (%)	T _m (° C) ^c
Primer zum Nachweis des <i>mob</i> -Genes (Gindreau et al., 2001)				
PF5	AGA GAC TAT ATT TAT GGC AAG G	22	36	57,0
PF6	TCT CAT CAA GAT GAA CAA TTG C	22	36	57,0
PF15	TAC AAG GTA AAG TAT ATT GGG C	22	36	57,0
PF16	TTA AAT CGG CAA AGA AAT GAC G	22	36	57,0
Primer zum Nachweis des <i>gtf</i> -Genes (Werning et al., 2006)				
GTFE (F)	CGG TAA TGA AGC GTT TCC TG	20	50	60,4
GTFR (R)	GCT AGT ACG GTA GAC TTG	18	50	57,6

^a Primer-Bezeichnung: F: Forward; R: Reverse.

^b Mittlere Schmelztemperaturen laut Angaben des Herstellers.

Tab. 7. Verwendete Primer zur SAPD-PCR und zur nested SAPD-PCR

Primer	Sequenz (5'→3')	bp	GC (%)	T _m (° C) ^a
SAPD-PCR Primer (Fröhlich & Pfannebecker, 2006, 2007)				
A-Not	AGC GGC CGC A	10	80	47,6
C-Not	AGC GGC CGC C	10	90	51,8
G-Not	AGC GGC CGC G	10	90	51,8
T-Not	AGC GGC CGC T	10	80	47,6
nested SAPD-PCR Primer (Fröhlich & Pfannebecker, 2006, 2007)				
A-Not-A	AGC GGC CGC AA	11	72	49,2
A-Not-C	AGC GGC CGC AC	11	81	52,9
A-Not-G	AGC GGC CGC AG	11	81	52,9
A-Not-T	AGC GGC CGC AT	11	72	49,2
C-Not-A	AGC GGC CGC CA	11	81	52,9
C-Not-C	AGC GGC CGC CC	11	90	56,7
C-Not-G	AGC GGC CGC CG	11	90	56,7
C-Not-T	AGC GGC CGC CT	11	81	52,9
G-Not-C	AGC GGC CGC GC	11	90	56,7
G-Not-G	AGC GGC CGC GG	11	90	56,7
G-Not-T	AGC GGC CGC GT	11	81	52,9

^a Mittlere Schmelztemperaturen laut Angaben des Herstellers.

Tab. 8. Verwendete Primer zur Sequenzierung positiver Klone und zur SCAR-PCR basierenden Art-Identifizierung

Primer ^a	Sequenz (5'→3')	bp	GC (%)	T _m (° C) ^b
Verwendete Primer zur Sequenzierung positiver Klone				
M13-F	GTA AAA CGA CGG CCA G	16	56	56,7
M13-R	CAG GAA ACA GCT ATG AC	17	47	54,7
Verwendete Primer zur SCAR-PCR basierenden Identifizierung				
SCAR-LEU-F	GTG GTC ATG GGT CTT AGC	18	55	59,9
SCAR-LEU-R	GGA TCA AGA CTA GCC AAT GG	20	50	60,4
SCAR-PAC-F	ATG ATG GAC AGA CTC CCT G	19	52	60,4
SCAR-PAC-R	CGA GCT GCG TAG ATA TGT C	19	52	60,4
SCAR-LBH-F	TTC CTT GGT AAT GTG CTT GC	20	45	58,3
SCAR-LBH-R	AAT GGC AAT CGC AAT GGA CG	20	50	60,4
SCAR-PIN-F	CTA TCC TTA CAA TGT GCA TCG	21	42	58,6
SCAR-PIN-R	TGG TGC GTC AGT AAA TGT AAG	21	42	58,6
SCAR-PDA-F	GTC TAA ACT GGT GGT TAA ACG	21	42	58,6
SCAR-PDA-R	ATC GCA CCT GGT TCA ATG C	19	52	60,1
SCAR-PPE-F	GGG AAC GGT TTT AGT TTT ATA CG	23	39	59,9
SCAR-PPE-R	CTA AGA GCG GTG ATG ATA AG	20	45	58,3
SCAR-PPA-F	GCA TGA ATC ACT TTT CGC TC	20	45	58,3
SCAR-PPA-R	CAA AGA TTG TGA CCC AGT TG	20	45	58,3

^a Primer-Bezeichnung: F: Forward; R: Reverse.

^b Mittlere Schmelztemperaturen laut Angaben des Herstellers.

2.5 Oligonukleotide (Cy3-markierte Sonden)

Tab. 9. 23S rRNA-gerichtete DNA-Sonden für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Sonde	Sequenz (5'→3') ^a	bp	GC (%)	T _m (° C) ^b
5'-Cy3-markierte DNA-Sonden				
Pedio23S5	GCG GAT AAT AGT CGA TTA AAA CTA	24	33	57,7
Pedio23S6	CTG AAC TGA GGG ATC TTC AT	20	45	58,3
Unmarkierte Helfersonden (Oligonukleotide)				
Pedio23S5H1	TTG GGT TKC CCC ATT CG	17	55	58,4
Pedio23S5H2	TTC ACA CAT CCT ATG WAT TCA GAT	24	33	57,7
Pedio23S6H1	CTT TGG TAA CTC AAA TGT TCA G	22	36	57,0
Pedio23S6H2	CAG ACT GTT CGG CTA TGA AA	20	45	58,3
Pedio23S6H3	TTT GCC TAC GGG GCT AT	17	52	57,1

^a K = G oder T; W = A oder T.

^b Mittlere Schmelztemperaturen laut Angaben des Herstellers (siehe Kapitel 2.4).

2.6 Puffer und Lösungen

2.6.1 DNA-Isolierung

DNA-Isolierung aus Gram-positiven Bakterien

• Lyse-Puffer

• TRIS, pH 8,0	20 mM
• EDTA	2 mM
• Triton X [®] -100	1,2 %
• deion. Wasser	ad 50 ml
• Lysozym (kurz vor Gebrauch zugeben)	20 mg / ml

DNA-Isolierung aus Hefen

• Sorbitol-Lösung

• Sorbitol	1 M
• EDTA	100 mM
• β-Mercaptoethanol	14 mM
• deion. Wasser	ad 50 ml

2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

• Agarosegel (1,5 %)

• Agarose	2,25 g
• 1 x TBE-Puffer (pH 8,3)	150 ml
• Natronwasserglas (35 %)	0,15 ml

• DNA-Färbelösung

• Ethidiumbromid (10 mg / ml)	200 µl
• 1 x TBE-Puffer	1000 ml

• TBE-Elektrophoresepuffer (10 x, pH 8,3)

• TRIS	890 mM
• Borsäure	890 mM
• EDTA · 2 H ₂ O	20 mM
• deion. Wasser	ad 1000 ml

2.6.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

• Antibleichlösung

• DABCO (Diazabicyclooctan)	234 mg
• Glycerin (100 %)	8 ml
• steriles, deion. Wasser	ad 10 ml

• Ethanolreihe (50 %, 70 %, 96 %)

• Ethanol (96 %) in 1 x PBS-Puffer	
------------------------------------	--

• DAPI-Stammlösung (1000 x)

• DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole)	2 mg
• steriles deion. Wasser	ad 1 ml

• Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide

• Cy3-Sonden	100 pmol / µl
• steriles deion. Wasser	

• Hybridisierungspuffer (pH 7,2)

• TRIS	20 mM
• NaCl-Lösung (2,7 M)	900 mM
• SDS-Lösung (10 %)	0,01 %
• Dextransulfat	0,1 g / ml

• Lysozym-Lösung (pH 8,0)

• TRIS	120 mg
• EDTA · 2 H ₂ O	37 mg
• deion. Wasser	ad 100 ml
• Lysozym (frisch zugeben)	10 mg / ml

• PBS-Puffer (1 x, pH 7,4)

• NaCl	8,76
• KCl	0,22 g
• Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	1,14 g
• KH ₂ PO ₄	0,2 g
• deion. Wasser	ad 1000 ml

• Waschpuffer

- identische Zusammensetzung wie der Hybridisierungspuffer, jedoch ohne Dextransulfat.

2.6.4 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese**• TAE-Puffer (50 x, pH 7,4)**

• TRIS	121 g
• Essigsäure	28,55 g
• EDTA · 2 H ₂ O	9,306 g
• deion. Wasser	ad 500 ml

• APS-Lösung (1 M)

• Ammoniumpersulfat	0,228 g
• deion. Wasser	ad 1 ml

• DNA-Färbelösung

• Ethidiumbromid (10 mg / ml)	200 µl
• 1 x TAE-Puffer	1000 ml

2.7 Nährmedien

MRS-Medium (modifiziert) (pH 5,2 bis pH 6,5)

• Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)	10 g
• Fleischextrakt	10 g
• Hefeextrakt	5 g
• Glucose · 1 H ₂ O	20 g
• Tween 80	1 g
• Di-Kaliumhydrogenphosphat	2 g
• Natriumacetat	5 g
• Ammoniumcitrat	2 g
• Magnesiumsulfat · 7 H ₂ O	0,2 g
• Mangansulfat · 1 H ₂ O	0,05 g
• Agar	13 g
• Tomatensaft (zentrifugiert)	50 ml
• deion. Wasser	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde je nach Optimum des Bakteriums eingestellt, das kultiviert werden sollte (pH 5,2 bis 6,5).

Die Anreicherung von Milchsäurebakterien erfolgte in MRS-Flüssigmedium. Um das Hefewachstum zu unterdrücken, wurden dem Medium 0,01 % Cycloheximid (100 mg / l) nach Autoklavieren und Abkühlen (ca. 50 °C) steril zugegeben.

Tomatensaft-Medium (pH 5,2)

• Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)	20 g
• Hefeextrakt	5 g
• Pepton aus Fleisch	5 g
• Glucose · 1 H ₂ O	5 g
• Tween 80	50 mg
• Agar	13 g
• Tomatensaft (zentrifugiert)	250 ml
• deion. Wasser	ad 1000 ml

YPG-Medium (pH 6,5)

• Hefeextrakt	10 g
• Pepton aus Fleisch	20 g
• Glucose · 1 H ₂ O	10 g
• Agar	13 g
• deion. Wasser	ad 1000 ml

LB-Medium (pH 7,0)

• Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)	10 g
• Hefeextrakt	5 g
• NaCl	10 g
• Agar	15 g
• deion. Wasser	ad 1000 ml

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen (ca. 50 °C) wurden 100 mg Ampicillin und 2 ml X-Gal (20 mg / ml in Dimethylformamid) steril zugegeben.

Alle Nährmedien wurden für 15 min bei 121 °C autoklaviert.

2.8 Organismen**2.8.1 *Pediococcus*-Stämme aus Kulturensammlungen**

Neben den Typstämmen der verschiedenen *Pediococcus*-Arten wurden einige weitere *Pediococcus*-Stämme der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig bezogen (Tab. 10). Außerdem wurden mehrere *Pediococcus*-Stämme der Kulturensammlungen der Fachhochschule „École d'ingénieurs de Changins“, Nyon, Schweiz, und der Firma Lallemand, Toulouse, Frankreich für die Untersuchungen verwendet (Tab. 10).

Tab. 10. Verwendete *Pediococcus*-Stämme aus externen Kulturensammlungen

Stamm	Spezies	Kulturensammlung ^a	Isoliert aus	Referenz
DSM 1056	<i>P. acidilactici</i>	DSMZ	unbekannt	Microlife Technics
DSM 14800 ^T	<i>P. claussenii</i>	DSMZ	Bier	Dobson et al., 2002
DSM 20284 ^T	<i>P. acidilactici</i>	DSMZ	Gerste	Lindner, 1887
DSM 20285 ^T	<i>P. inopinatus</i>	DSMZ	Bierhefe	Back, 1978b
DSM 20287	<i>P. inopinatus</i>	DSMZ	Bier	Back, 1978b
DSM 20331 ^T	<i>P. damnosus</i>	DSMZ	Bierhefe	Claussen, 1903
DSM 20332 ^T	<i>P. parvulus</i>	DSMZ	Silage	Günther & White, 1961
DSM 20335 ^T	<i>P. dextrinicus</i>	DSMZ	Silage	Coster & White, 1964
DSM 20293	<i>P. dextrinicus</i>	DSMZ	Bier	Back, 1978a
DSM 20334	<i>P. dextrinicus</i>	DSMZ	Silage	Günther & White, 1961
DSM 20336 ^T	<i>P. pentosaceus</i>	DSMZ	Bierhefe	Mees, 1934

^a DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig; EIC: École d'ingénieurs de Changins, Nyon, Schweiz; LAL: Lallemand, Toulouse, Frankreich.

^T Typstamm

Tab. 10. Verwendete *Pediococcus*-Stämme aus externen Kulturensammlungen (Fortsetzung)

Stamm	Spezies	Kulturensammlung ^a	Isoliert aus	Referenz
DSM 17757 ^T	<i>P. cellicola</i>	DSMZ	Kellerwand	Zhang et al., 2005
DSM 18001 ^T	<i>P. stilesii</i>	DSMZ	Maistreber	Franz et al., 2006
BPc 149	<i>P. parvulus</i>	EIC	Wein	Prof. Dr. Serge Hautier
BPc 152	<i>P. parvulus</i>	EIC	Wein	
BPc 158	<i>P. parvulus</i>	EIC	Wein	
BPc 184	<i>P. parvulus</i>	EIC	Wein	
BPc 260	<i>P. damnosus</i>	EIC	Wein	
B473	<i>P. acidilactici</i>	LAL	unbekannt	
B474	<i>P. pentosaceus</i>	LAL	unbekannt	
B475	<i>P. pentosaceus</i>	LAL	unbekannt	

^a DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig; EIC: École d'ingénieurs de Changins, Nyon, Schweiz; LAL: Lallemand, Toulouse, Frankreich.

^T Typstamm

Aus der Kulturensammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz wurden 42 Stämme der Gattung *Pediococcus* verwendet (Tab. 11). Mit Ausnahme von Stamm B254 wurden alle institutseigenen *Pediococcus*-Stämme aus Wein- bzw. Mostproben isoliert. Stamm B254 wurde ursprünglich aus Weißkraut isoliert. Die Exopolysaccharid-Synthese wurde während des Wachstums auf MRS-Agar dokumentiert (siehe Kap. 2.9.2).

Tab. 11. Verwendete *Pediococcus*-Stämme des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung

Stamm	Spezies	Kulturensammlung ^a	EPS-Bildung ^b
Hock B2.1	<i>P. damnosus</i>	IMW	+
Hock B2.2	<i>P. damnosus</i>	IMW	+
B7	<i>P. damnosus</i>	IMW	-
B8	<i>P. damnosus</i>	IMW	+
B9	<i>P. damnosus</i>	IMW	-
B12	<i>P. damnosus</i>	IMW	-
B13	<i>P. parvulus</i>	IMW	-
B14	<i>P. damnosus</i>	IMW	+
B15	<i>P. damnosus</i>	IMW	-
B16	<i>P. damnosus</i>	IMW	-
B42	<i>P. parvulus</i>	IMW	-
B44	<i>P. parvulus</i>	IMW	-
B47	<i>P. damnosus</i>	IMW	-
B55	<i>P. damnosus</i>	IMW	-

^a IMW: Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz.

^b Exopolysaccharid (EPS)-Bildung auf MRS-Agar. Abkürzungen: +: EPS-positiv; -: EPS-negativ.

Tab. 11. Verwendete *Pediococcus*-Stämme des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung (Fortsetzung)

Stamm	Spezies	Kultursammlung ^a	EPS-Bildung ^b
B68	<i>P. damnosus</i>	IMW	-
B69	<i>P. damnosus</i>	IMW	-
B78	<i>P. damnosus</i>	IMW	-
B89	<i>P. damnosus</i>	IMW	-
B91	<i>P. damnosus</i>	IMW	+
B93	<i>P. damnosus</i>	IMW	+
B97	<i>P. damnosus</i>	IMW	-
B98	<i>P. damnosus</i>	IMW	-
B99	<i>P. damnosus</i>	IMW	-
B123	<i>P. pentosaceus</i>	IMW	-
B125	<i>P. pentosaceus</i>	IMW	-
B140	<i>P. parvulus</i>	IMW	-
B141	<i>P. parvulus</i>	IMW	-
B254	<i>P. pentosaceus</i>	IMW	-
B266	<i>P. parvulus</i>	IMW	-
B267	<i>P. parvulus</i>	IMW	-
B391	<i>P. parvulus</i>	IMW	-
B395	<i>P. parvulus</i>	IMW	+
B397	<i>P. parvulus</i>	IMW	+
B398	<i>P. parvulus</i>	IMW	+
B399	<i>P. parvulus</i>	IMW	+
B400	<i>P. parvulus</i>	IMW	+
B401	<i>P. parvulus</i>	IMW	-
B404	<i>P. parvulus</i>	IMW	-
B405	<i>P. parvulus</i>	IMW	+
B427	<i>P. parvulus</i>	IMW	+
B428	<i>P. parvulus</i>	IMW	-

^a IMW: Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz.

^b Exopolysaccharid (EPS)-Bildung auf MRS-Agar. Abkürzung: (+): EPS-positiv; (-): EPS-negativ.

2.8.2 *Pediococcus*-Eigenisolate aus Wein

Aus Traubenmost und Wein wurden insgesamt 47 *Pediococcus*-Stämme isoliert (Tab. 12). Es wurden Proben verwendet, die bereits auf das Vorhandensein der Weinhefe *Dekkera* / *Brettanomyces bruxellensis* untersucht worden sind (Röder, 2007). Die Fähigkeit der *Pediococcus*-Stämme zur Exopolysaccharid-Synthese wurde dokumentiert (siehe Kap. 2.9.2).

Tab. 12. *Pediococcus* Eigenisolate aus Wein- und Mostproben

Stamm ^a	Spezies	Herkunft (Ort)	Isoliert aus	EPS-Bildung ^b
B440 (9)	<i>P. parvulus</i>	Schafhausen	Spätburgunder	-
B441 (30)	<i>P. parvulus</i>	Alsheim	St. Laurent	-
B442 (34)	<i>P. parvulus</i>	Mettenheim	Cabernet-Sauvignon	-
B443 (35)	<i>P. parvulus</i>	Mettenheim	Merlot	+
B444 (115)	<i>P. parvulus</i>	Flornborn	Blauer Portugieser	-
B445 (128)	<i>P. parvulus</i>	Framersheim	Cabernet-Sauvignon	+
B446 (152)	<i>P. parvulus</i>	Ludwigshöhe	Blauer Portugieser	-
B447 (153)	<i>P. parvulus</i>	Guldental	Regnet	-
B448 (21)	<i>P. parvulus</i>	Mauchenheim	Blauer Portugieser	-
B449 (36 A)	<i>P. parvulus</i>	Mettenheim	Dornfelder	-
B450 (36 B)	<i>P. parvulus</i>	Mettenheim	Dornfelder	-
B451 (1)	<i>P. damnosus</i>	Ingelheim	Blauer Portugieser	-
B452 (2)	<i>P. damnosus</i>	Ingelheim	Blauer Portugieser	-
B453 (22)	<i>P. parvulus</i>	Dittelsheim	Spätburgunder	-
B454 (49)	<i>P. parvulus</i>	Bechtheim	Schwarzriesling	-
B455 (52)	<i>P. damnosus</i>	Bechtheim	Dornfelder	+
B456 (218 A)	<i>P. parvulus</i>	Monzernheim	Dornfelder	-
B457 (140)	<i>P. parvulus</i>	Gimbsheim	Merlot	+
B458 (141)	<i>P. parvulus</i>	Gimbsheim	Spätburgunder	+
B459 (143)	<i>P. parvulus</i>	Guntersblum	St. Laurent	-
B460 (139)	<i>P. parvulus</i>	Gimbsheim	St. Laurent	+
B476 (207)	<i>P. parvulus</i>	Flornborn	Cabernet-Sauvignon	-
B477 (210)	<i>P. parvulus</i>	Eppelsheim	Dunkelfelder	-
B478 (217)	<i>P. parvulus</i>	Monzernheim	Regnet	-
B479 (218 B)	<i>P. damnosus</i>	Monzernheim	Dornfelder	-
B480 (254)	<i>P. parvulus</i>	Weinsberg	Lemberger	-
B481 (255)	<i>P. parvulus</i>	Weinsberg	Spätburgunder	-
B482 (260)	<i>P. parvulus</i>	Mainz	Dornfelder	-
B483 (261)	<i>P. parvulus</i>	Mainz	Spätburgunder	-
B484 (262)	<i>P. parvulus</i>	Mainz	Dornfelder	+
B485 (263)	<i>P. parvulus</i>	Mainz	Blauer Portugieser	-
B486 (264)	<i>P. parvulus</i>	Mainz	Spätburgunder	-
B487 (269)	<i>P. parvulus</i>	Nieder-Olm	Spätburgunder	-
B488 (270)	<i>P. parvulus</i>	Klein-Winternheim	Spätburgunder	-
B489 (276)	<i>P. parvulus</i>	Essenheim	Spätburgunder	-
B490 (284)	<i>P. parvulus</i>	Ingelheim	Spätburgunder	-
B491 (285)	<i>P. parvulus</i>	Ingelheim	Cabernet-Sauvignon	+
B492 (286)	<i>P. parvulus</i>	Ingelheim	Spätburgunder	+
B493 (287)	<i>P. parvulus</i>	Ingelheim	Samtrot	+

^a Alle Eigenisolate wurden in der institutseigenen Stammsammlung (IMW) hinterlegt. Die Angaben in Klammern beziehen sich auf die Weinprobe, aus der die Stämme isoliert wurden.

^b Exopolysaccharid (EPS)-Bildung auf MRS-Agar. Abkürzungen: +: EPS-positiv; -: EPS-negativ.

Tab. 12. *Pediococcus* Eigenisolate aus Wein- und Mostproben (Fortsetzung)

Stamm ^a	Spezies	Herkunft (Ort)	Isoliert aus	EPS-Bildung ^b
B494 (288)	<i>P. parvulus</i>	Ingelheim	Frühburgunder	-
B495 (289)	<i>P. parvulus</i>	Ingelheim	Frühburgunder	-
B496 (291)	<i>P. parvulus</i>	Großwinternheim	Spätburgunder	+
B497 (292)	<i>P. parvulus</i>	Großwinternheim	Regent	+
B498 (293)	<i>P. parvulus</i>	Großwinternheim	Regent	-
B499 (297)	<i>P. parvulus</i>	Appenheim	Spätburgunder	-
B700 (298)	<i>P. parvulus</i>	Appenheim	Merlot	+
B701 (299)	<i>P. parvulus</i>	Gau-Algesheim	Merlot	-

^a Alle Eigenisolate wurden in der institutseigenen Stammsammlung (IMW) hinterlegt. Die Angaben in Klammern beziehen sich auf die Weinprobe, aus der die Stämme isoliert wurden.

^b Exopolysaccharid (EPS)-Bildung auf MRS-Agar. Abkürzungen: +: EPS-positiv; -: EPS-negativ.

2.8.3 *Oenococcus oeni*-Stämme

Aus einigen Weinproben konnten Stämme der Art *Oenococcus oeni* isoliert werden (Tab. 13). Bei der Auswahl der Weinproben wurde darauf geachtet, dass die Weine einen spontanen biologischen Säureabbau durchgeführt hatten, also nicht zuvor mit kommerziell erhältlichen Starterkulturen angeimpft wurden.

Tab. 13. Eigenisolate der Gattung *Oenococcus* aus rheinhessischen Weinen

Stamm ^a	Spezies	Herkunft (Ort)	Isoliert aus
B461 (85)	<i>Oenococcus oeni</i>	Flörsheim-Dalsheim	Lemberger
B462 (86)	<i>Oenococcus oeni</i>	Flörsheim-Dalsheim	Rehberger
B463 (61)	<i>Oenococcus oeni</i>	Gundersheim	Blauer Portugieser
B464 (62)	<i>Oenococcus oeni</i>	Gundersheim	St. Laurent
B465 (90)	<i>Oenococcus oeni</i>	Worms	St. Laurent
B466 (102)	<i>Oenococcus oeni</i>	Monsheim	Deckrot
B467 (139)	<i>Oenococcus oeni</i>	Gimbsheim	St. Laurent
B468 (147)	<i>Oenococcus oeni</i>	Guntersblum	Dornfelder
B469 (63)	<i>Oenococcus oeni</i>	Gundersheim	Spätburgunder
B470 (92)	<i>Oenococcus oeni</i>	Worms	Syrah
B471 (29)	<i>Oenococcus oeni</i>	Alsheim	Spätburgunder
B472 (32)	<i>Oenococcus oeni</i>	Alsheim	Cabernet-Sauvignon

^a Alle Eigenisolate wurden in der institutseigenen Stammsammlung (IMW) hinterlegt. Die Angaben in Klammern beziehen sich auf die Weinprobe, aus der die Stämme isoliert wurden.

Zur Untersuchung der Verwandtschaft von *Oenococcus oeni*-Stämmen wurden verschiedene Stämme aus der institutseigenen Kulturensammlung verwendet (Tab. 14). Die meisten Stämme wurden ursprünglich aus Starterkulturen isoliert.

Tab. 14. Verwendete *Oenococcus oeni*-Stämme des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung

Stamm	Kultursammlung ^a	Herkunft (Firma)
B70	IMW	Starterkultur „LittoMalique Rouge“ (Erbslöh)
B236	IMW	Winzergenossenschaft Freyburg, Unstrut
B325	IMW	Staatl. Versuchs- und Lehranstalt f. Wein- u. Obstbau, Weinsberg
B350	IMW	Starterkultur „Viniflora oenos“ (DSM 70008) (Hansen)
B352	IMW	Starterkultur „LALVIN <i>Leuconostoc oenos</i> “ (Lallemand)
B351	IMW	Starterkultur „BioStart oenos SK1“ (Erbslöh)
B354	IMW	Starterkultur ANA-Start (Lallemand)
B358	IMW	Weingut Meyer-Näkel, Dernau
B359	IMW	Weingut Meyer-Näkel, Dernau
B367	IMW	Weingut Wasem, Ingelheim
B377	IMW	Weingut Meyer-Näkel, Dernau
B378	IMW	Weingut Meyer-Näkel, Dernau
B417	IMW	Starterkultur „BioStart Forte SK2“ (Erbslöh)
B418	IMW	Starterkultur „BioStart Bianco SK3“ (Erbslöh)
B716	IMW	Starterkultur „LittoMalique blanc mit Aktivator“ (Erbslöh)
B717	IMW	Starterkultur „LittoMalique blanc ohne Aktivator“ (Erbslöh)
B718	IMW	Starterkultur „ViniBacti 222“ (Vino Bios)
B719	IMW	Starterkultur „ViniBacti 666“ (Vino Bios)
B720	IMW	Starterkultur „ViniBacti Stamm 7“ (Vino Bios)
B721	IMW	Starterkultur (Tegaferm)

^a IMW: Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz.

2.8.4 Weitere Milchsäurebakterien

Bei der Untersuchung von *Oenococcus oeni*-Starterkulturen konnten Milchsäurebakterien verschiedener Arten isoliert und identifiziert werden (Tab. 15).

Tab. 15. Eigenisolate verschiedener Milchsäurebakterien aus *Oenococcus oeni*-Starterkulturen

Stamm ^a	Spezies	Isoliert aus Starterkultur	Hersteller
B702	<i>Pediococcus acidilactici</i>	„Pr. BSA rot“	Hersteller 1
B704	<i>Pediococcus acidilactici</i>	„Nf. oenos“	Hersteller 2
B722	<i>Pediococcus acidilactici</i>	„Pr. BSA rot 5“	Hersteller 1
Isolat 5.4	<i>Pediococcus acidilactici</i>	„Pr. BSA rot 5“	Hersteller 1
Isolat 5.6	<i>Pediococcus acidilactici</i>	„Pr. BSA rot 5“	Hersteller 1
Pr. „groß“	<i>Enterococcus faecium</i>	„Pr. BSA rot“	Hersteller 1
3857-1	<i>Enterococcus faecium</i>	„Nf. Bio“	Hersteller 2
3858-1	<i>Enterococcus faecium</i>	„Nf. oenos“	Hersteller 2

^a Die mit „B“ gekennzeichneten Stämme wurden in die institutseigene Stammsammlung übernommen.

Tab. 15. Eigenisolate verschiedener Milchsäurebakterien aus *Oenococcus oeni*-Starterkulturen
(Fortsetzung)

Stamm ^a	Spezies	Isoliert aus Starterkultur	Hersteller
Isolat 5.2	<i>Enterococcus faecium</i>	„Pr. BSA rot 5“	Hersteller 1
Isolat 5.3	<i>Enterococcus faecium</i>	„Pr. BSA rot 5“	Hersteller 1
Isolat 6.1	<i>Enterococcus faecium</i>	„Pr. BSA weiß 6“	Hersteller 1
Isolat 6.2	<i>Enterococcus faecium</i>	„Pr. BSA weiß 6“	Hersteller 1
B703	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	„Pr. BSA rot neu“	Hersteller 1

^a Die mit „B“ gekennzeichneten Stämme wurden in die institutseigene Stammsammlung übernommen.

Für einige Versuche wurden Bakterienstämme der Gattungen *Lactobacillus* (Tab. 16), *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* und *Streptococcus* (Tab. 17) aus der institutseigenen Kultursammlung verwendet.

Tab. 16. Verwendete Stämme unterschiedlicher *Lactobacillus*-Arten

Stamm	Spezies	Kultursammlung ^a
DSM 20176 ^T	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	DSMZ
B146	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	IMW
B268	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	IMW
B271	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	IMW
B272	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	IMW
B706	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	IMW
B17	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	IMW
B48	<i>Lactobacillus casei</i>	IMW
B136	<i>Lactobacillus casei</i>	IMW
B178	<i>Lactobacillus casei</i>	IMW
B179	<i>Lactobacillus suntoryeus</i>	IMW
B715	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	IMW
B260	<i>Lactobacillus brevis</i>	IMW
B31	<i>Lactobacillus buchneri</i>	IMW
B190	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	IMW
DSM 20205	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSMZ
B38	<i>Lactobacillus plantarum</i>	IMW
B158	<i>Lactobacillus plantarum</i>	IMW
B201	<i>Lactobacillus plantarum</i>	IMW
B191	<i>Lactobacillus frumenti</i>	IMW
B168	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	IMW

^a DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig; IMW: Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz.

^T Typstamm

Tab. 17. Verwendete Bakterien-Stämme der Gattungen *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* und *Streptococcus*

Stamm	Spezies	Kultursammlung ^a
DSM 20346 ^T	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	DSMZ
DSM 20484 ^T	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	DSMZ
DSM 20343 ^T	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	DSMZ
B27	<i>L. mesenteroides</i>	IMW
B28	<i>L. mesenteroides</i>	IMW
B29	<i>L. mesenteroides</i>	IMW
B30	<i>L. mesenteroides</i>	IMW
B39	<i>L. mesenteroides</i>	IMW
B113	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	IMW
B114	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	IMW
B116	<i>L. pseudomesenteroides</i>	IMW
B117	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	IMW
E.d.	<i>Enterococcus durans</i>	IMW
B152	<i>Enterococcus faecalis</i>	IMW
B153	<i>Enterococcus faecalis</i>	IMW
B210	<i>Enterococcus faecalis</i>	IMW
E. sp. J.F.	<i>Enterococcus</i> sp.	IMW
B238	<i>Lactococcus lactis</i>	IMW
B71	<i>Streptococcus mutans</i>	IMW

^a DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig; IMW: Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz.

^T Typstamm

2.8.5 Hefe-Stämme

Zur Untersuchung der Verwandtschaft von Hefen der Gattungen *Saccharomyces* und *Pichia* wurden Stämme aus Starterkulturen und verschiedener Kultursammlungen verwendet (Tab. 18).

Tab. 18. Verwendete Hefen der Gattungen *Saccharomyces* und *Pichia*

Stamm	Spezies	Herkunft ^a	Isoliert aus
DSM 70449 ^T	<i>S. cerevisiae</i>	DSMZ	Bier
DSM 70412 ^T	<i>S. bayanus</i>	DSMZ	Bier
DSM 6580 ^T	<i>S. pastorianus</i>	DSMZ	Bier
KOH1	<i>S. cerevisiae</i>	IMW	Sekt, fermentiert mit SIHA 4 (Begerow)
KOH2	<i>S. cerevisiae</i>	IMW	Sekt, fermentiert mit SIHA 4 (Begerow)

^a DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig; IMW: Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz; Erbslöh: Erbslöh Geisenheim AG, Geisenheim; ZEFÜG: Zentraleinkauf für Getränkebehandlungsmittel, Alzey; Gon-Cruz: Gon-Cruz, Haro, La Rioja, Spanien.

^T Typstamm

Tab. 18. Verwendete Hefen der Gattungen *Saccharomyces* und *Pichia* (Fortsetzung)

Stamm	Spezies	Herkunft ^a	Isoliert aus
KOH3	<i>S. cerevisiae</i>	IMW	Sekt, fermentiert mit SIHA 4 (Begerow)
KOH4	<i>S. cerevisiae</i>	IMW	Sekt, fermentiert mit SIHA 4 (Begerow)
Hefix 2000	<i>S. cerevisiae</i>	Erbslöh	Starterkultur Hefix 2000 / Freddo
1272	<i>S. cerevisiae</i>	IMW	Wein
Oenoferm	<i>S. cerevisiae</i>	Erbslöh	Starterkultur Oenoferm InterDry
Anaferm	<i>S. cerevisiae</i>	ZEFÜG	Starterkultur Anaferm Primo
Primusvin	<i>S. cerevisiae</i>	Gon-Cruz	Starterkultur Primusvin
IOC	<i>S. cerevisiae</i>	Erbslöh	IOC-Champagnerhefe
1543	<i>P. anomala</i>	IMW	Wein
1615	<i>P. anomala</i>	IMW	Wein
1635	<i>P. anomala</i>	IMW	Wein

^a DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig; IMW: Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz; Erbslöh: Erbslöh Geisenheim AG, Geisenheim; ZEFÜG: Zentraleinkauf für Getränkebehandlungsmittel, Alzey; Gon-Cruz: Gon-Cruz, Haro, La Rioja, Spanien.

^T Typstamm

Folgende Stämme der Gattungen *Brettanomyces* / *Dekkera bruxellensis* wurden durch nested SAPD-PCR untersucht (Tab. 19). Außer dem Typstamm wurden alle Stämme aus Weinproben isoliert und in der institutseigenen Stammsammlung hinterlegt (Röder, 2007).

Tab. 19. Verwendete Hefen der Gattungen *Dekkera* / *Brettanomyces*

Stamm ^a	Spezies	Herkunft (Ort) ^b	Region
DSM 70001 ^T	<i>D. bruxellensis</i>	DSMZ	-
St.9A	<i>D. bruxellensis</i>	Schafhausen	Wonnegau
St.9B	<i>D. bruxellensis</i>	Schafhausen	Wonnegau
St.30A	<i>D. bruxellensis</i>	Alsheim	Nierstein
St.30B	<i>D. bruxellensis</i>	Alsheim	Nierstein
St.34A	<i>D. bruxellensis</i>	Mettenheim	Nierstein
St.34B	<i>D. bruxellensis</i>	Mettenheim	Nierstein
St.35A	<i>D. bruxellensis</i>	Mettenheim	Nierstein
St.35B	<i>D. bruxellensis</i>	Mettenheim	Nierstein
St.75A	<i>D. bruxellensis</i>	Abenheim	Wonnegau
St.75B	<i>D. bruxellensis</i>	Abenheim	Wonnegau
St.76	<i>D. bruxellensis</i>	Abenheim	Wonnegau
St.115	<i>D. bruxellensis</i>	Flomborn	Wonnegau
St.128	<i>D. bruxellensis</i>	Framersheim	Wonnegau
St.153A	<i>D. bruxellensis</i>	Guldental	Nahe
St.179B	<i>D. bruxellensis</i>	Weinolsheim	Nierstein

^a St.: Stamm

^b DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig.

^T Typstamm

Tab. 19. Verwendete Hefen der Gattungen *Dekkera* / *Brettanomyces* (Fortsetzung)

Stamm ^a	Spezies	Herkunft (Ort) ^b	Region
St.183A	<i>D. bruxellensis</i>	Uelversheim	Nierstein
St.183B	<i>D. bruxellensis</i>	Uelversheim	Nierstein
St.190A	<i>D. bruxellensis</i>	Dolgesheim	Nierstein
St.190B	<i>D. bruxellensis</i>	Dolgesheim	Nierstein
St.198	<i>D. bruxellensis</i>	Alzey	Wonnegau
St.199	<i>D. bruxellensis</i>	Alzey	Wonnegau
St.200	<i>D. bruxellensis</i>	Alzey	Wonnegau
St.230	<i>D. bruxellensis</i>	Biebelnheim	Nierstein
St.238A	<i>D. bruxellensis</i>	Gau-Odernheim	Nierstein
St.238B	<i>D. bruxellensis</i>	Gau-Odernheim	Nierstein
St.243	<i>D. bruxellensis</i>	Bermersheim	Nierstein
St.244A	<i>D. bruxellensis</i>	Bermersheim	Nierstein
St.244B	<i>D. bruxellensis</i>	Bermersheim	Nierstein
St.253	<i>D. bruxellensis</i>	Weinsberg	Württemberg
St.256	<i>D. bruxellensis</i>	Weinsberg	Württemberg
St.259A	<i>D. bruxellensis</i>	Mainz	Nierstein
St.259B	<i>D. bruxellensis</i>	Mainz	Nierstein
St.260A	<i>D. bruxellensis</i>	Mainz	Nierstein
St.260B	<i>D. bruxellensis</i>	Mainz	Nierstein
St.282	<i>D. bruxellensis</i>	Ingelheim	Bingen
St.283	<i>D. bruxellensis</i>	Ingelheim	Bingen
St.295	<i>D. bruxellensis</i>	Großwinternheim	Bingen
St.296	<i>D. bruxellensis</i>	Großwinternheim	Bingen
St.299	<i>D. bruxellensis</i>	Gau-Algesheim	Bingen

^a St.: Stamm^b DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig.^T Typstamm

2.8.6 Weinreben

Zur Überprüfung, ob die durch RAPD PCR bisher nicht differenzierbaren Unterlagsreben der Sorten Selektion Oppenheim Nr. 4 (SO4) und Binova (Mutation aus SO4) durch nested SAPD-PCR unterschieden werden können, wurden die in Tab. 20 aufgeführten Reben verwendet. Als Unterlagsrebe wird der untere Teil eines gepfropften Rebstocks bezeichnet, dessen Wurzelstock von einer reblausresistenten Hybridsorte gebildet wird. Außerdem wurden Versuche mit verschiedenen Spätburgunder-Klonen durchgeführt, die sich in der Anordnung ihrer Beeren an den Trauben unterscheiden (Tab. 20). Diese Variationen konnten bisher ebenfalls nicht durch DNA-Fingerprintverfahren differenziert werden. Alle Proben wurden von Dr. Tatjana Wolf (Forschungsanstalt Geisenheim) zur Verfügung gestellt.

Tab. 20. Verwendete Proben zur nested SAPD-PCR mit Weinreben

Probe	Sorte	Spezies	Ausprägung
161	Selektion Oppenheim Nr. 4 (SO4)	<i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis riparia</i>	-
162			
163			
165	Binova (SO4-Mutation)	<i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis riparia</i>	-
164	Spätburgunder	<i>Vitis vinifera</i>	kleinbeerig
166			kompakt
167			aufrecht
168			lockerbeerig

2.8.7 Mäuse

Zur Überprüfung, ob die nested SAPD-PCR auch zur Differenzierung von Labormäusen (*Mus musculus*) geeignet ist, wurden acht verschiedene Mäuse untersucht (Maus A, B, 2, 3, 5, 6, 7, 8). Die Mäuse A und B waren Wurfgeschwister. Maus 2 war mit den Mäusen A und B verwandt. Alle anderen Mäuse waren nicht direkt miteinander verwandt. Die Proben wurden von Dr. Bernd Lecher (MFD-Diagnostics GmbH, Wendelsheim) zur Verfügung gestellt.

2.8.8 Mensch

Neben den Versuchen zur Differenzierung von Labormäusen wurde überprüft, ob die Verwandtschaftsverhältnisse von zwei menschlichen Familien durch nested SAPD-PCR nachvollzogen werden können. Dazu wurde DNA aus menschlichen Blutzellen der Angehörigen der Familien I und II und von außenstehenden Probanden untersucht (Tab. 21). Die Blutproben wurden von der Kinderärztin Dr. Ute Hackemesser (Mainz) intravenös entnommen.

Tab. 21. Zur nested SAPD-PCR verwendete menschliche DNA aus Blut

Proband ^a	Gruppe	Verwandtschaft ^a
E I (♂)	Familie I	Vater von K1 I (♂) und K2 I (♀). Bruder von Proband E II (♀).
E I (♀)		Mutter von K1 I (♂) und K2 I (♀).
K1 I (♂)		Kind von E I (♂) und E I (♀).
K2 I (♀)		Kind von E I (♂) und E I (♀).
E II (♂)	Familie II	Vater von den Probanden K1 II (♀) und K2 II (♀).
E II (♀)		Mutter von K1 II (♀) und K2 II (♀). Schwester von Proband E I (♂).
K1 II (♀)		Kind von E II (♂) und E II (♀).
K2 II (♀)		Kind von E II (♂) und E II (♀).

^a E: Elter; K: Kind; Z: Zwilling; A: Außstehende(r); ♂: männlich; ♀: weiblich

Tab. 21. Zur nested SAPD-PCR verwendete menschliche DNA aus Blut (Fortsetzung)

Proband ^a	Gruppe	Verwandschaft ^a
Z1 (♀)	Außen- gruppe	Zwilling zu Z2 (♀). Nicht verwandt mit Familie I, II und A1-A3.
Z2 (♀)		Zwilling zu Z1 (♀). Nicht verwandt mit Familie I, II und A1-A3.
A1 (♂)		Nicht verwandt mit Familie I und II, Z1, Z2, A2, A3.
A2 (♂)		Nicht verwandt mit Familie I und II, Z1, Z2, A1, A3.
A3 (♀)		Nicht verwandt mit Familie I und II, Z1, Z2, A1, A2.

^a E: Elter; K: Kind; Z: Zwilling; A: Außstehende(r); ♂: männlich; ♀: weiblich

2.9 Kultivierung

2.9.1 Isolierung und Kultivierung der Milchsäurebakterien

Zur Isolierung von Milchsäurebakterien aus Wein wurden insgesamt 100 Weinproben von 42 Weingütern untersucht. Die aus dem Weinanbaugebiet Rheinhessen stammenden Proben wurden von Weingütern der Regionen Wonnegau, Nierstein und Bingen direkt vor Ort entnommen und bis zur Verwendung im Kühlschrank (4 °C) aufbewahrt (Röder, 2007). Es sollten vor allem Stämme der Gattung *Pediococcus* isoliert werden. Außerdem wurden neue *Oenococcus oeni*-Stämme aus Weinen isoliert, die einen spontanen biologischen Säureabbau durchgeführt hatten.

Je nach Zelldichte in der Weinprobe wurden 5 ml Flüssigmedium mit 2 bis 5 ml der aufgeschüttelten Proben in Reagenzgläsern angeimpft. Zur Anreicherung von Pediokokken wurde MRS-Medium verwendet. Die Anreicherung der Oenokokken erfolgte in Tomatensaft-Medium. Das Wachstum von Hefen wurde durch die Zugabe von Cycloheximid unterdrückt. Die Ansätze wurden eine Woche bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Kultur entnommen und mit einem Drigalski-Spatel auf MRS- bzw. Tomatensaft-Agar (mit Cycloheximid) ausplattiert und eine Woche (oder bis Kolonien entstanden waren) bei 30 °C inkubiert. Die Zellen einzelner Kolonien wurden mikroskopisch überprüft und bei Vorhandensein von typischen Zellformen (*Pediococcus*: Diplokokken und Kokken in Tetraden; *Oenococcus*: Diplokokken und Kokken in Ketten) mit einer Impföse ausgestrichen. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis Reinkulturen entstanden waren.

Zur Isolierung von Milchsäurebakterien aus Starterkulturen wurden jeweils 50 mg der Starterkultur in 1 ml NaCl-Lösung (0,9 %) gelöst. Anschließend wurde je eine Impföse der Suspension auf MRS-Agar ausgestrichen. Die Platten wurden mehrere Tage bei 30 °C in-

kubiert bis Kolonien entstanden waren. Durch mehrmaliges Ausstreichen einzelner Kolonien konnten schließlich Reinkulturen gewonnen werden.

Außer den *Oenococcus oeni*-Stämmen wurden alle Milchsäurebakterien in MRS Flüssigmedium oder auf MRS-Agar (De Man et al., 1960; modifiziert) kultiviert. Die Oenokokken wurden ausschließlich auf Tomatensaftmedium kultiviert. Der pH-Wert des Nährmediums wurde je nach pH-Optimum des betreffenden Bakteriums zwischen 5,2 und 6,5 eingestellt. Alle Milchsäurebakterien wurden als Reinkulturen in Flüssigmedium in Stammhaltung genommen. Nach dem Anwachsen (ca. 3 bis 10 Tage) bei 30 °C wurden die Kulturen im Kühlschrank (4 °C) aufbewahrt und alle 3 Monate in MRS-Flüssigmedium überimpft. Die Aufbewahrung der Bakterien aus der institutseigenen Kulturensammlung erfolgte bei - 80 °C in Nährmedium mit Glycerin (10 %).

2.9.2 Qualitativer Nachweis der Exopolysaccharid-Synthese

Die Fähigkeit der *Pediococcus*-Stämme zur Exopolysaccharid-Synthese wurde durch einen einfachen „Zahnstochertest“ untersucht. Dafür wurden die Stämme mehrere Tage auf MRS-Agar bei 20 °C inkubiert. Anschließend wurde mit einem sterilen Zahnstocher in einzelne Kolonien eingestochen. Bei Exopolysaccharid-produzierenden Stämmen konnte ein Faden aus viskosem Schleim beim Zurückziehen des Zahnstochers beobachtet werden (Abb. 2). Durch Negativkontrastierung mit Tusche konnte das Exopolysaccharid um die Zellen mikroskopisch dargestellt werden. Da die Tusche-Partikel nicht in das Exopolysaccharid eindringen konnten, blieb das Glucan um die Zellen weiß (Abb. 3).

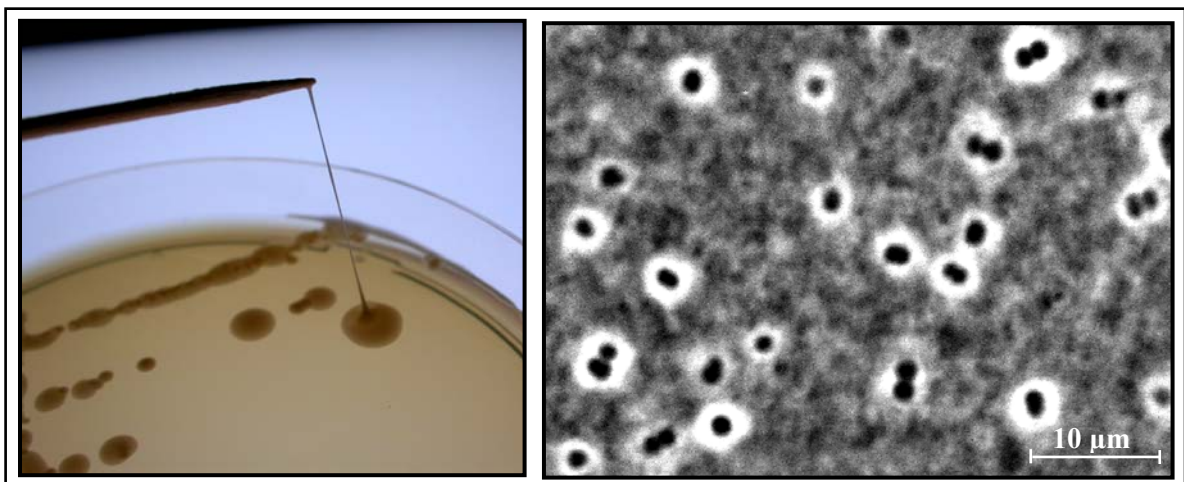


Abb. 3. Exopolysaccharid-bildende Kolonien der Spezies *P. parvulus* auf MRS-Agar (links). Beim Einstechen in die Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher läßt sich ein Faden aus viskosem Schleim ausziehen. Abbildung rechts: Negativdarstellung der Exopolysaccharid-Hüllen von *P. parvulus*-Zellen unter Verwendung von Tusche.

2.9.3 Isolierung und Kultivierung der Hefen

Für die Isolierung von Hefe-Stämmen aus Starterkulturen wurden jeweils 50 mg der Starterkultur in 1 ml NaCl-Lösung (0,9 %) gelöst. Anschließend wurde je eine Impföse der Suspension auf YPG-Agar ausgestrichen. Die Platten wurden mehrere Tage bei Raumtemperatur (RT) inkubiert bis Kolonien entstanden waren. Alle Hefe-Stämme wurden in YPG-Flüssigmedium oder auf YPG-Agar kultiviert. Nach dem Anwachsen (ca. 4 Tage bei RT) wurden die Hefen im Kühlschrank (4 °C) aufbewahrt. Für die DNA-Isolierung wurden die Stämme auf YPG-Platten ausgestrichen und bei RT 3-4 Tage bis zur Zellernte inkubiert.

2.10 DNA-Isolierung

2.10.1 DNA-Isolierung aus Gram-positiven Bakterien

Zur Isolierung genomischer DNA aus Milchsäurebakterien wurde das DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die DNA-Isolierung erfolgte nach dem Protokoll für Gram-positive Bakterien wie im Handbuch des Herstellers beschrieben. Als Ausgangsmaterial wurde eine Suspension (in 0,9 % NaCl-Lösung) mit ca. 10^8 - 10^9 Zellen einer Kultur auf Nährmedium oder 1-2 ml Flüssigkultur eingesetzt. Die Zellen wurden für 5 min bei 9.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml NaCl-Lösung (0,9 %) resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Zellwand-Lyse wurden die Zellen anschließend in 180 µl Lyse-Puffer (mit Lysozym) resuspendiert und bei 37 °C für mindestens 30 min inkubiert. Die Aufreinigung genomischer DNA erfolgte über eine Silica-Gel-Membran aus dem Kit ohne Phenol-Chloroform Extraktion. Durch Zentrifugation wurde die DNA selektiv an die Membran der DNeasy[®]-Säule gebunden. Proteine und zweiwertige Kationen wurden in zwei darauffolgenden Waschschrritten mit ethanolhaltigen Puffern von der Säule entfernt. Anschließend wurde die DNA mit 100-200 µl Puffer (10 mM TRIS, 0,5 mM EDTA, pH 9,0) von der Säule eluiert. Die DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Isolierung bakterieller DNA aus Traubenmost und Wein wurden zwischen 1 und 100 ml Probe bei 9.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit NaCl-Lösung (0,9 %) gewaschen. Die DNA-Isolierung erfolgte nach dem Protokoll für Gram-positive Bakterien. Um eine ausreichende Reinheit der DNA zu gewährleisten und störende Substanzen zu entfernen, musste die DNA nach der Eluierung mit dem zweifachen Volumen Ethanol gefällt und über eine zweite DNeasy[®]-Säule erneut aufgereinigt werden.

2.10.2 DNA-Isolierung aus Hefen

Die Isolierung genomischer DNA aus Hefen erfolgte unter Verwendung des DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden). Die DNA-Isolierung wurde nach dem Zusatzprotokoll für Hefen, erhältlich auf der Webseite des Herstellers (<http://www.qiagen.com>), durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurde eine Suspension (in 0,9 % NaCl-Lösung) mit ca. $5 \cdot 10^7$ Zellen einer 2 bis 3 Tage alten Kultur auf Nährmedium verwendet. Nach einem Waschschrift in NaCl-Lösung (0,9 %) wurden die Zellen in 600 µl Sorbitol-Puffer (mit 200 U Lyticase) resuspendiert und bei 30 °C für 30 min inkubiert. Anstelle der Verwendung von Lyticase zum Zellaufschluss konnten die Hefezellen auch mit Lysozym (20 mg / ml in Sorbitol-Puffer, pH 5,0) und Inkubation bei 37 °C für 30 min erfolgreich lysiert werden. Neben der Wirkung als Muramidase besitzt Lysozym aus Hühnereiweiß auch eine gewisse Chitinase-Aktivität. Anschließend folgte die DNA-Aufreinigung über eine Silica-Gel-Membran nach dem gleichen Prinzip wie im Abschnitt für Gram-positive Bakterien beschrieben (siehe Kap. 2.10.1).

2.10.3 DNA-Isolierung aus Weinreben

Zur DNA-Isolierung aus Rebenblättern wurden jeweils 100 mg junge Blätter verwendet. Die Blätter wurden vor dem Zellaufschluss bei -70 °C aufbewahrt. Der Zellaufschluss wurde mit Mörser und Pistill in Gegenwart von flüssigem Stickstoff durchgeführt. Die DNA-Isolierung erfolgte mit dem innuPREP Plant DNA Kit (Analytik Jena, Jena) nach Angaben des Herstellers.

2.10.4 DNA-Isolierung aus Gewebe (*Mus musculus*)

Es wurden die Schwanzspitzen von 7 Labormäusen (Maus A, B, 2, 3, 5, 6, 8) zur DNA-Isolierung verwendet. Von jeder Maus wurden 2 cm der Schwanzspitze dekapitiert. Die DNA-Isolierung erfolgte mit dem DNeasy[®] Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll „Purification of Total DNA from Rodent Tails“.

2.10.5 DNA-Isolierung aus menschlichen Blutzellen

Das Blut der 13 Probanden wurde intravenös von einer Ärztin entnommen. Die DNA-Isolierung aus Blutzellen wurde mit dem DNeasy[®] Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.10.6 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit

Je 5 μl der isolierten DNA wurden zur Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit mit der LabelGuard™ Mikroliterküvette (Implen, München) in einem Photometer gemessen. Die Konzentrationsbestimmung von DNA basiert auf dem Absorptionsmaximum der DNA bei 260 nm. Für die Absorption bei dieser Wellenlänge sind die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Der Deckel der Mikroküvette bildet eine Messkammer mit einer definierten optischen Schichtdicke von 1 mm. Bei einer Schichtdicke von 1 mm entspricht ein OD_{260} -Wert von 1 einem Gehalt an doppelsträngiger (ds)DNA von 500 ng / μl (Handbuch LabelGuard™ Mikroliterküvette). Da die Proben unverdünnt gemessen wurden, errechnete sich die Konzentration der DNA-Probe ausschließlich unter Berücksichtigung des Multiplikationsfaktors. $c [\text{ng} / \mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \cdot 500$.

Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Proteine) erlaubte Rückschlüsse auf eine Kontamination mit Proteinen, deren Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten ebenfalls im UV-Bereich absorbieren. Bei pH 7,5 besitzt eine reine DNA ein A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 1,8 - 2,0 (Handbuch DNeasy® Blood & Tissue Kit, Qiagen, Hilden).

2.11 Analyse ribosomaler Gensequenzen

Die Untersuchung ribosomaler Gensequenzen bzw. der dazwischen liegenden sogenannten Internal Transcribed Spacer (ITS)-Region wird häufig zur Gattungs- und Art-Identifizierung von Pro- und Eukaryoten verwendet. Vor allem die Sequenzierung der small subunit (SSU) ribosomalen Gensequenz (16S rDNA bei Prokaryoten bzw. 18S rDNA bei Eukaryoten) spielt bei der Identifizierung unbekannter Organismen eine große Rolle. Als Zielregionen für die Bindung der Oligonukleotide dienen die hoch konservierten Bereiche am 5'- und 3'-Ende der ribosomalen Gene. Durch die Amplifizierung der ribosomalen Gene, deren Sequenzierung und Vergleich mit hinterlegten Sequenzen aus Datenbanken kann die Gattungs- und Art-Zugehörigkeit ermittelt werden. Neben der rein taxonomischen Identifizierung von Organismen können die ribosomalen Gensequenzen darüber hinaus auch zur Erstellung phylogenetischer Stammbäume zur Verwandtschafts-Analyse genutzt werden.

2.11.1 Amplifizierung der 16S rDNA (Milchsäurebakterien)

Die Amplifizierung des 16S rRNA Gens zur Art-Identifizierung der Milchsäurebakterien erfolgte mit den konservierten Primern PurEubak5 und PurEubak3 (Tab. 2). Die Zusammensetzung eines 50 µl PCR-Ansatzes ist in Tab. 22 angegeben.

Tab. 22. Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur Amplifizierung der 16S rDNA

Komponente (Stammlösung)	Volumen (µl)	Bezogen auf 50 µl
Forward-Primer: PurEubak5 (10 µM)	1	0,2 µM
Reverse-Primer: PurEubak3 (10 µM)	1	0,2 µM
dNTP-Mix (40 mM)	1	800 µM
MgCl ₂ (25 mM)	2	1 mM ^a
PCR-Puffer (10 x) (enthält 20 mM MgCl ₂)	5	1 x
Enhancer Solution P (5 x)	5	0,5 x
Wasser	31	-
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1 U / µl)	2	2 U
Template-DNA (20 ng / µl)	2	40 ng
Gesamtvolumen	50	

^a Die Gesamtkonzentration an MgCl₂ im Reaktionsansatz betrug 3 mM

Die Amplifizierung erfolgte unter den in Tab. 23 angegebenen Reaktionsbedingungen in einem Thermocycler.

Tab. 23. Bedingungen für PCR-Amplifikation von 16S rDNA

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	Initial-Denaturierung	95	5
2	Denaturierung	94	1
3	Annealing	56	1
4	Elongation	72	1,5
5	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Elongation	72	10

Die PCR-Produkte wurden anschließend aufgereinigt, gelelektrophoretisch analysiert, mit dem Primer PurEubak5 sequenziert und mit hinterlegten Sequenzen aus Datenbanken verglichen (siehe Kap. 2.11.4 - 2.11.6).

2.11.2 Amplifizierung der ITS-Regionen (Hefen)

Zur Amplifizierung der Internal Transcribed Spacer (ITS)-Regionen von Hefen wurden die konservierten Primer ITS1 (F) und ITS4 (R) (White et al., 1990) (Tab. 3) in einer PCR verwendet. Da der Forward-Primer am 3'-Ende der 18S rDNA bindet und der Reverse-Primer am 5'-Ende der 26S rDNA, konnte der komplette ITS1-5,8S rDNA-ITS2-Bereich amplifiziert werden. Die Reaktionsansätze enthielten die gleiche Zusammensetzung wie in Tab. 22 angegeben. Abweichend von den Reaktionsbedingungen in Tab. 23 betrug die Annealing-Temperatur in dieser Reaktion 55 °C und die Elongationszeit wurde auf 40 Sekunden verkürzt.

Die PCR-Produkte wurden anschließend aufgereinigt, gelelektrophoretisch analysiert, mit dem Primer ITS1 (F) sequenziert und mit hinterlegten Sequenzen aus der NCBI-Datenbank verglichen (siehe Kap. 2.11.4 - 2.11.6).

2.11.3 Amplifizierung der 23S rDNA zur Sequenzierung (*Pediococcus*)

Das 23S rRNA-Gen der neun *Pediococcus*-Typstämme (Tab. 10) wurde amplifiziert und sequenziert. Zunächst wurden Sequenzalignments der 23S rDNA und der 5S rDNA verwandter Milchsäurebakterien aus Datenbanken erstellt. Die Primer wurden so generiert, dass sie komplementär zu konservierten Regionen der beiden Gene waren. Zur Amplifizierung des kompletten 23S rRNA-Gens wurden die beiden Primer P23S_F1 und P5S_R (Tab. 2) verwendet. Die Primer hybridisieren am 5'-Ende der 23S rDNA (P23S_F1) bzw. am 3'-Ende der 5S rDNA (P5S_R). Die Reaktionsansätze enthielten die gleiche Zusammensetzung wie in Tab. 22 angegeben. Abweichend von den Reaktionsbedingungen in Tab. 23 wurde die Annealing-Temperatur auf 55 °C herabgesetzt und die Elongationszeit auf 3 Minuten verlängert.

Das PCR-Produkt wurde anschließend aufgereinigt, gelelektrophoretisch analysiert und sequenziert (siehe Kapitel 2.11.4 - 2.11.6). Die Sequenzierung erfolgte für jeden *Pediococcus*-Typstamm mit den in Tab. 2 angegebenen Sequenzier-Primern. Für die Spezies *Pediococcus parvulus* wurde anstelle des Primers P23S_F5 der Primer P23S_F5-PPA verwendet.

2.11.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Bevor die PCR-Produkte sequenziert wurden, mussten sie einer Aufreinigung unterzogen werden. Dadurch wurden Rückstände aus dem PCR-Ansatz, wie freie Primer, Nukleotide und Taq-Polymerase entfernt, die sich negativ auf die Sequenzierung auswirken können.

Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick[®] PCR Purifikation Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Die gereinigte DNA wurde in 30 µl Elutionspuffer (10 mM TRIS, pH 8,5) aufgenommen.

2.11.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse der PCR-Fragmente erfolgte in einem 1,5 %-igen Agarosegel in einer Horizontalelektrophorese-Kammer. Für ein Agarosegel (25 x 10 cm) wurden 2,25 g Agarose in 150 ml 1 x TBE-Puffer eingewogen und unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer aufgeköcht. Nach dem Abkühlen (ca. 50 °C) wurde die Lösung in einen Gelträger eingegossen und an einem Ende ein Kamm eingesetzt. Nach dem Erkalten des Gels wurde der Kamm herausgezogen und das Gel in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Je 5 µl PCR-Produkt wurden mit 1 µl Ladepuffer (6 x) vermischt und in die geformten Geltaschen pipettiert. Um die Länge der Fragmente nach der Trennung abschätzen zu können, wurden 6 µl eines DNA-Längenstandards mit auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 60 min bei 100 V. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (2 mg / l) für 15 min inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenem Ethidiumbromid wurde das Gel anschließend für 10 min in deion. Wasser inkubiert. Das so behandelte Gel wurde in einer Geldokumentationseinheit (BioVision CN 3000, Vilber-Lourmat, Eberhardzell) photographisch dokumentiert.

2.11.6 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1977), und wurde von der Firma Eurofins-MWG (Martinsried) als Auftragsarbeit durchgeführt. Alle neu-identifizierten DNA-Sequenzen wurden mit den verfügbaren, hinterlegten Sequenzen aus der NCBI Datenbank „GenBank“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verglichen (BLAST-Suche).

Das komplette 23S rRNA-Gen der *Pediococcus*-Typstämme wurde in 5 Abschnitten mit den in Tab. 2 angegebenen Sequenzier-Primern in beide Richtungen (5' ↔ 3') sequenziert. Die 23S rDNA-Teilsequenzen wurden in ClustalX 1.83 (Thompson et al., 1997) aligniert. Anschließend wurden die Teilsequenzen anhand von überlappenden Sequenzbereichen zu einer Sequenz zusammengesetzt.

2.12 Phylogenetische Untersuchung der Gattung *Pediococcus*

Zur Berechnung eines phylogenetischen 23S rDNA-Stammbaumes wurde ein 23S rDNA-Sequenzalignment der *Pediococcus*-Typstämme mit verwandten Milchsäurebakterien aus Datenbanken unter Verwendung der Software ClustalX 1.83 (Thompson et al., 1997) durchgeführt. Das Alignment wurde mit der Software GeneDoc (Nicholas & Nicholas, 1997) editiert. Die Berechnung und Konstruktion phylogenetischer Bäume erfolgte mithilfe des Programm-Pakets PHYLIP 3.65 (Felsenstein, 1989). Es wurden ausschließlich Alignment-Positionen berücksichtigt, die in mindestens 50 % der Sequenzen identisch waren (50 % Gewichtung). Drei verschiedene Stammbäume wurden mit den Modellen Maximum Likelihood (Felsenstein, 1981), Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987) und Maximum Parsimony berechnet.

Zur statistischen Absicherung wurden Bootstrap-Analysen durchgeführt. Der Bootstrap-Wert gibt für jede Verzweigung an, wie oft sie aus den Datensätzen stabil berechnet werden konnte. Es wurden jeweils 100 Baumkonstruktionen berechnet. Die Gruppe *Staphylococcus aureus* und *S. carnosus* wurde als outgroup angegeben. Die phylogenetischen Stammbäume wurden mit TreeView (Page, 1996) editiert.

2.13 Identifizierung von Pediokokken mit spezifischen PCR-Primern

2.13.1 Gattungs-Identifizierung

Anhand des Alignments der 23S rDNA-Sequenzen der *Pediococcus*-Typstämme mit anderen, nahe verwandten Milchsäurebakterien (Kap. 8.2) wurden zunächst die Primer Pedio23S_F und Pedio23S_R (Tab. 4) generiert, die zur Identifizierung aller typischen *Pediococcus*-Arten geeignet waren. Für die Identifizierung der atypischen Art, *P. dextrinicus* wurde das Primerpaar PDE23S_F und PDE23S_R (Tab. 4) generiert. Die Bindungspositionen der Primer sind im 23S rDNA-Alignment (Kap. 8.2) grau hinterlegt.

Die erwartete DNA-Fragmentlänge zur Identifizierung der typischen *Pediococcus*-Arten (Primer Pedio23S_F und Pedio23S_R) ist 701 bp. Für die Identifizierung von *P. dextrinicus* (Primer PDE23S_F und PDE23S_R) wurde ein DNA-Fragment mit einer Länge von 514 bp erwartet. Um die Spezifität der ausgewählten Primerpaare zu ermitteln, wurden PCR-Ansätze mit verwandten Milchsäurebakterien-Arten durchgeführt.

Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur PCR-Identifizierung der typischen *Pediococcus*-Arten und der atypischen Art, *P. dextrinicus* ist in Tab. 24 angegeben. Die Amplifizierung erfolgte unter den in Tab. 25 angegebenen Reaktionsbedingungen.

Tab. 24. Reaktionsansatz zur 23S rDNA basierenden Identifizierung der Gattung *Pediococcus*

Komponente (Stammlösung)	Volumen (µl)	Bezogen auf 25 µl
Forward-Primer: Pedio23S_F bzw. PDE23S_F (10 µM)	0,5	0,2 µM
Reverse-Primer: Pedio23S_R bzw. PDE23S_R (10 µM)	0,5	0,2 µM
dNTP-Mix (40 mM)	0,5	800 µM
PCR-Puffer (10 x) (enthält 15 mM MgCl ₂)	2,5	1 x
Wasser	19	-
Taq-DNA-Polymerase (1 U / µl)	1	1 U
Template-DNA (20 ng / µl)	1	20 ng
Gesamtvolumen	25	

Tab. 25. Bedingungen für PCR-Amplifikation zur Identifizierung der Gattung *Pediococcus*

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	Initial-Denaturierung	95	5
2	Denaturierung	94	0,5
3	Annealing	69,5	0,5
4	Elongation	72	0,5
5	32 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Elongation	72	5

2.13.2 Art-Identifizierung durch Multiplex PCR

Durch Verwendung zweier oder mehrerer Oligonukleotidpaare können bei der Multiplex PCR verschiedene DNA-Abschnitte im selben Reaktionsgefäß gleichzeitig amplifiziert werden (Chamberlain et al., 1988). Mit dieser Methode lassen sich Deletionen, Insertionen oder Punktmutationen innerhalb eines Genoms detektieren (Edwards & Gibbs, 1994; Mahony, 1996). Voraussetzung hierfür ist die Kenntnis der betreffenden Gensequenz.

Basierend auf den ermittelten 23S rRNA-Gensequenzen der *Pediococcus*-Arten wurde eine Multiplex PCR Methode entwickelt, die zur Identifizierung von einer oder von mehreren Arten aus einer Bakterienkultur oder aus Weinproben geeignet war. Im 23S rDNA-Alignment (Kap. 8.2) wurden Bereiche ausgewählt, die eine Artunterscheidung der typischen *Pediococcus*-Arten erlauben. So wurde für jede Art ein spezifischer Forward-Primer konstruiert, der zusammen mit einem universellen Reverse-Primer ein charakteristisches PCR Amplifikat ergab. Bei der Konstruktion der Oligonukleotide wurde darauf geachtet,

dass jeder Forward-Primer zusammen mit dem Reverse-Primer in der PCR zu einem Amplifikat führte, das sich anhand der Sequenzlänge gelelektrophoretisch von allen anderen Amplifikaten unterscheiden ließ. Die Sequenzen der verwendeten Multiplex PCR-Primer sind in Tab. 4 angegeben. Die Bindungspositionen aller Primer wurden im 23S rDNA-Alignment grau hinterlegt (siehe Anhang Kap. 8.2).

Die Multiplex PCR wurde in einem Thermocycler unter Verwendung des Qiagen® Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden) (Hanselle et al., 2003) durchgeführt. Das Kit besteht aus einem Mastermix, der eine „Hot Start“ Taq-DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl₂, und Reaktionspuffer enthält. Die acht spezifischen Forward-Primer wurden zusammen mit dem universellen Reverse-Primer zu einem 10-fach konzentrierten Primer-Mix gemischt. Zur Multiplex PCR wurde ein PCR-Beschleuniger, die Qiagen Q-Solution verwendet, die das Bindungsverhalten der Primer an die Template-DNA beeinflusst (Handbuch Multiplex PCR Kit, Qiagen, Hilden).

Die erwarteten Längen der PCR-Produkte zur Identifizierung der *Pediococcus*-Arten waren 2244 bp für *P. damnosus*, 1840 bp für *P. stilesii*, 1647 bp für *P. pentosaceus*, 1517 bp für *P. parvulus*, 866 bp für *P. cellicola*, 711 bp für *P. inopinatus*, 620 bp für *P. claussenii*, und 213 bp für *P. acidilactici*.

Zunächst wurde die Multiplex PCR mit der DNA jedes *Pediococcus*-Typstammes durchgeführt, um die Primer auf Spezifität und Kreuzreaktionen zu untersuchen. Anschließend wurden DNA-Mischungen aller Arten mit der Methode untersucht. Zusätzlich wurden Negativkontrollen mit DNA verwandter Milchsäurebakterien durchgeführt, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur Multiplex PCR ist in Tab. 26 angegeben.

Tab. 26. Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur Multiplex PCR

Komponente (Stammlösung)	Volumen (µl)	Bezogen auf 25 µl
Multiplex PCR Mastermix (2 x)	12,5	1 x
10 x Primer-Mix (2 µM je Primer)	2,5	0,2 µM je Primer
Q-Solution (5 x)	2,5	0,5 x
Wasser	6,5	-
Template-DNA (20 ng / µl)	1	20 ng
Gesamtvolumen	25	

Die Multiplex PCR von 23S rRNA-Gensequenzen erfolgte mit einem Touchdown-PCR Programm (Don et al. 1991) unter den in Tab. 27 angegebenen Bedingungen in einem

Thermocycler. Bei der Touchdown-PCR wird während einer bestimmten Zyklenzahl die Anlagerungstemperatur schrittweise von einem Wert oberhalb der T_m auf einen niedrigeren abgesenkt. Durch die sukzessive Annäherung an die optimale Annealing-Temperatur wurde die Spezifität der Reaktion erhöht und es konnten Fehlpaarungen der Primer verhindert werden.

Tab. 27. Thermocycler Programm zur Multiplex PCR

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	Initial-Denaturierung	95	15
2	Denaturierung	94	0,5
3	Annealing	69 (- 0,3 °C)	1
4	Elongation	72	1
5	10 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Denaturierung	94	0,5
7	Annealing	66	1
8	Elongation	72	1
9	22 Zyklen beginnend bei Nr. 6		
10	Finale Elongation	72	10

Ermittlung der Multiplex PCR Nachweisgrenze

Zur Ermittlung der Multiplex PCR Nachweisgrenze wurde Wein (Müller-Thurgau) mit *P. damnosus* (DSM 20331^T) und *P. parvulus* (DSM 20332^T) in einer Zellzahl von 10^8 Zellen / ml angeimpft. Ausgehend von dieser Zellzahl wurden Verdünnungen in Wein hergestellt und die DNA aus den Proben isoliert (siehe Kap. 2.10.1). Für die Ermittlung der Multiplex PCR Nachweisgrenze wurde die Anzahl der PCR-Zyklen von 32 auf 35 erhöht.

2.14 Generierung von rRNA-Sekundärstrukturen mit Structure Star

Zur Generierung von Sonden für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung wurden zunächst rRNA-Sekundärstrukturen erstellt. Die Erstellung der rRNA-Sekundärstrukturen erleichterte das Generieren von Sonden nach dem Helfer-Sonden-Prinzip (Fuchs et al., 2000) und dem Gemeinschafts-Sonden-Effekt (Fröhlich & König, 2002; Fröhlich et al., 2003; Hirschhäuser et al., 2005; Röder et al., 2007). Die rRNA-Sekundärstrukturen der neun *Pediococcus*-Arten wurden mit einer neu entwickelten Software, dem Programm Structure Star 1.0 (Fröhlich, persönliche Mitteilung) in rRNA-Sekundärstrukturen umgewandelt. Die Software ist bisher nur über den Autor erhältlich.

Structure Star ermöglicht das Visualisieren von Primär- und Sekundärstrukturdaten („Referenzsequenzen“) der Gutell-Lab-Comparative RNA Web Site and Project (CRW)-Datenbank (<http://www.rna.ccbb.utexas.edu/>) (Cannone et al., 2002) und das Übertragen dieser Informationen auf homologe Sequenzen („Arbeitssequenzen“). Dafür muss zunächst lediglich die Primärsequenz bekannt sein. Von der Referenzsequenz abweichende Bereiche der Arbeitssequenz können anschließend mittels eines Mfold-Interface (Zucker, 1999) thermodynamisch neu berechnet oder manuell angepasst werden. Es zeigte sich, dass die oftmals neu zu berechnenden variablen Bereiche durch eine rein thermodynamische Berechnung nach dem Zuker-Algorithmus gut beschrieben werden konnten.

Als Referenz-Datei für die Erstellung der 23S rRNA-Sekundärstruktur der Spezies *Pediococcus damnosus* (siehe Kap. 8.3) wurde die 23S rRNA-Sekundärstruktur von *L. lactis* (X68434) (Gutell et al., 1993) der Gutell-Lab-CRW-Datenbank verwendet. Anschließend wurde die neu generierte Struktur als Grundlage zur Generierung der Sekundärstrukturen für die weiteren acht Arten der Gattung *Pediococcus* verwendet.

Allgemeine Vorgehensweise

Zunächst werden die Referenz-Informationen in das Programm eingeladen. Die Referenzdaten setzen sich aus 2 Komponenten zusammen: einer Strukturdatei im PostScript-Format und einer sogenannten CT-Datei. Die PostScript-Datei enthält die Sekundärstruktur-Positionen der Referenzsequenz im Koordinatensystem sowie ihre Primärsequenz (Basenabfolge). Die CT-Datei enthält die Informationen über die Sekundärstruktur in einem für gängige Computerprogramme lesbaren Format. Im Anschluss wird die zu bearbeitende Sequenz (im FASTA-Format) geladen und beide Sequenzen gegeneinander aligniert. Die Struktur-Informationen der Referenzsequenz können jetzt auf die Arbeitssequenz übertragen werden. Nach dem Übertragen der Strukturdaten werden veränderte Basen der Arbeitssequenz im Vergleich zur Referenzsequenz (wahlweise) blau dargestellt und Insertionen (wahlweise) grün hervorgehoben. Deletierte Basen werden in der Struktur nicht dargestellt. Insbesondere die Insertions- aber auch die Deletionsbereiche müssen geprüft und gegebenenfalls manuell oder mittels Mfold optimiert werden.

Um Sequenzbereiche mittels der Mfold-Software thermodynamisch neu zu berechnen, muss der Bereich zunächst selektiert und an Mfold übertragen werden. Nach der Berechnung der thermodynamisch optimalen Sekundärstruktur für den selektierten Bereich kann dieser in die Arbeitssequenz integriert werden (Abb. 4). Gegebenenfalls müssen die neu berechneten Abschnitte manuell verschoben und gedreht werden.

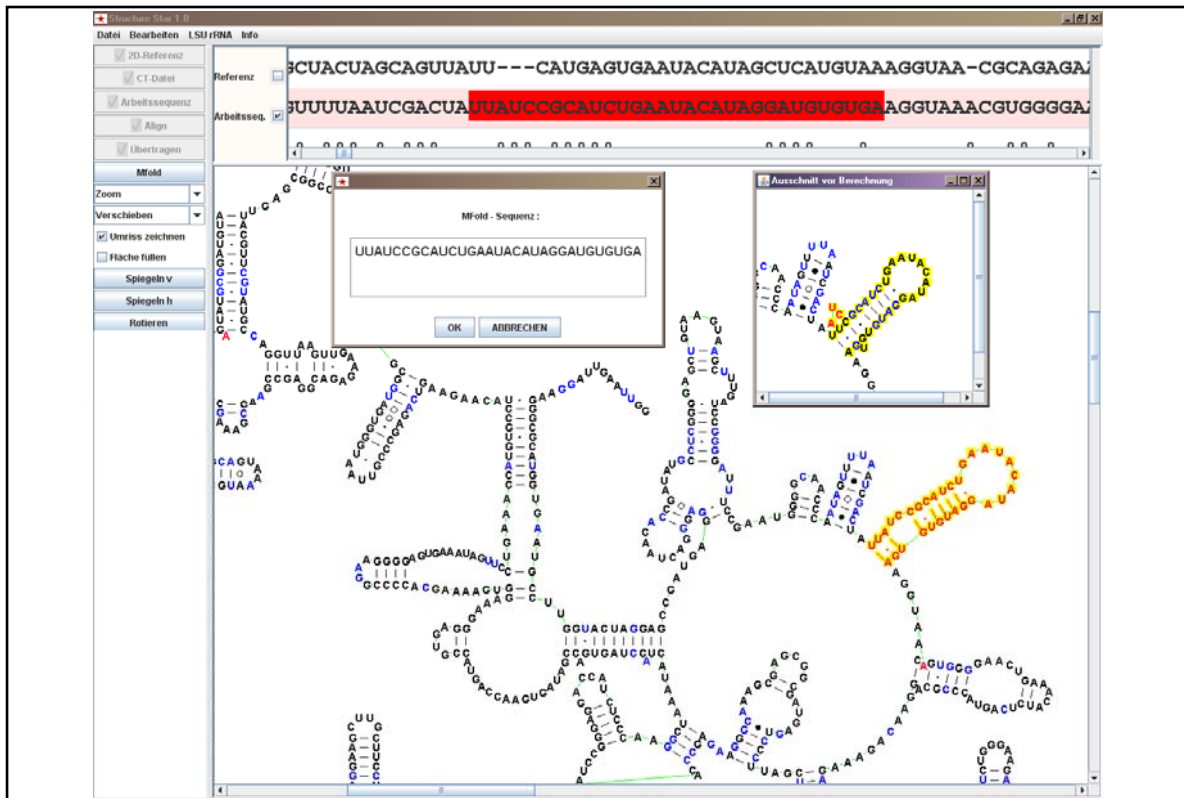


Abb. 4. Oberfläche der Software Structure Star 1.0. Dargestellt ist ein Ausschnitt des 5'-Bereichs der 23S rRNA-Sekundärstruktur der Spezies *P. damnosus*. Die Primärsequenz von *P. damnosus* wurde zuvor auf die Sekundärstruktur von *Lactococcus lactis* übertragen. Im Ausschnitt ist ein Bereich markiert, der an Mfold übertragen und neu gefaltet wurde. Anschließend wurde der neu gefaltete Bereich in die Sekundärstruktur integriert.

2.15 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zur Detektion von Bakterien der Gattung *Pedococcus* in biologischen Präparaten (in situ) durchgeführt. Das Prinzip der FISH besteht in der Anlagerung von Oligonukleotidsonden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, an spezifische Nukleinsäuresequenzen in der Zelle (Leitch et al., 1994).

Anhand der 23S rRNA-Sekundärstrukturdiagramme (Kap. 8.3) und des 23S rDNA-Alignments (Kap. 8.2) wurden Cy3-markierte DNA-Sonden zur Identifizierung der Pediokokken generiert, wobei die Sequenzen der Fluoreszenz-Sonden komplementär zur Basenabfolge der Zielregionen auf der 23S rRNA waren. Zusätzlich zu den Cy3-markierten Sonden wurden unmarkierte Helfersonden konstruiert, die komplementär zu Bereichen in unmittelbarer Nähe der FISH-Sonden waren. Dadurch wurden die Zielbereiche besser zugänglich für die Anlagerung der Fluoreszenz-Sonde und das Signal wurde verstärkt.

Zur Identifizierung verschiedener *Pediococcus*-Arten wurden Hybridisierungsversuche durchgeführt. Außerdem wurden künstliche Mischungen der Pediokokken mit verwandten Milchsäurebakterien in Wein erstellt, um die Spezifität der Sonden und Anwendbarkeit in der Praxis zu überprüfen.

Durchführung der FISH

Jeweils 1 ml Zellsuspension (10^7 - 10^8 Zellen) wurde für 8 min bei 9.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml NaCl-Lösung (0,9 %) suspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml NaCl-Lösung (0,9 %) resuspendiert. Um die Zellen besser vereinzeln zu können, wurde 1 µl Tween 80-Lösung (1 %) zugegeben. Anschließend wurde eine dekadische Verdünnungsreihe bis zur Verdünnungsstufe 10^{-4} in NaCl-Lösung (0,9 %) hergestellt.

Jeweils 5 µl jeder Verdünnungsstufe wurden auf ein Fenster eines Teflon-beschichteten Diagnostik Objektträgers (Menzel, Braunschweig) aufgetragen. Nach dem Trocknen bei RT (ca. 1 h) erfolgte eine Fixierung der Zellen auf dem Objektträger für 10 min bei 90 °C. Direkt im Anschluss an diese Hitzefixierung wurde das Präparat in aufsteigender Reihenfolge mit 50 Vol. %, 70 Vol. % Ethanol in 1 x PBS-Puffer und zweimal mit 96 Vol. % Ethanol für jeweils 5 min entwässert und dann luftgetrocknet.

Auf jedes Feld des Objektträgers wurden 10 µl Lysozym-Lösung pipettiert und vorsichtig verteilt, ohne den Objektträger zu berühren. Der Objektträger wurde in ein 50 ml Probenröhrchen (Cellstar 50 ml PP-Tubes, Greiner Bio-One, Frickenhausen) gelegt und für 30 min bei 37 °C im Hybridisierungssofen inkubiert. Anschließend wurde die Lysozym-Lösung vorsichtig mit deion. Wasser abgespült. Der Objektträger wurde nun ein zweites Mal in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 Vol. %, 70 Vol. % und zweimal 96 Vol. %) für je 5 min entwässert und dann luftgetrocknet.

Während des Entwässerns der Zellen in der zweiten Ethanolreihe wurde die Hybridisierungslösung vorbereitet. Für die Hybridisierungsreaktion wurden 2 µl Cy3-markierte Sonde mit je 2 µl der dazugehörigen Helfersonden gemischt und mit Hybridisierungspuffer auf ein Volumen von 55 µl aufgefüllt. Die Sondenmischung wurde für 15 min bei 70 °C in einem Thermocycler hitzedenaturiert. Wegen der lichtempfindlichen Fluoreszenzmarkierung der Cy3-Sonden erfolgten alle Versuchsabläufe mit den Sonden im Dunkeln.

Sofort nach dem Lufttrocknen des Objektträgers wurde die hitzedenaturierte Sondenmischung gleichmäßig auf den Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas (24 x 60

mm, Menzel, Braunschweig) abgedeckt. Das Präparat wurde anschließend in eine vorgewärmte Hybridisierungskammer (50 ml Reaktionsgefäß, Greiner) überführt, in die zuvor ein mit 1 ml Waschpuffer befeuchteter Filterpapierstreifen gegeben wurde. Die Hybridisierungskammer wurde in einem Hybridisierungsöfen für mindestens 4 Stunden oder über Nacht bei 48 °C inkubiert.

Nach erfolgter Hybridisierung wurde das Deckglas vom Objektträger entfernt und das Präparat zweimal in jeweils 50 ml vorgewärmten Waschpuffer für 15 min bei 50 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit DAPI gegengefärbt. Auf den noch feuchten Objektträger wurden 50 µl 1 x DAPI-Lösung gegeben und das Präparat mit einem Objektträger abgedeckt. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde das Deckglas wieder entfernt und die DAPI-Lösung vorsichtig mit deion. Wasser abgespült. Danach wurden 50 µl Antibleichlösung (DABCO) aufgetragen und das Präparat wieder mit einem Deckglas versehen. Das Präparat wurde bis zur mikroskopischen Auswertung im Dunkeln aufbewahrt.

Die Auswertung der Hybridisierung erfolgte mit einem Epifluoreszenzmikroskop Axiophot 2 (Zeiss, Göttingen) bei 1000-facher Vergrößerung. Zur Anregung des Cy3-Farbstoffs wurde der Filter F41-007 (AHF Analystechnik, Tübingen) verwendet. Mit dem für Cy3 und DAPI konstruierten Kombinationsfilter 28 (Zeiss, Göttingen) konnten beide Signale parallel sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation der mikroskopischen Abbildungen erfolgte mit einer Digitalkamera (Coolpix 4500, Nikon, Tokyo), dabei wurde direkt durch das Okular fotografiert.

2.16 Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese

Die Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) wird häufig zur Untersuchung gemischter mikrobieller Gemeinschaften genutzt (Muyzer et al., 1993; Muyzer & Smalla, 1998). Die Methode kann genutzt werden, um Vielfalt und Zusammensetzung der mikrobiellen Flora im Verlauf von Fermentationsprozessen zu verfolgen (Ercolini, 2004). Durch DGGE können DNA-Sequenzen gleicher Länge entsprechend ihrer Basenabfolge in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Die Denaturierung der DNA wird dabei durch eine zunehmende Konzentration von Harnstoff und Formamid erreicht. So erfolgt die Trennung anhand des Schmelzverhaltens der PCR-Produkte, das je nach Basenabfolge der Sequenz unterschiedlich ist. Nachdem die DNA eine bestimmte Harnstoff-Konzentration im Gel erreicht hat, trennt sich die DNA-Doppelhelix vollständig in zwei

Einzelstränge und die Migration verlangsamt sich stark. Die gleichzeitige Auftrennung bakterieller DNA einer Mischkultur führt zu einem Bandenmuster, wobei jede Bande theoretisch eine Bakterienspezies repräsentiert. Durch DGGE können im Idealfall sogar einzelne Punktmutationen detektiert werden.

PCR zur DGGE

Die Amplifizierung eines variablen 23S rDNA-Bereichs (ca. 350 bp) von Stämmen der Arten *P. parvulus*, *P. damnosus*, *L. mesenteroides*, *O. oeni* und *L. hilgardii* erfolgte mit den konservierten Primern DGGE_F1 und DGGE_R1 (Tab. 5) in einer PCR. Die Bindungspositionen der Primer sind im 23S rDNA-Alignment der Milchsäurebakterien (Kap. 8.2) grau hinterlegt. Die Reaktionsansätze enthielten die gleiche Zusammensetzung wie in Tab. 22 angegeben. Die PCR wurde in einem Thermocycler unter Verwendung eines Touchdown-PCR Programms (Tab. 28) durchgeführt.

Tab. 28. Thermocycler Programm zur PCR mit DGGE-Primern

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	Initial-Denaturierung	95	5
2	Denaturierung	94	0,5
3	Annealing	67 (- 1 °C)	0,5
4	Elongation	72	0,5
5	6 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Denaturierung	94	0,5
7	Annealing	60	0,5
8	Elongation	72	0,5
9	26 Zyklen beginnend bei Nr. 6		
10	Finale Elongation	72	8

Die DGGE erfolgte unter Verwendung des DCode™ Universal Mutation Detection Systems (Bio-Rad, München). Für das Gradientengel wurden die Lösungen A, B und C (Tab. 29) separat in 50 ml Bechergläsern angesetzt. Die Lösungen A und B wurden unter Verwendung des Gradientenmischers bis ca. 1 cm unter der Glaskante gegossen. Anschließend wurde das Gel mit Lösung C bis zur Glaskante aufgefüllt und der Gelkamm eingestellt. Nach dem vollständigen Polymerisieren des Gels (ca. 1 h) wurde der Gelkamm vorsichtig entfernt.

In der Zwischenzeit wurde die DGGE-Kammer mit 7 l TAE-Puffer (1 x) befüllt, das Geräteoberteil aufgesetzt und die Pumpe sowie das Thermostat (63 °C) eingeschaltet. Nach Erreichen der Betriebstemperatur (ca. 1 h) wurde das Gel in die Halterung des DGGE-

Gerätes eingespannt und die Apparatur in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Zum Entfernen denaturierender Verbindungen wurden die Geltaschen vorsichtig mit TAE-Puffer gespült. Das PCR-Produkt wurde mit 6 x Ladepuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 60 °C entweder über Nacht bei 80 V oder für 5 Stunden bei 200 V durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus der Apparatur entfernt und für 20 min in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Anschließend wurde das Gel für 5 min in deion. Wasser inkubiert und in einer Geldokumentationseinheit photographisch dokumentiert.

Tab. 29. Lösungen zur Herstellung eines Gradientengels für die DGGE

Substanz	Lösung A (30 %)	Lösung B (70 %)	Lösung C (0 %)
Harnstoff (g)	2,14	5	-
Formamid (ml)	2,04	4,76	-
50 x TAE (ml)	0,34	0,34	0,17
Acrylamid/Bisacrylamid (ml)	2,77	2,77	1,39
deion. Wasser (ml)	10,15	5,17	6,88
Zum Starten der Polymerisation wurden APS und TEMED zugegeben.			
1 M APS (µl)	100	100	50
TEMED (µl)	5	5	2,5
Summe	17 ml	17 ml	8,5

2.17 Untersuchung von Genen zur Exopolysaccharid-Synthese

Nachweis Polymer-bildender *P. damnosus*-Stämme

Einige Stämme der Art *P. damnosus* sind in der Lage, ein Exopolysaccharid zu bilden, das als β -D-Glucan charakterisiert wurde (Llaubères et al., 1990). Bei Stämmen der Art *P. damnosus* kann diese Eigenschaft Plasmid-gebunden sein (Lonvaud-Funel et al., 1993). Um die Fähigkeit der Glucan-Synthese nachzuweisen wurde eine bereits beschriebene PCR-Methode durchgeführt (Gindreau et al., 2001). Mit dieser Methode kann das Plasmid-codierte *mob*-Gen nachgewiesen werden. Das Gen codiert für ein „mobilization“ Protein, das an der Glucan-Synthese beteiligt ist. Verwandte Gene, die ähnliche Proteine kodieren, wurden bereits bei verschiedenen Exopolysaccharid-bildenden *Lactobacillus*-Arten entdeckt (Bates & Gilbert, 1989; Josson et al., 1990). Ausschließlich bei Glucan-bildenden *P. damnosus*-Stämmen kommt es zur Amplifikation eines 563 bp Produkt mit den Primern

PF5 und PF6 in einer PCR bzw. zu einem 380 bp großen Produkt mit den Primern PF15 und PF16 in einer nested PCR (Gindreau et al., 2001).

Zur PCR wurden zunächst die Primer PF5 und PF6 (Tab. 6) verwendet. Die darauffolgende nested PCR wurde unter Verwendung der Primer PF15 und PF16 (Tab. 6) durchgeführt. Mit dieser Methode wurden 74 Stämme der Arten *P. damnosus* und *P. parvulus* untersucht.

Nachweis der Glycosyltransferase GTF

Zum Nachweis von 1,3- β -D-Glucan-bildenden Bakterien wurde die PCR-Methode nach Werning et al. (2006) durchgeführt. Mit dieser Methode lässt sich das *gtf*-Gen nachweisen, das für eine Glycosyltransferase (GTF) bei verschiedenen Milchsäurebakterien codiert. Die beiden Primer GTFF und GTFR (Tab. 6) bedingen die Amplifizierung eines Bereichs innerhalb des Gens in einer PCR. Die zu erwartenden Amplifikatlängen sind 417 bp für *P. parvulus*. Bisher konnte das *gtf*-Gen mit dieser Methode bei verschiedenen Stämmen der Arten *P. parvulus*, *P. damnosus*, *O. oeni*, *L. diolivorans*, *L. suebicus* und *L. collinoides* nachgewiesen werden. Alle *gtf*-positiven Stämme produzierten ein β -D-Glucan (Werning et al., 2006).

In dieser Arbeit wurden 74 Stämme der Arten *P. parvulus* und *P. damnosus* auf das Vorhandensein des *gtf*-Gens untersucht.

2.18 Nested Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde die nested SAPD-PCR (Pfannebecker, 2005; Fröhlich & Pfannebecker, 2006, 2007) vor allem zur Art- bzw. Stammunterscheidung weinrelevanter Bakterien und Hefen verschiedener Gattungen durchgeführt. Die Methode wurde einerseits zur Art-Identifizierung unbekannter Organismen verwendet, andererseits wurden aber auch Cluster-Analysen zur Differenzierung von Stämmen derselben Art durchgeführt.

2.18.1 Durchführung der SAPD-PCR

Die erste PCR (SAPD-PCR) basiert auf der Methode der RAPD PCR, daher können auch weniger spezifische Primer-Bindungen entstehen. Diese Bindungen sind jedoch notwendig um auf Stamm-Ebene differenzieren zu können. Zur Reduktion der Variabilität wurde eine sogenannte „Rampe“ eingeführt. Die Rampe beschreibt den schrittweisen Temperaturanstieg zwischen Annealing und Elongation des Primers. Die zeitliche Ausdehnung der Rampe

gewährleistet eine reproduzierbare Bindung des Primers an die DNA-Matrize. Nach der ersten PCR kann in der Regel die Art-Zugehörigkeit unbekannter Stämme durch den Vergleich der DNA Fingerprint-Bandenmuster mit den Bandenmustern bekannter Spezies ermittelt werden. Für jede Spezies wird also ein charakteristisches DNA Fingerprint-Bandenmuster generiert. Je nach Organismus können geringe Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen einer Spezies bereits nach der ersten PCR beobachtet werden.

Zur SAPD-PCR wurden Reaktionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 25 µl hergestellt. Die PCR wurde in 200 µl-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Gehaltsangaben einzelner Reagenzien eines Reaktionsansatzes sind in Tab. 30 aufgeführt. Versuche zur Optimierung der SAPD-PCR hatten gezeigt, dass eine Annealing-Temperatur von 35 °C mit anschließender Rampe die besten Ergebnisse lieferte (Pfannebecker, 2005). Das gesamte Thermocycler-Programm (Tab. 31) dauerte je nach Heiz- und Kühlrate des verwendeten Geräts zwischen 11-15 h.

Tab. 30. Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die SAPD-PCR

Komponente (Stammlösung)	Volumen (µl)	Bezogen auf 25 µl
Primer (50 µM)	1	2 µM
dNTP-Mix (40 mM)	1	1,6 mM
MgCl ₂ (20 mM)	2	2 mM ^a
PCR-Puffer (10 x) (enthält 20 mM MgCl ₂)	2,5	1 x
Wasser	12,5	
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1 U / µl)	1	1 U
Template-DNA (20 ng / µl)	5	100 ng
Gesamtvolumen	25	

^a Die Gesamtkonzentration an MgCl₂ im Reaktionsansatz betrug 4 mM

Tab. 31. Thermocycler Programm zur SAPD-PCR

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit
1	Initial-Denaturierung	95	5 min
2	Denaturierung	94	1 min
3	Annealing	35	1 min
4	Rampe (Temperatur Inkrement)	35 (+ 0,5)	12 s
5	15 Zyklen beginnend bei Nr. 4		
6	Annealing	42,5	1 min
7	Rampe (Temperatur Inkrement)	42,5 (+ 1,5)	12 s
8	19 Zyklen beginnend bei Nr. 7		
9	Elongation	72	5 min
10	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
11	Finale Elongation	72	10 min

2.18.2 Durchführung der nested SAPD-PCR

Um Stamm-relevante schwächere Banden an die Intensität anderer Amplifikate anzugleichen, wird in der nested PCR (zweiter PCR-Schritt) ein PCR-Beschleuniger verwendet und die Reaktion ohne Rampe durchgeführt. Das Weglassen der Rampe ist notwendig, da Stamm-relevante Unterschiede sonst nicht zum Ausdruck kommen. Durch Anwendung eines nested Primers, also z.B. Verwendung des Primers A-Not (Tab. 7) in der ersten Reaktion und beispielsweise A-Not-C (Tab. 7) bei der nested PCR wird der Einfluss nicht-reproduzierbarer Banden gemindert oder völlig entfernt.

Die Reaktionsansätze zur nested SAPD-PCR enthielten prinzipiell die gleichen Bestandteile wie Reaktionsansätze zur SAPD-PCR (Tab. 30). Es wurden ebenfalls Reaktionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 25 µl hergestellt. Im Unterschied zur SAPD-PCR wurde bei der nested SAPD-PCR ein Mikroliter Produkt der ersten PCR als Template-DNA verwendet. Außerdem wurden zusätzlich 2,5 µl 5 x Enhancer Solution P (Peqlab, Erlangen) pro Reaktionsansatz zugegeben. Die Annealing-Temperatur betrug bei der nested PCR mit den „A- und T-Not-Primern“ 39 °C und mit den „C- und G-Not- Primern“ 41 °C. Es wurde keine Rampe verwendet (Tab. 32).

Tab. 32. Thermocycler Programm zur nested SAPD-PCR

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	Initial-Denaturierung	95	5
2	Denaturierung	94	1
3	Annealing Primer ^a : A-Not-A, -C, -G, -T und T-Not-A, -C, -G, -T Primer ^a : C-Not-A, -C, -G, -T und G-Not-A, -C, -G, -T	39	1
		41	
4	Elongation	72	5
5	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Elongation	72	10

^a Pro Reaktionsansatz wurde nur 1 Primer verwendet.

2.18.3 Agarose-Gelelektrophorese zur (nested) SAPD-PCR

Die Analyse der PCR-Fragmente erfolgte wie in Kap. 2.11.5 beschrieben, mit dem Unterschied, dass 150 µl (0,035 %) Natronwasserglas vor dem Aufkochen der Agarose in den TBE-Puffer gegeben wurden (Fröhlich & Pfannebecker, 2006). Außerdem wurde die Gelelektrophorese zur (nested) SAPD-PCR bei einer Spannung von 60 V für ca. 2,5 Stunden durchgeführt. Die Zugabe von 0,035 % Natronwasserglas und die Elektrophorese bei nied-

riger Spannung wirkten sich positiv auf die Schärfe der einzelnen Gelbanden aus.

2.18.4 Cluster-Analyse

Im Programm Bio-1D (Vilber Lourmat, Eberhardzell) wurden die einzelnen Banden der Bandenmuster anhand ihrer Sequenzlänge im Vergleich zum Marker ausgewertet und in der Reihenfolge ihres Auftretens dargestellt. Die Daten wurden anschließend in Microsoft Excel in einer 1/0-Datenmatrix zusammengefasst. Anschließend wurde die binäre Datenmatrix transponiert und in Microsoft Word eingefügt. An dieser Stelle wurden eventuell mehrere Datenmatrizen, die durch die Auswertung der Gelbilder gleicher Stämme mit verschiedenen „Not-Primern“ generiert wurden, hintereinander gereiht. Damit die Sequenz in ClustalX (Thompson et al., 1997) eingelesen werden konnte, wurden die Zahlen der Matrix anschließend in „A“ (für 1) und „T“ (für 0) ersetzt. Außerdem wurden einzelne Datenreihen entsprechend der Formatierung des FASTA-Formats mit zugehörigen Stammbezeichnungen versehen (vgl. Anhang 8.5). Die so formatierte Sequenz wurde in ClustalX eingeladen und im PHYLIP (.phy) Format abgespeichert. Anschließend wurde die Datei im Programm DNADIST des PHYLIP 3.65 Programm-Pakets (Felsenstein, 1989) geöffnet. Zur Berechnung der genetischen Distanzen zwischen den unterschiedlichen Stämmen wurde eine Distanz-Matrix mit dem Jukes-Cantor one parameter Modell (Jukes & Cantor, 1969) berechnet. Dieses Modell stellt einen Korrekturfaktor für multiple Substitutionen zur Verfügung, wobei Transitionen (Purin-Purin- bzw. Pyrimidin-Pyrimidin-Substitutionen) und Transversionen (Änderung der Nukleotid-Klasse) gleich berechnet werden. Anschließend wurde die resultierende Datei in NEIGHBOR des PHYLIP-Programmpakets mit dem Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) Algorithmus oder dem Neighbor Joining Algorithmus (Saitou & Nei, 1987) berechnet. UPGMA basiert auf der Annahme der molekularen Uhr, d.h. alle Taxa evolvieren mit derselben konstanten Änderungsrate. Der so generierte Stammbaum wurde in Tree View 1.6.6 (Page, 1996) geöffnet und editiert.

Durch Auswertung der Daten mehrerer Gelbilder, die durch die nested SAPD-PCR mit verschiedenen Primern generiert wurden, konnte der fehlerhafte Einfluss des Auftretens oder Verschwindens einzelner Gelbanden minimiert werden. Die Auswertung von drei Gelbildern reichte in der Regel zur Erstellung eines „stabilen“ Stammbaumes aus.

Für die Milchsäurebakterien *Pediococcus parvulus* und *Oenococcus oeni* wurden Identitäten der durch SAPD-PCR erzeugten DNA Fingerprint-Bandenmuster innerhalb der

jeweiligen Art bestimmt. Dazu wurde das Verhältnis der Anzahl an Gelbanden, die bei allen Stämmen einer Art vorhanden waren zu der Gesamtzahl der Positionen der Datenmatrix bestimmt.

2.19 Sequence Characterized Amplified Region-PCR

In der vorliegenden Arbeit wurden spezifische Primer zur Art-Identifizierung weinschädlicher Milchsäurebakterien konstruiert. Dazu wurde die sequence characterized amplified region (SCAR)-PCR Methode (Paran & Michelmore, 1993) angewandt. Grundlage waren Art-spezifische Marker, die durch (nested) SAPD-PCR generiert wurden. Die Vorgehensweise ist in Abb. 5 dargestellt.

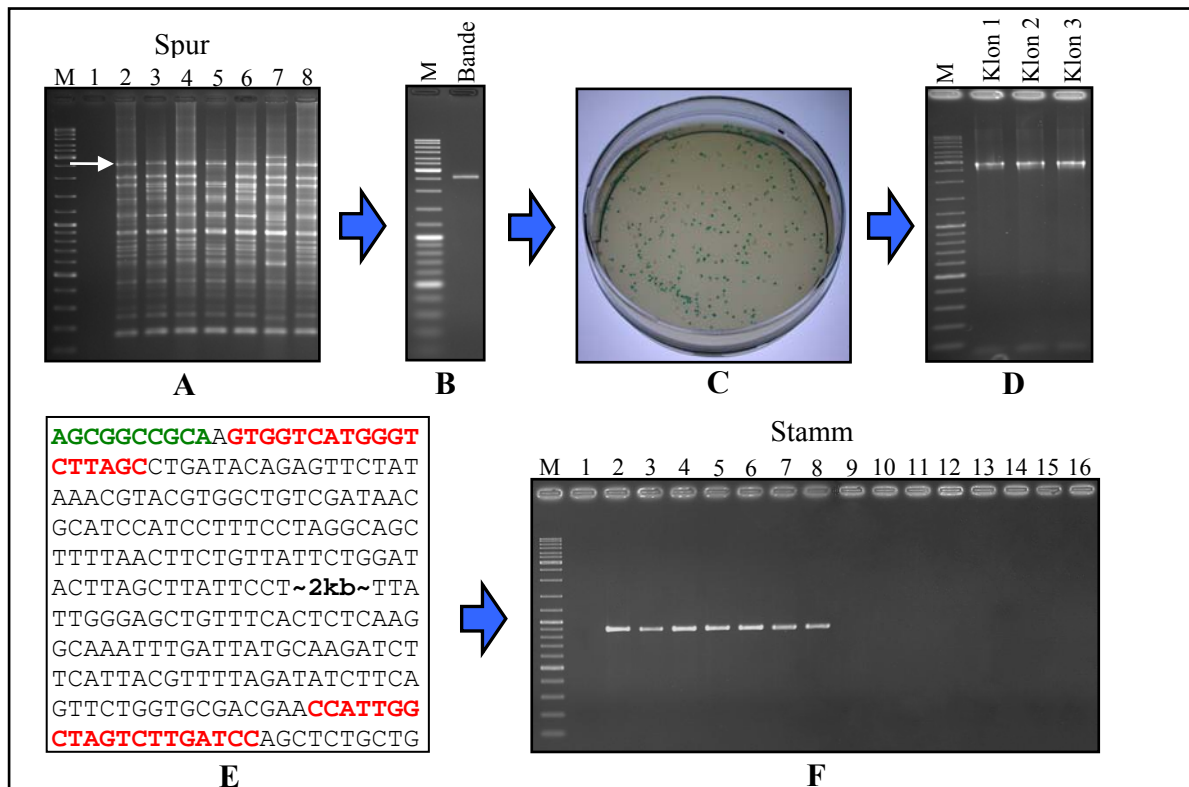


Abb. 5. Vorgehensweise bei der Generierung Art-spezifischer Marker für die SCAR-PCR. A: Die SAPD-PCR wurde zum Auffinden geeigneter Marker durchgeführt. Es wurde eine Gelbande ausgeschnitten, die bei allen Stämmen derselben Art vorhanden war. B: Die Gelbande wurde aufgereinigt und gelelektrophoretisch analysiert. C: Die Gelbande wurde in einen Vektor ligiert und in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Die Zellen wurden auf LB-Medium plattiert und inkubiert. Positive Klone wurden selektioniert. Die Plasmide positiver Klone wurden isoliert. D: Die Klonierungsreaktion wurde durch PCR überprüft. E: Plasmide, die das erwartete Insert enthielten wurden sequenziert. Die Sequenz wurde analysiert (Grün: Sequenz des Primers aus der SAPD-PCR). Primer wurden generiert, die komplementär zu Bereichen innerhalb der sequenzierten DNA-Region waren (rot). F: Die neu generierten Primer wurden zur Art-Identifizierung in einer PCR verwendet. Abkürzungen: M: Marker; 1: Negativkontrolle ohne DNA; Spur 2-8: Stämme einer Art (hier *L. mesenteroides*); 9-16: Negativkontrollen mit verwandten Milchsäurebakterien.

Für folgende Milchsäurebakterien wurden Art-spezifische SCAR-Primer entwickelt: *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, *P. inopinatus*, *L. hilgardii*, *P. acidilactici* und *L. mesenteroides*. Von jeder Art wurden mehrere Stämme untersucht, um Amplifikationsprodukte zu finden, die bei allen Stämmen innerhalb einer Art vorkamen.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Amplifikationsprodukte und Färben in einer Ethidiumbromid-Lösung wurde die DNA im Agarosegel unter UV-Licht visualisiert (siehe Kap. 2.18.3). Im Unterschied zur Agarose-Gelelektrophorese für die nested SAPD-PCR wurde kein Natronwasserglas zum Agarosegel zugegeben, da diese Substanz die Klonierungsreaktion einschränkte. Geeignete Art-spezifische Gelbanden wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt.

2.19.1 Aufreinigung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen

Die Aufreinigung der Art-spezifischen Gelbanden erfolgte mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Gelbanden wurden mit 20 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert.

2.19.2 Klonierung

Die Ligation und Transformation der gereinigten Amplifikate wurde mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt.

Das Kit beinhaltet den linearisierten Plasmidvektor pCR4-TOPO mit einer kovalent gebundenen Topoisomerase I. Der Vektor besitzt an den flankierenden Enden einen Basenüberhang aus Desoxythymidin. Da die Taq-Polymerase unabhängig vom Template Desoxyadenosin-Moleküle an das 3'-Ende des synthetisierten DNA-Strangs anhängt, sind die poly-Adenosin-Enden des PCR-Produkts komplementär zu den poly-Thymidin-Molekülen des Vektors. Die Topoisomerase I bindet an die DNA-Fragmente und ligiert die Basenpaare in den Vektor. Der Vektor wurde anschließend in chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E. coli* TOP10) Zellen transformiert. Zur Durchführung wurden 4 µl der frisch aufgereinigten Gelbande, 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl₂) und 1 µl TOPO Vektor gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden 2 µl des Reaktionsgemisches entnommen und mit unmittelbar vorher aufgetauten One Shot TOP 10 Zellen (Invitrogen) gemischt und für 30 min auf Eis inku-

biert. Die Transformation des Vektors erfolgte durch Hitzeschock der Zellen für 30 Sekunden bei 42 °C. Der Ansatz wurde mit 250 µl des im Invitrogen-Kit enthaltenen S.O.C Medium gemischt und eine Stunde unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Je Transformationsansatz wurden 150-250 µl auf LB Agar, welche mit Ampicillin und X-Gal versehen waren, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Positive Klone konnten anhand der weißen Koloniefarbe identifiziert werden (Klone mit Plasmid ohne Insert verfügen über das intakte LacZ-Gen und spalten das X-Gal, was zu blau gefärbten Kolonien führt).

2.19.3 Plasmid-Isolierung

Einzelne weiße Kolonien wurden von den Agarplatten entnommen und in flüssigem ampicillinhaltigen LB-Medium über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die Plasmid-Isolierung wurde mit dem QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zur Kontrolle, ob sich das gewünschte Insert im Plasmid befand wurde eine PCR mit den Primern M13-F und M13-R (Tab. 8) durchgeführt. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes und die Bedingungen zur Amplifikation wurden dem Handbuch des TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing (Invitrogen, Karlsruhe) entnommen.

2.19.4 Sequenzierung, Sequenzanalyse und Primer Design

Die Plasmide, die das gewünschte Insert enthielten, wurden sequenziert. Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1977) mit den Primern M13-F und M13-R (Tab. 8) und wurde in Auftragsarbeit von der Firma Eurofins-MWG (Martinsried) durchgeführt.

Neu identifizierte DNA-Sequenzen wurden mit verfügbaren homologen Sequenzen der NCBI / GenBank-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Benson et al., 2004) durch eine BLAST-Suche verglichen. Basierend auf den Sequenzen wurden Primer konstruiert, die komplementär zu Bereichen innerhalb der durch die „SAPD-Primer“ flankierten Sequenzen waren (Tab. 8).

2.19.5 PCR mit spezifischen SCAR-Markern

Die Amplifizierung zur Art-Identifizierung von Milchsäurebakterien wurde mit den neu generierten SCAR-Primern (Tab. 8) durchgeführt. Die Zusammensetzung eines PCR-

Ansatzes ist in Tab. 33 angegeben. Die PCR mit Art-spezifischen SCAR-Primern wurde unter Verwendung eines Touchdown-PCR Programms (Don et al., 1991) unter den in Tab. 34 angegebenen Bedingungen in einem Thermocycler durchgeführt.

Tab. 33. Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die SCAR-PCR

Komponente (Stammlösung)	Volumen (µl)	Bezogen auf 25 µl
Forward-Primer (10 µM)	0,5	0,2 µM
Reverse-Primer (10 µM)	0,5	0,2 µM
dNTP-Mix (40 mM)	0,5	800 µM
PCR-Puffer (10 x) (enthält 15 mM MgCl ₂)	2,5	1 x
Wasser	19	-
Taq-DNA-Polymerase (1 U / µl)	1	1 U
Template-DNA (20 ng / µl)	1	20 ng
Gesamtvolumen	25	

Tab. 34. Thermocycler Programm zur PCR mit SCAR-Primern

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	Initial-Denaturierung	95	5
2	Denaturierung	94	0,5
3	Annealing	69 (- 1 °C)	0,5
4	Elongation	72	0,5
5	6 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Denaturierung	94	0,5
7	Annealing	62	0,5
8	Elongation	72	0,5
9	22 Zyklen beginnend bei Nr. 6		
10	Finale Elongation	72	8

Zur Ermittlung der Spezifität der SCAR-Primer wurden jeweils mehrere Stämme der gleichen Art, sowie Stämme verwandter Milchsäurebakterien untersucht.

Verwendung der SCAR-Primer in einem Multiplex PCR Ansatz

Alle SCAR-Primer wurden so konstruiert, dass resultierende Art-spezifische PCR-Amplifikate sich um mindestens 60 bp unterschieden. Dadurch ließen sich alle zu erwartenden PCR-Amplifikate mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kap. 2.11.5) eindeutig voneinander trennen. Zur Multiplex PCR wurde das Qiagen[®] Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden) (Hanselle et al., 2003) verwendet. Es wurde ein 10-fach konzentrierter Primer Mix aus den sieben Primerpaaren SCAR-PPA-F/R, SCAR-PPE-F/R, SCAR-PDA-F/R, SCAR-PIN-F/R, SCAR-LBH-F/R, SCAR-PAC-F/R und SCAR-LEU-F/R (Tab. 8) hergestellt.

Dabei wurde jeder Primer in einer Konzentration von 2 μM zugegeben. Für die Multiplex PCR wurde der in Tab. 26 angegebene Reaktionsansatz, jedoch ohne Q-Solution, hergestellt. Die Amplifizierung erfolgte nach dem in Tab. 34 angegebenen Thermocycler-Programm mit dem Unterschied, dass die Dauer der Initial-Denaturierung auf 15 min verlängert wurde. Die erwarteten Längen der PCR-Amplifikate zur Identifizierung der Milchsäurebakterien-Arten waren: 331 bp für *P. parvulus*, 396 bp für *P. pentosaceus*, 470 bp für *P. damnosus*, 567 bp für *P. inopinatus*, 684 bp für *L. hilgardii*, 776 bp für *P. acidilactici* und 886 bp für *L. mesenteroides*.

Zunächst wurde die Multiplex PCR mit DNA verschiedener Stämme einer Art durchgeführt. Anschließend wurden DNA-Mischungen aller Arten mit der Methode untersucht.

3. Ergebnisse

3.1 Sequenzierung ribosomaler Gensequenzen

3.1.1 16S rDNA (Milchsäurebakterien)

Weinrelevante Milchsäurebakterien der institutseigenen Kulturensammlung wurden durch 16S rDNA-Sequenzvergleich untersucht. Vorversuche zur Identifizierung durch SAPD-PCR führten bei manchen Stämmen zu einem für die jeweilige Art untypischen bzw. unbekanntem DNA Fingerprint-Bandenmuster (Daten hier nicht gezeigt). Zur Klärung der Art-Zugehörigkeit wurden die 16S rRNA-Gene betreffender Bakterien mit den Primern PurEubak5 und PurEubak3 (Tab. 2) amplifiziert. Die Sequenzierung der ca. 1,6 kb großen PCR-Amplifikate erfolgte mit Primer PurEubak5. Die zwischen ca. 700 und 950 bp großen Teilssequenzen der small subunit (SSU) rDNA (Anhang 8.1.1) wurden mit hinterlegten Sequenzen der NCBI-Datenbank (GenBank) verglichen. Die SSU rDNA-Sequenzierung zeigte, dass die Bakterien unter falschen Artnamen hinterlegt waren bzw. seit der Hinterlegung neu beschrieben wurden (Tab. 35).

Tab. 35. Art-Identifizierung von Milchsäurebakterien durch SSU rDNA-Sequenzvergleich

Stamm	Hinterlegt als	16S rDNA-Identifizierung	bp (%)
B7	<i>Pediococcus</i> sp.	<i>Pediococcus damnosus</i>	878/878 (100)
B9	<i>Pediococcus</i> sp.	<i>Pediococcus damnosus</i>	953/953 (100)
B13	<i>Pediococcus damnosus</i>	<i>Pediococcus parvulus</i>	712/712 (100)
B17	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	861/861 (100)
B30	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	786/786 (100)
B31	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>	825/825 (100)
B116	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	783/783 (100)
B123	<i>Pediococcus damnosus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	878/878 (100)
B140	<i>Pediococcus damnosus</i>	<i>Pediococcus parvulus</i>	914/914 (100)
B168	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	874/875 (99)
B178	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	881/881 (100)
B179	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus suntoryeus</i>	733/733 (100)
B190	<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	917/917 (100)
B191	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus frumenti</i>	870/871 (99)
B201	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	865/865 (100)
B427	Coccus, nicht bestimmt	<i>Pediococcus parvulus</i>	869/869 (100)
B428	Coccus, nicht bestimmt	<i>Pediococcus parvulus</i>	848/848 (100)

Des Weiteren wurden Milchsäurebakterien aus Starterkulturen (Tab. 15) durch den Vergleich ihrer 16S rRNA-Gensequenzen (Anhang 8.1.1) mit hinterlegten Sequenzen der NCBI-Datenbank (GenBank) identifiziert. Der 16S rDNA-Sequenzvergleich ergab eine 100 %-ige Übereinstimmung (860/860 bp) der Isolate B702, B704, Isolat 5.1, Isolat 5.4 und Isolat 5.6 mit *Pediococcus acidilactici*. Die Isolate Pr. „groß“; 3857-1; 3858-2; Isolat 5.2, Isolat 5.3, Isolat 6.1 und Isolat 6.2 konnten zu 100 % (894/894 bp) dem Bakterium *Enterococcus faecium* zugeordnet werden. Die Sequenz des Isolates B703 stimmte zu 100 % (759/759 bp) mit hinterlegten 16S rDNA-Sequenzen von *Pediococcus pentosaceus* überein.

3.1.2 ITS-Region (Hefen)

Die ITS1-5,8S rDNA-ITS2-Region der Hefe-Stämme KOH1, KOH2, KOH3, KOH4, 1543, 1615 und 1635 aus Starterkulturen (Tab. 18) wurde mit den Primern ITS1 (F) und ITS4 (R) (Tab. 3) (White et al., 1990) amplifiziert. Die Sequenzierung des ca. 850 bp Amplifikats (Stamm KOH1, KOH2, KOH3, KOH4) bzw. ca. 600 bp Amplifikats (Stamm 1543, 1615, 1635) erfolgte mit dem Primer ITS1 (F). Es konnte jeweils nahezu der vollständige Bereich sequenziert werden (Anhang 8.1.2). Durch den Vergleich der Teilsequenzen mit hinterlegten Sequenzen der NCBI-Datenbank (GenBank) konnten die Hefestämme KOH1, KOH2, KOH3 und KOH4 zu 100 % (761/761 bp) der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zugeordnet werden. Der Vergleich des sequenzierten Bereichs der Stämme 1543, 1615 und 1635 ergab eine 100 %-Übereinstimmung (562/562 bp) mit entsprechenden Sequenzen der Hefe *Pichia anomala*.

3.1.3 23S rDNA (*Pediococcus*)

Neben einem Kompletengenom der Spezies *P. pentosaceus* (ATCC 25745) standen für die übrigen Arten der Gattung *Pediococcus* nur kurze Teilsequenzen der 23S rDNA in der NCBI-Datenbank zur Verfügung. Durch ein Alignment der hinterlegten Teilstücke mit den 23S rDNA-Sequenzen verwandter Milchsäurebakterien wurden Primer generiert, die komplementär zu einem konservierten Bereich am 5'-Ende der 23S rDNA bzw. am 3'-Ende der 5S rDNA waren (Tab. 2). Die 23S rDNAs aller *Pediococcus*-Typstämme wurden in der vorliegenden Arbeit vollständig sequenziert. Ziel war das Auffinden variabler Sequenz-Bereiche zum Generieren von PCR-Primern und FISH-Sonden für eine sichere Art-Identifizierung.

Mit den large subunit (LSU) rDNA-Sequenzen der neun *Pediococcus*-Arten und verwandten Milchsäurebakterien wurde ein Alignment in ClustalX 1.83 (Thompson et al., 1997)

angefertigt (Kap. 8.2). Basierend auf dem LSU rDNA-Alignment wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt (siehe Kap. 3.2). Darüber hinaus wurden die LSU rDNA-Sequenzen zur Erstellung von rRNA-Sekundärstrukturen verwendet (siehe Kap. 3.4). Die Nukleotidsequenzen der 23S rDNAs der *Pediococcus*-Arten wurden bei GenBank in der NCBI-Datenbank hinterlegt (Tab. 36).

Tab. 36. NCBI / GenBank-Zugriffsnummern der LSU rDNA-Sequenzen

Art	Stamm ^a	Herkunft ^a	Zugriffsnummer
<i>P. damnosus</i>	DSM 20331 ^T	DSMZ	EF116574
<i>P. parvulus</i>	DSM 20332 ^T	DSMZ	EF116573
<i>P. inopinatus</i>	DSM 20285 ^T	DSMZ	EF116576
<i>P. pentosaceus</i>	DSM 20336 ^T	DSMZ	EF116577
<i>P. acidilactici</i>	DSM 20284 ^T	DSMZ	EF116575
<i>P. claussenii</i>	DSM 14800 ^T	DSMZ	EF116578
<i>P. cellicola</i>	DSM 17757 ^T	DSMZ	EF397603
<i>P. stilesii</i>	DSM 18001 ^T	DSMZ	EF397604
<i>P. dextrinicus</i>	DSM 20335 ^T	DSMZ	EF116579

^a DSM(Z): Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig.

^T Typstamm.

3.2 Phylogenetische Analyse der Gattung *Pediococcus*

Die phylogenetische Analyse des LSU rDNA ClustalX-Alignments (Anhang 8.2) wurde mit Hilfe des PHYLIP Programm-Pakets 3.65 (Felsenstein, 1998) durchgeführt. Der mit der Maximum Likelihood-Methode berechnete Konsensus-Baum wurde aus 100 Bäumen unter Verwendung von 2644 Alignment-Positionen erstellt. Der Stammbaum konnte graphisch mit der Software Tree View 1.6.6 (Page, 1996) dargestellt werden (Abb. 6). Zur statistischen Absicherung des Baumes wurden Bootstrap-Analysen nach der Maximum Likelihood-Methode berechnet. Ähnliche Stammbäume wurden mit den Modellen Maximum Parsimony und Neighbor-Joining erstellt (Daten hier nicht gezeigt).

Der Stammbaum verdeutlichte, dass die Arten *P. damnosus* und *P. inopinatus* am nächsten verwandt waren. Sie bildeten zusammen mit den Arten *P. parvulus* und *P. cellicola* einen gemeinsamen Cluster. Die drei Arten *P. pentosaceus*, *P. stilesii* und *P. acidilactici* bildeten einen zweiten Cluster, während die Art *P. claussenii* phylogenetisch zwischen den beiden Clustern stand. *P. dextrinicus* war phylogenetisch am weitesten von allen anderen Arten der Gattung *Pediococcus* entfernt. Diese Art wurde wegen der Nähe zur Gattung *Lactobacillus*

als atypische Art bezeichnet (Back, 1978 a). Es wurde bereits vorgeschlagen diese Art neu zu beschreiben und sie der Gattung *Lactobacillus* zuzuordnen (Collins et al., 1991, Stiles & Holzapfel, 1997).

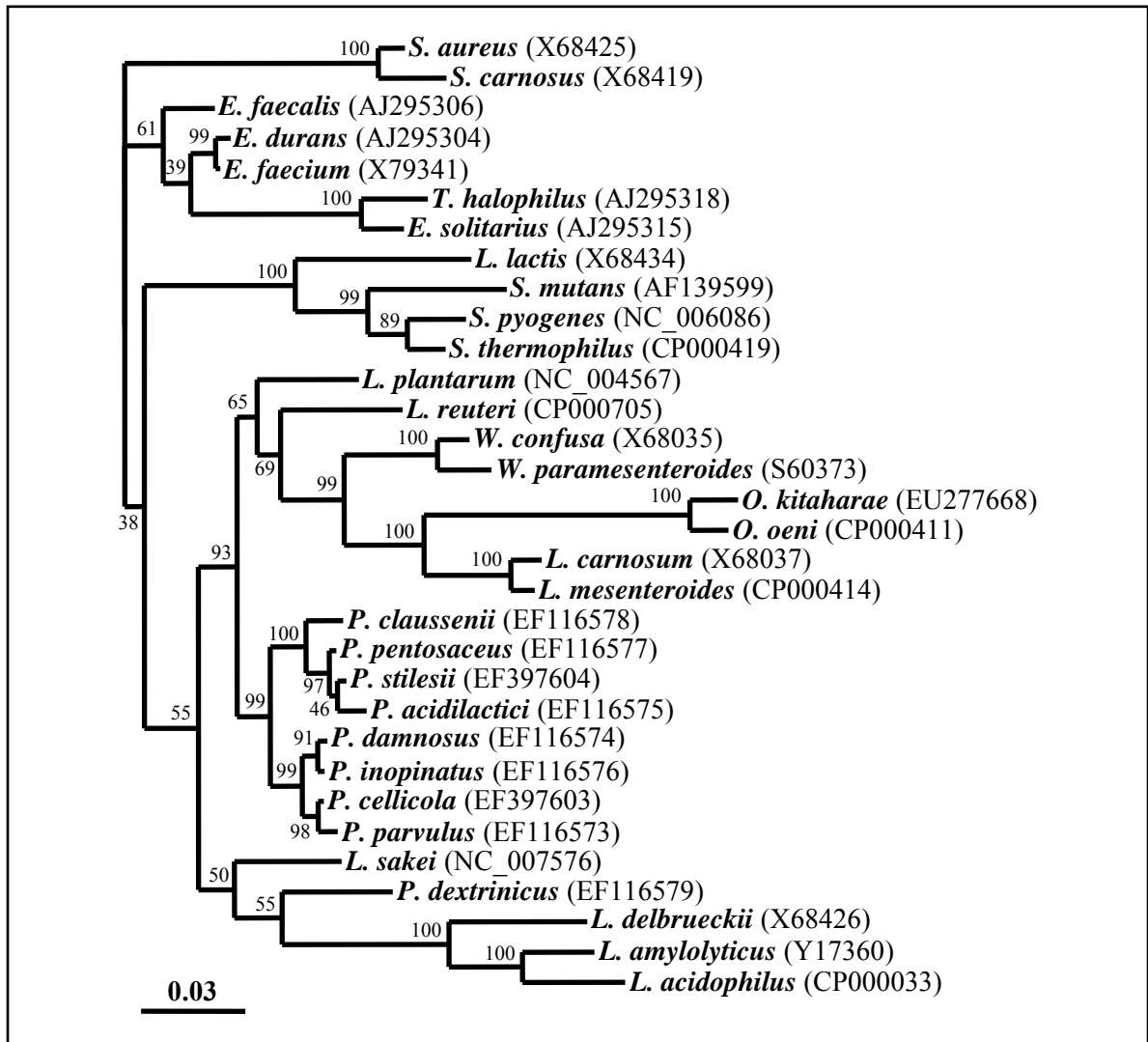


Abb. 6. Phylogenetischer Stammbaum auf Basis der LSU rDNA-Sequenzen der *Pediococcus*-Arten, sowie verwandter Milchsäurebakterien. Die Arten *Staphylococcus aureus* und *S. carnosus* wurden als Außengruppe verwendet. Der Konsensus-Baum wurde aus 100 Maximum Likelihood-Bäumen unter Einbeziehung von 2644 Alignment-Positionen berechnet. Die Bootstrap-Werte sind an den Verzweigungen des Stammbaumes angegeben. Der Maßstab entspricht einer phylogenetischen Distanz von 3 %.

3.3 Identifizierung der Pediokokken durch spezifische PCR-Primer

Die Analyse des 23S rDNA-Sequenzalignments der Milchsäurebakterien (Anhang 8.2) zeigte, dass zwischen eng verwandten Pediokokken in manchen Bereichen der 23S rDNA nur wenige Art-spezifische Nukleotide existieren. Auf Basis dieser Sequenzunterschiede wurden PCR-Primer zur Identifizierung aller *Pediococcus*-Arten entwickelt (Pfannebecker & Fröhlich, 2008).

3.3.1 Gattungs-Identifizierung

Zunächst wurde ein Primerpaar (Pedio23S_F und Pedio23S_R) zur Identifizierung der typischen *Pediococcus*-Arten und ein Primerpaar (PDE23S_F und PDE23S_R) zur Identifizierung der atypischen Art *P. dextrinicus* entwickelt (Tab. 4). Die Identifizierung typischer *Pediococcus*-Arten bzw. von *P. dextrinicus* erfolgte anhand des Auftretens eines 701 bp (Abb. 7) bzw. 514 bp (Abb. 8) großen PCR-Amplifikats. Negativkontrollen wurden mit Template-DNA von Stämmen verwandter Milchsäurebakterien durchgeführt, um zu gewährleisten, dass die Primer ausschließlich spezifisch für die Arten der Gattung *Pediococcus* waren. Die Ergebnisse der Identifizierung sind zusammengefasst in Tab. 37 dargestellt.

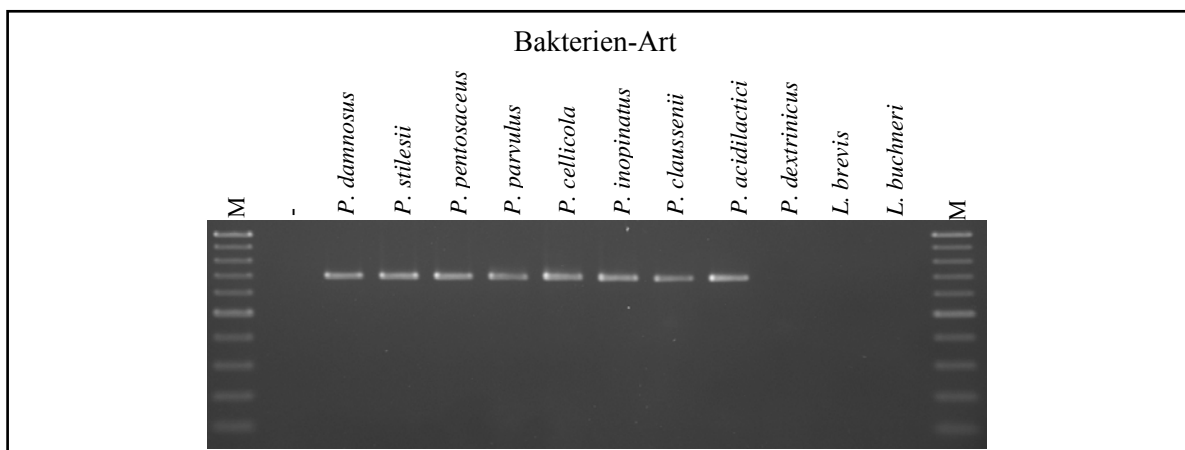


Abb. 7. PCR-Amplifikate eines Bereichs der 23S rDNA zur Identifizierung der typischen Pediokokken. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der Primer Pedio23S_F und Pedio23S_R (Tab. 4). Es wurden die Typstämme der verschiedenen *Pediococcus*-Arten und die beiden verwandten Milchsäurebakterien *L. brevis* (B260) und *L. buchneri* (B31) untersucht. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas) von 100 bis 1000 bp; -: Negativkontrolle ohne DNA.

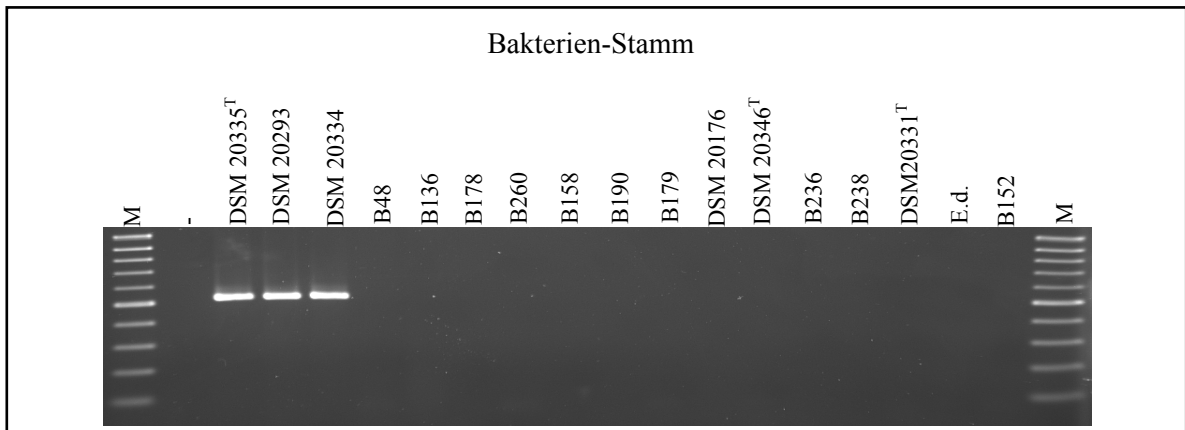


Abb. 8. PCR-Amplifikate eines Bereichs der 23S rDNA zur Identifizierung von *P. dextrinicus*. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der Primer PDE23S_F und PDE23S_R (Tab. 4). M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas) von 100 to 1000 bp; -: Negativkontrolle ohne DNA; Stamm DSM 20335^T, DSM 20293 und DSM 20334: *P. dextrinicus*; B48, B136, B178: *L. casei*; B260: *L. brevis*; B158: *L. plantarum*; B31: *L. buchneri*; B179: *L. acidophilus*; DSM 20176^T: *L. hilgardii*; DSM 20346^T: *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*; B236: *O. oeni*; B238: *L. lactis*; DSM 20331^T: *P. damnosus*, E.d.: *E. durans*; B152: *E. faecalis*.

3.3.2 Art-Identifizierung durch Multiplex PCR

Zur Identifizierung der acht typischen *Pediococcus*-Arten wurden Primer generiert, die in einem Multiplex PCR Ansatz verwendet werden konnten (Tab. 4). Die Multiplex PCR wurde mit DNA der Typstämme und mit Mischungen der DNA aller typischen *Pediococcus*-Arten durchgeführt. Für jede Art konnte das zu erwartende, spezifische PCR-Amplifikat nach gelelektrophoretischer Trennung beobachtet werden (Abb. 9).

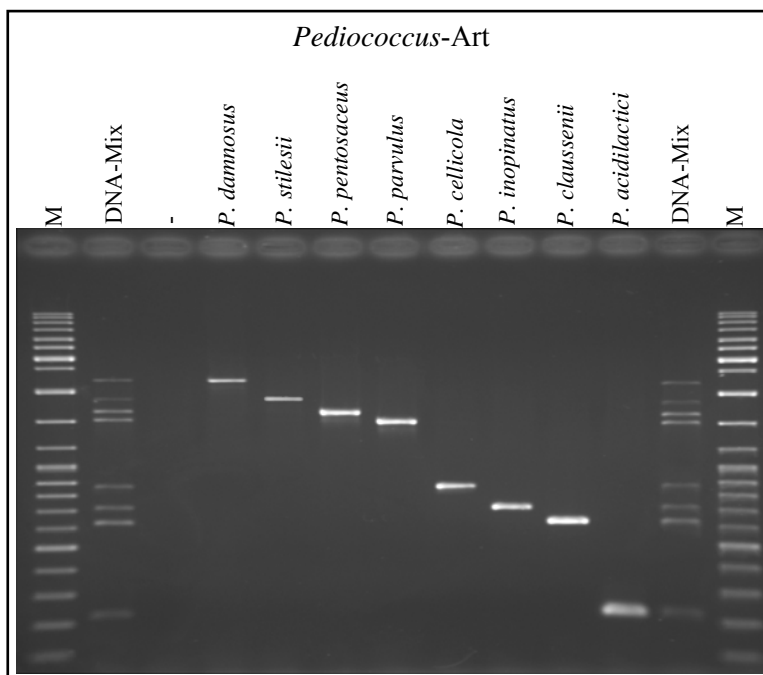


Abb. 9. Multiplex PCR mit den typischen *Pediococcus*-Arten nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Die spezifischen PCR-Produkte zur Identifizierung waren 2244 bp für *P. damnosus*, 1840 bp für *P. stilesii*, 1647 bp für *P. pentosaceus*, 1517 bp für *P. parvulus*, 866 bp für *P. cellicola*, 711 bp für *P. inopinatus*, 620 bp für *P. clausenii* und 213 bp für *P. acidilactici*. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA; DNA-Mix: Mischung der DNA aller acht untersuchten *Pediococcus*-Arten.

Der zur Multiplex PCR verwendete universelle Reverse-Primer P23S_R (Tab. 4) war nicht nur spezifisch für Arten der Gattung *Pediococcus*. Eine BLAST-Suche in der NCBI-Datenbank zeigte, dass die Sequenz des Primers auch mit Sequenzen verwandter Milchsäurebakterien übereinstimmte. Daher wurde die Spezifität aller Primer durch die Erstellung weiterer PCR-Ansätze mit Template-DNA verwandter Bakterien untersucht, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen. Es wurden verschiedene Arten der Gattungen *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* und *Oenococcus* überprüft (Tab. 37).

Tab. 37. Spezifität der Primer zur 23S rDNA-basierenden PCR-Identifizierung

Stamm ^a	Multiplex PCR Primer ^{b,c}	Pedio23S_F / Pedio23S_R ^c	PDE23S_F / PDE23S_R ^c
<i>P. damnosus</i> DSM 20331 ^T	+	+	-
<i>P. acidilactici</i> DSM 20284 ^T	+	+	-
<i>P. pentosaceus</i> DSM 20336 ^T	+	+	-
<i>P. claussenii</i> DSM 14800 ^T	+	+	-
<i>P. parvulus</i> DSM 20332 ^T	+	+	-
<i>P. inopinatus</i> DSM 20285 ^T	+	+	-
<i>P. inopinatus</i> DSM 20287	+	+	-
<i>P. cellicola</i> DSM 17757 ^T	+	+	-
<i>P. stilesii</i> DSM 18001 ^T	+	+	-
<i>P. dextrinicus</i> DSM 20335 ^T	-	-	+
<i>P. dextrinicus</i> DSM 20293	-	-	+
<i>P. dextrinicus</i> DSM 20334	-	-	+
<i>Lactobacillus brevis</i> B260	-	-	-
<i>Lactobacillus buchneri</i> B31	-	-	-
<i>Lactobacillus parabuchneri</i> B190	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i> B48	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i> B136	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i> B178	-	-	-
<i>Lactobacillus frumenti</i> B191	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20205	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> B158	-	-	-
<i>Lactobacillus hilgardii</i> DSM 20176 ^T	-	-	-
<i>Lactobacillus hilgardii</i> B271	-	-	-
<i>Enterococcus durans</i> E.d.	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> B152	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> B210	-	-	-

^a DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig.

^b Bei der Multiplex PCR wurde jeweils nur das zu erwartende, Art-spezifische Amplifikat beobachtet.

^c PCR mit den angegebenen Primern: + Amplifikationsprodukt, - kein Amplifikationsprodukt.

^T Typstamm.

Tab. 37. Spezifität der Primer zur 23S rDNA-basierenden PCR-Identifizierung (Fortsetzung)

Stamm ^a	Multiplex PCR Primer ^{b,c}	Pedio23S_F / Pedio23S_R ^c	PDE23S_F / PDE23S_R ^c
<i>Enterococcus</i> sp. E. sp. J.F.	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> B238	-	-	-
<i>Streptococcus mutans</i> B71	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> DSM 20346 ^T	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> DSM 20343 ^T	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> DSM 20484 ^T	-	-	-
<i>Oenococcus oeni</i> B236	-	-	-
<i>Oenococcus oeni</i> B325	-	-	-

^a DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig.

^b Bei der Multiplex PCR wurde jeweils nur das zu erwartende, Art-spezifische Amplifikat beobachtet.

^c PCR mit den angegebenen Primern: + Amplifikationsprodukt, - kein Amplifikationsprodukt.

^T Typstamm.

Mit der entwickelten Multiplex PCR wurden insgesamt 50 Reinkulturen verschiedener *Pediococcus*-Arten aus unterschiedlichen Kulturensammlungen untersucht. Davon konnte bei 13 Stämmen, von denen nur die Gattung (*Pediococcus* sp.) bekannt war, die Art-Zugehörigkeit ermittelt werden. Bei 30 Stämmen konnte die angegebene Art-Zugehörigkeit bestätigt werden. Bei sieben Stämmen aus der institutseigenen Kulturensammlung wurde eine andere als die angegebene Art-Zugehörigkeit ermittelt (Tab. 38). Die meisten der institutseigenen Stämme wurden vor über 30 Jahren durch biochemische Tests identifiziert und hinterlegt.

Tab. 38. Multiplex PCR-Identifizierung von Pediokokken aus Kulturensammlungen

Stamm hinterlegt als	Multiplex PCR-Identifizierung	Stamm hinterlegt als	Multiplex PCR-Identifizierung
<i>P. damnosus</i> Hock B2.1 ^a	<i>P. damnosus</i>	<i>P. damnosus</i> B42 ^a	<i>P. parvulus</i>
<i>P. damnosus</i> Hock B2.2 ^a	<i>P. damnosus</i>	<i>P. pentosaceus</i> B44 ^a	<i>P. parvulus</i>
<i>Pediococcus</i> sp. B7 ^a	<i>P. damnosus</i>	<i>P. damnosus</i> B47 ^a	<i>P. damnosus</i>
<i>Pediococcus</i> sp. B8 ^a	<i>P. damnosus</i>	<i>P. damnosus</i> B55 ^a	<i>P. damnosus</i>
<i>Pediococcus</i> sp. B9 ^a	<i>P. damnosus</i>	<i>P. damnosus</i> B68 ^a	<i>P. damnosus</i>
<i>P. damnosus</i> B12 ^a	<i>P. damnosus</i>	<i>P. damnosus</i> B69 ^a	<i>P. damnosus</i>
<i>P. damnosus</i> B13 ^a	<i>P. parvulus</i>	<i>P. damnosus</i> B78 ^a	<i>P. damnosus</i>
<i>P. damnosus</i> B14 ^a	<i>P. damnosus</i>	<i>P. damnosus</i> B89 ^a	<i>P. damnosus</i>
<i>P. damnosus</i> B15 ^a	<i>P. damnosus</i>	<i>P. damnosus</i> B91 ^a	<i>P. damnosus</i>
<i>P. damnosus</i> B16 ^a	<i>P. damnosus</i>	<i>P. damnosus</i> B93 ^a	<i>P. damnosus</i>

^a Stamm des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz.

Tab. 38. Multiplex PCR-Identifizierung von *Pediococcus* aus Kulturensammlungen (Fortsetzung)

Stamm hinterlegt als	Multiplex PCR-Identifizierung	Stamm hinterlegt als	Multiplex PCR-Identifizierung
<i>Pediococcus</i> sp. B97 ^a	<i>P. damnosus</i>	<i>P. parvulus</i> B400 ^a	<i>P. parvulus</i>
<i>P. damnosus</i> B98 ^a	<i>P. damnosus</i>	<i>P. parvulus</i> B401 ^a	<i>P. parvulus</i>
<i>P. damnosus</i> B99 ^a	<i>P. damnosus</i>	<i>P. parvulus</i> B404 ^a	<i>P. parvulus</i>
<i>P. damnosus</i> B123 ^a	<i>P. pentosaceus</i>	<i>P. parvulus</i> B405 ^a	<i>P. parvulus</i>
<i>Pediococcus</i> sp. B125 ^a	<i>P. pentosaceus</i>	<i>Pediococcus</i> sp. B427 ^a	<i>P. parvulus</i>
<i>P. damnosus</i> B140 ^a	<i>P. parvulus</i>	<i>Pediococcus</i> sp. B428 ^a	<i>P. parvulus</i>
<i>P. damnosus</i> B141 ^a	<i>P. parvulus</i>	<i>P. acidilactici</i> B473 ^b	<i>P. acidilactici</i>
<i>P. inopinatus</i> B254 ^a	<i>P. pentosaceus</i>	<i>P. pentosaceus</i> B474 ^b	<i>P. pentosaceus</i>
<i>P. parvulus</i> B266 ^a	<i>P. parvulus</i>	<i>P. pentosaceus</i> B475 ^b	<i>P. pentosaceus</i>
<i>P. parvulus</i> B267 ^a	<i>P. parvulus</i>	<i>Pediococcus</i> sp. BPc 149 ^c	<i>P. parvulus</i>
<i>P. parvulus</i> B391 ^a	<i>P. parvulus</i>	<i>Pediococcus</i> sp. BPc 152 ^c	<i>P. parvulus</i>
<i>P. parvulus</i> B395 ^a	<i>P. parvulus</i>	<i>Pediococcus</i> sp. BPc 158 ^c	<i>P. parvulus</i>
<i>P. parvulus</i> B397 ^a	<i>P. parvulus</i>	<i>Pediococcus</i> sp. BPc 184 ^c	<i>P. parvulus</i>
<i>P. parvulus</i> B398 ^a	<i>P. parvulus</i>	<i>Pediococcus</i> sp. BPc 260 ^c	<i>P. damnosus</i>
<i>P. parvulus</i> B399 ^a	<i>P. parvulus</i>	<i>Pediococcus</i> DSM 1056 ^d	<i>P. acidilactici</i>

^a Stamm des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz.

^b Stamm der Firma Lallemand, Toulouse, Frankreich.

^c Stamm der Fachhochschule École d'ingénieurs de Changins, Nyon, Schweiz.

^d Stamm der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig.

Die Untersuchung der *Pediococcus*-Stämme aus dem Weinanbaugebiet Rheinhessen (Region Wonnegau, Nierstein und Bingen) resultierte in der Isolierung und Identifizierung von 47 Stämmen aus 100 Weinproben (Tab. 39). Bei 71 % der 42 untersuchten Weingüter konnte mindestens ein *Pediococcus*-Stamm isoliert und durch Multiplex PCR identifiziert werden. Bei den 47 Isolatens aus rheinhessischen Wein- und Mostproben handelte es sich ausschließlich um Stämme der beiden Arten *P. damnosus* und *P. parvulus*. Davon gehörten 43 Stämme der Art *P. parvulus* an und vier Stämme konnten der Art *P. damnosus* zugeordnet werden. Aus einem Wein (Probe 218) konnten sogar beide Spezies, *P. parvulus* (B456) und *P. damnosus* (B479) isoliert und identifiziert werden (Pfannebecker & Fröhlich, 2008). In neun Weinproben wurde eine Coinfektion des Bakteriums *P. parvulus* mit der Weinhefe *Dekkera* / *Brettanomyces bruxellensis* festgestellt (Tab. 39). Insgesamt bildeten 25 % der durch Multiplex PCR identifizierten *Pediococcus*-Stämme ein Exopolysaccharid beim Wachstum auf MRS-Agar (Tab. 39). Die Exopolysaccharid-Bildung konnte vor allem beobachtet werden, wenn die Stämme bei niedrigen Temperaturen (20 °C) kultiviert wurden oder vor dem Überimpfen im Kühlschrank (4 °C) aufbewahrt wurden.

Tab. 39. Multiplex PCR-Identifizierung der neu isolierten *Pediococcus*-Stämme

Stamm (Weinprobe)	Multiplex PCR-Identifizierung	Stamm (Weinprobe)	Multiplex PCR-Identifizierung
B440 (9) ^b	<i>P. parvulus</i>	B479 (218 B) ^a	<i>P. damnosus</i>
B441 (30) ^b	<i>P. parvulus</i>	B480 (254)	<i>P. parvulus</i>
B442 (34) ^b	<i>P. parvulus</i>	B481 (255)	<i>P. parvulus</i>
B443 (35) ^{b, c}	<i>P. parvulus</i>	B482 (260) ^b	<i>P. parvulus</i>
B444 (115) ^b	<i>P. parvulus</i>	B483 (261)	<i>P. parvulus</i>
B445 (128) ^{b, c}	<i>P. parvulus</i>	B484 (262) ^c	<i>P. parvulus</i>
B446 (152)	<i>P. parvulus</i>	B485 (263)	<i>P. parvulus</i>
B447 (153) ^b	<i>P. parvulus</i>	B486 (264)	<i>P. parvulus</i>
B448 (21)	<i>P. parvulus</i>	B487 (269)	<i>P. parvulus</i>
B449 (36 A)	<i>P. parvulus</i>	B488 (270)	<i>P. parvulus</i>
B450 (36 B)	<i>P. parvulus</i>	B489 (276)	<i>P. parvulus</i>
B451 (1)	<i>P. damnosus</i>	B490 (284)	<i>P. parvulus</i>
B452 (2)	<i>P. damnosus</i>	B491 (285) ^c	<i>P. parvulus</i>
B453 (22)	<i>P. parvulus</i>	B492 (286) ^c	<i>P. parvulus</i>
B454 (49)	<i>P. parvulus</i>	B493 (287) ^c	<i>P. parvulus</i>
B455 (52) ^c	<i>P. damnosus</i>	B494 (288)	<i>P. parvulus</i>
B456 (218 A) ^a	<i>P. parvulus</i>	B495 (289)	<i>P. parvulus</i>
B457 (140) ^c	<i>P. parvulus</i>	B496 (291)	<i>P. parvulus</i>
B458 (141) ^c	<i>P. parvulus</i>	B497 (292) ^c	<i>P. parvulus</i>
B459 (143)	<i>P. parvulus</i>	B498 (293) ^c	<i>P. parvulus</i>
B460 (139) ^c	<i>P. parvulus</i>	B499 (297)	<i>P. parvulus</i>
B476 (207)	<i>P. parvulus</i>	B700 (298)	<i>P. parvulus</i>
B477 (210)	<i>P. parvulus</i>	B701 (299) ^b	<i>P. parvulus</i>
B478 (217)	<i>P. parvulus</i>		

^a In dieser Weinprobe wurden die beiden Spezies *P. parvulus* und *P. damnosus* identifiziert.

^b Aus diesen Weinproben wurden *P. parvulus*- und *B. bruxellensis*-Stämme isoliert.

^c Exopolysaccharid-Bildung auf MRS-Agar.

Die Multiplex PCR-Untersuchung der Milchsäurebakterien aus Starterkulturen führte zur Identifizierung mehrerer Stämme der Arten *P. acidilactici* und *P. pentosaceus* (Tab. 40). Ergebnisse der Multiplex PCR-Identifizierung dieser Stämme konnten durch den Vergleich der 16S rDNA-Teilsequenzen mit entsprechenden Sequenzen der NCBI-Datenbank (GenBank) bestätigt werden (siehe Kap. 3.1.1). Außerdem wurden die Multiplex PCR Ergebnisse zur Art-Identifizierung durch Vergleich der DNA Fingerprint-Bandenmuster mit bekannten Milchsäurebakterien in der SAPD-PCR verifiziert (siehe Kap. 3.8.4 und Anhang 8.4, Abb. F).

Tab. 40. Multiplex PCR-Identifizierung der Pediokokken aus Starterkulturen

Stamm ^a	Multiplex PCR-Identifizierung
B702	<i>Pediococcus acidilactici</i>
B704	<i>Pediococcus acidilactici</i>
B722	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Isolat 5.4	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Isolat 5.6	<i>Pediococcus acidilactici</i>
B703	<i>Pediococcus pentosaceus</i>

^a Die mit „B“ gekennzeichneten Stämme wurden in die institutseigene Kultursammlung übernommen.

Ermittlung der Multiplex PCR Nachweisgrenze

Um die Multiplex PCR Nachweisgrenze zu ermitteln, wurden Weinproben mit Zellen der beiden Arten *P. parvulus* (DSM 20332^T) und *P. damnosus* (DSM 20331^T) künstlich beimpft und eine dekadische Verdünnungsreihe erstellt. Anschließend wurde die DNA aus den Zellen einzelner Verdünnungsstufen isoliert. Es wurde zunächst das Standard-Protokoll für Gram-positive Bakterien des DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Mit der isolierten DNA der Verdünnungsstufen wurde schließlich eine Multiplex PCR durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass einige Ansätze negativ waren. Offenbar war die Reinheit der DNA nicht ausreichend genug, so dass Verbindungen aus dem Wein die PCR inhibierten. Deshalb wurde die DNA mit dem zweifachen Volumen Ethanol gefällt und über eine zweite Säule aus dem Kit aufgereinigt (siehe Kap. 2.10.1). Die zweite Aufreinigung wirkte sich positiv auf die Reinheit der DNA aus, da die Verwendung derselben DNA in einer Multiplex PCR jetzt zu einem Amplifikat führte (Abb. 10). Um die Produktausbeute zu erhöhen, wurde die Anzahl der PCR-Zyklen auf 35 erhöht. Die Versuche zur Ermittlung der Nachweisgrenze zeigten, dass *P. parvulus* und *P. damnosus* noch in einer Verdünnung von 10 Zellen / ml in Wein nachgewiesen werden können (Abb. 10).

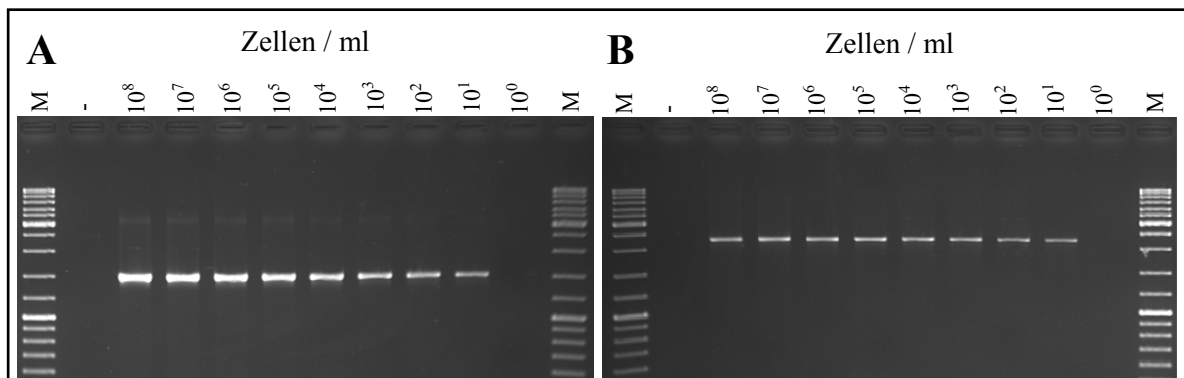


Abb. 10. Nachweis verschiedener Zellzahlen der Art *P. parvulus* (DSM 20332^T) (Abbildung A) und *P. damnosus* (DSM 20331^T) (Abbildung B) in Wein durch Multiplex PCR. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA.

3.4 Erstellung der 23S rRNA-Sekundärstrukturen

Die 23S rDNA-Sequenz des Bakteriums *P. damnosus* (DSM 20331^T) wurde mit der Software Structure Star auf die 23S rRNA-Sekundärstruktur von *Lactococcus lactis* (X68434) (Gutell et al., 1993) übertragen. Nach Übertragen der Sequenz wurde deutlich, dass neben veränderten Nukleotiden (Transitionen und Transversionen) auch Nukleotid-Insertionen und -Deletionen im Vergleich zur Sequenz der Spezies *L. lactis* bestanden. Dies führte zu Positionsänderungen von Nukleotiden innerhalb einzelsträngiger Loops bzw. Deletionen oder Insertionen in doppelsträngigen Sequenzbereichen. Zur Erstellung der 23S rRNA-Sekundärstruktur für *P. damnosus* mussten diese Bereiche neu berechnet werden. Die Berechnung geschah über die Interaktion Structure Stars mit dem Faltungsprogramm Mfold (Zuker, 1999). Nach dem Falten der betreffenden Bereiche konnten diese durch Verschieben und Drehen in die Sekundärstruktur integriert werden. Einzelne Nukleotid-Insertionen und -Deletionen wurden durch manuelles Verschieben der Nukleotide angepasst. Anschließend wurden die Bindungszeichen ausgetauscht, die infolge der veränderten Primärsequenz nicht mehr korrekt waren.

Da Sequenz-Unterschiede der Spezies *P. damnosus* zu den übrigen *Pediococcus*-Arten mit Ausnahme zur Art *P. dextrinicus* nur gering waren, konnten Sekundärstrukturen für die anderen Arten auf Basis der Struktur von *P. damnosus* relativ schnell generiert werden. Es mussten nur wenige Bereiche der rRNA-Sekundärstrukturen angepasst werden. Die neu generierten Sekundärstrukturen der neun *Pediococcus*-Arten sind im Anhang (Kap. 8.3) abgebildet. Die rRNA-Sekundärstrukturen erleichterten das Auffinden variabler Bereiche als Ziel für eine Identifizierung mit FISH-Sonden.

3.5 Identifizierung der *Pediococcus*-Arten durch FISH

Die Unterschiede zwischen den Sequenzen der 23S rDNA der verschiedenen *Pediococcus*-Arten waren zur Konstruktion Art-spezifischer FISH-Sonden zu gering. Es konnten aber die beiden Sonden Pedio23S5 und Pedio23S6 (Tab. 9) zur Identifizierung zweier Gruppen generiert werden. Die Sonde Pedio23S5 war spezifisch für die beiden Arten *P. pentosaceus* und *P. acidilactici*. Die zweite Sonde, Pedio23S6 wurde zur Identifizierung der Arten *P. parvulus*, *P. inopinatus* und *P. damnosus* verwendet. Der Vergleich der Sonden mit hinterlegten rDNA-Sequenzen aus der NCBI-Datenbank (BLAST-Suche) ergab hinsichtlich

der Zielsequenzen keine Übereinstimmungen mit anderen weinrelevanten Mikroorganismen. Zusätzlich zu den beiden Sonden wurden unmarkierte „Helfersonden“ (Fuchs et al., 2000) konstruiert (Tab. 9). Die Helfersonden waren komplementär zu Bereichen auf der ribosomalen RNA, die sich in der Nähe der Bindungsstellen der Fluoreszenz-Sonde befanden. Die Bindungspositionen der fluoreszenzmarkierten Sonden und der unmarkierten Helfersonden an Bereiche der 23S rRNA sind in Abb. 11 dargestellt.

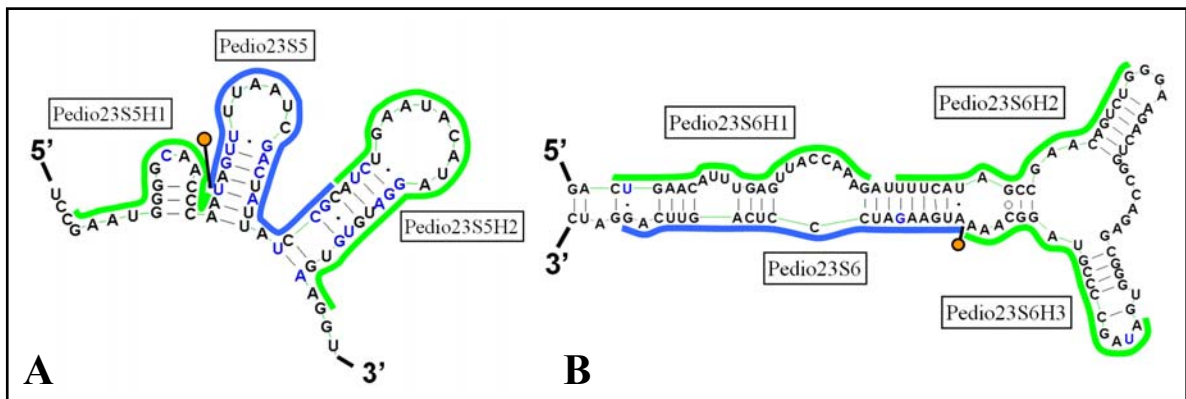


Abb. 11. Modelle der LSU rRNA-Regionen von *P. pentosaceus* (A) und *P. parvulus* (B). Dargestellt sind die Bindungspositionen der Cy3-markierten Sonden (blau) und der unmarkierten Helfersonden (grün). Blau-markierte Nukleotide stellen die Sequenzunterschiede zu *P. damnosus* dar. Die Cy3-Markierungen der Sonden sind als orange Kreise dargestellt.

Mit den neu generierten Sonden wurden Hybridisierungsversuche durchgeführt. Es wurden mehrere Ansätze mit verschiedenen *Pediococcus*-Arten erstellt. Um die Spezifität der Sonden zu untersuchen, wurden Negativkontrollen mit verwandten Milchsäurebakterien und Mischkulturen angefertigt.

Zu Beginn der Hybridisierungsversuche traten Probleme mit dem Eindringen der Sonden in die Zellen auf. Besonders bei Exopolysaccharid-bildenden *Pediococcus*-Stämmen waren oft nur einzelne Zellen hybridisiert, während die anderen Zellen aus derselben Kultur nicht hybridisiert waren. Daraufhin wurde das Hybridisierungsprotokoll durch einen Inkubationsschritt mit Lysozym erweitert (siehe Kap. 2.15). Die Vorbehandlung der Zellen mit Lysozym wirkte sich positiv auf das Eindringen der Sonden in die Zellen aus, was sich daran zeigte, dass nun alle Zellen hybridisiert waren. Die Verwendung der unmarkierten Helfersonden führte zu einer Verstärkung des Fluoreszenz-Signals, so dass nach den anfänglichen Vorversuchen ohne Helfersonden anschließend alle Hybridisierungsexperimente mit einer Mischung aus Cy3-Sonde und den dazugehörigen, unmarkierten Helfersonden durchgeführt wurden.

In Abb. 12 sind Beispiele zur FISH mit verschiedenen *Pediococcus*-Arten gezeigt. Die Sonde Pedio23S5 wurde zur Identifizierung der Spezies *P. pentosaceus* (B254) verwendet.

Das Bakterium konnte sowohl in Reinkultur als auch in einer künstlichen Mischung mit verwandten Milchsäurebakterien in Wein identifiziert werden. Die gleichen Versuche wurden auch zur Identifizierung von *P. acidilactici* mit Sonde Pedio23S5 erfolgreich durchgeführt (Daten hier nicht gezeigt). Außerdem sind die Ergebnisse der FISH einer Reinkultur der Arten *P. damnosus* (B479) und *P. parvulus* (B711) mit der Sonde Pedio23S6 und Helfersonden dargestellt.

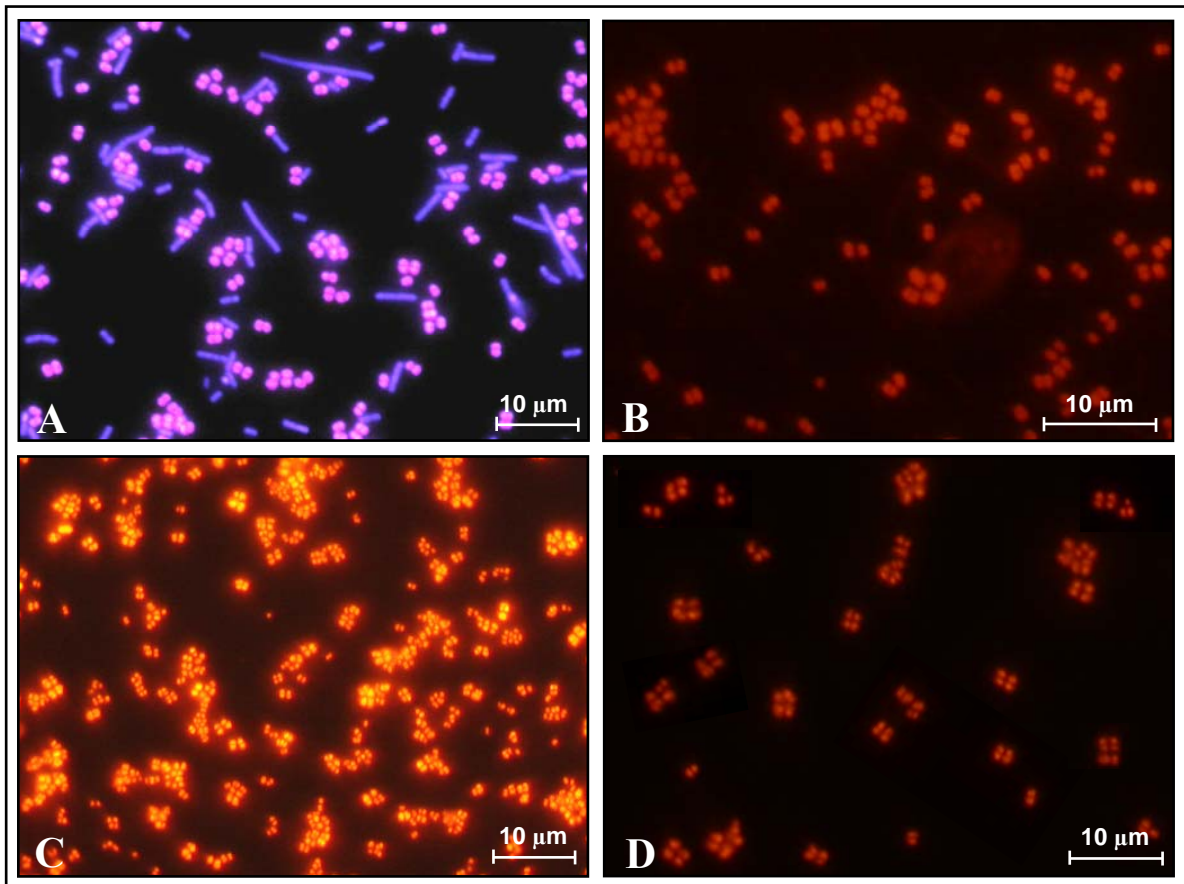


Abb. 12. Mikroskopische Aufnahmen der Pediokokken nach Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit gruppenspezifischen Cy3-Sonden und unmarkierten Helfersonden. A: FISH einer künstlichen Mischung aus *P. pentosaceus* (B254) und *L. buchneri* (B31) hybridisiert mit der Sonde Pedio23S5 und Helfersonden. Aufnahme mit dem Kombinationsfilter für Cy3-markierte DNA-Sonden (rot) und DAPI (blau); B: Gleicher Ansatz wie A (Cy3-Sondenfilter); C und D: FISH mit *P. damnosus* (B479) (C) und *P. parvulus* (B711) (D) hybridisiert mit der Sonde Pedio23S6 (Cy3-Sondenfilter).

Die Ergebnisse der durchgeführten FISH-Versuche zur Identifizierung der beschriebenen *Pediococcus*-Arten und der Untersuchung verwandter Milchsäurebakterien als Negativkontrollen sind zusammengefasst in Tab. 41 dargestellt.

Tab. 41. Ergebnisse der FISH mit Cy3-markierten DNA-Sonden

Stamm ^a	Gattung Art	Sonde „Pedio23S5“ + Helfersonden	Sonde „Pedio23S6“ + Helfersonden
B254	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+	-
DSM 1056	<i>Pediococcus acidilactici</i>	+	-
B711	<i>Pediococcus parvulus</i>	-	+
B399	<i>Pediococcus parvulus</i>	-	+
B479	<i>Pediococcus damnosus</i>	-	+
DSM 20285 ^T	<i>Pediococcus inopinatus</i>	-	+
B31	<i>Lactobacillus buchneri</i>	-	-
B268	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	-	-
B38	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-

^a DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig.

^T Typstamm.

3.6 DGGE zur Differenzierung von Milchsäurebakterien

Die PCR zur Denaturierenden Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) wurde mit Stämmen der Arten *Pediococcus parvulus* (DSM 20332^T und B395), *P. damnosus* (DSM 20331^T, Hock B2.1 und B7), *L. mesenteroides* (B117 und B30), *Oenococcus oeni* (B236 und B325) und *Lactobacillus hilgardii* (B146 und B279) unter Verwendung der Primer DGGE_F1 und DGGE_R1 (Tab. 5) durchgeführt. Die Auftrennung des ca. 350 bp großen 23S rDNA-Bereichs erfolgte durch DGGE in einem Polyacrylamidgel.

Jede Milchsäurebakterien-Art ließ sich anhand spezifischer Gelbanden von den anderen Arten abgrenzen. Auffällig war, dass nicht nur eine Gelbande auftrat, sondern mehrere Gelbanden pro Stamm beobachtet werden konnten (Abb. 13). Möglicherweise kam dieser Effekt dadurch zustande, da die ribosomalen Gene in mehreren Kopien (z.B. bei *P. pentosaceus* ATCC 25745 in fünf Kopien) auf der genomischen DNA vorliegen.

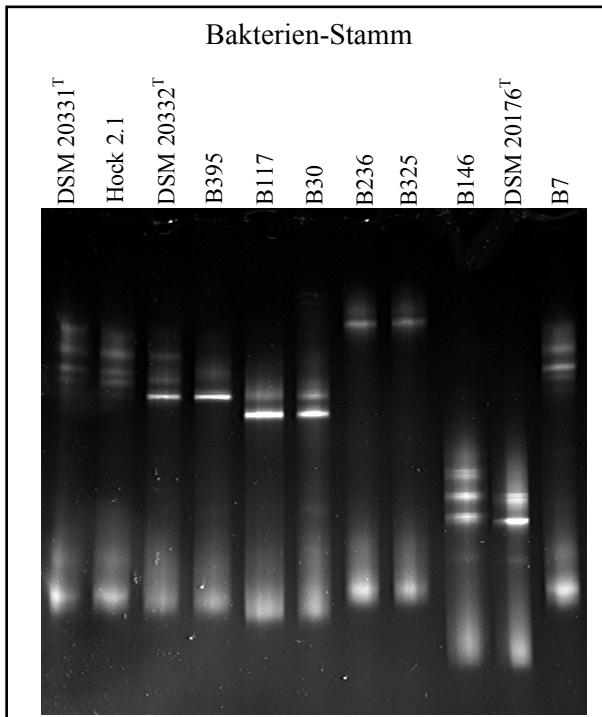


Abb. 13. DGGE mit einem 350 bp PCR-Produkt eines variablen 23S rDNA-Bereichs verschiedener Milchsäurebakterien. Polyacrylamidgel nach elektrophoretischer Auftrennung und Färbung mit Ethidiumbromid. Stamm DSM 20331^T, Hock B2.1 und B7: *P. damnosus*; DSM 20332^T und B395: *P. parvulus*; B117 und B30: *Leuconostoc mesenteroides*; B236 und B325: *Oenococcus oeni*; B146 und DSM 20176^T: *Lactobacillus hilgardii*.

3.7 Untersuchung der Gene zur Exopolysaccharid-Synthese

Zum Nachweis des *mob*-Gens, das für ein mobilization-Protein kodiert wurde die PCR-Methode nach Gindreau et al. (2001) durchgeführt. Die Methode wurde zum Nachweis Glucan-bildender Stämme des Bakteriums *P. damnosus* entwickelt. In der vorliegenden Studie wurden aber auch Stämme der verwandten Art *P. parvulus* untersucht. Bei 60 von 74 Stämmen der beiden Arten konnte das erwartete 380 bp große PCR-Produkt mit den Primern PF15 und PF16 amplifiziert werden (Tab. 42). Von den 60 *mob*-positiven Stämmen bildeten nur 20 ein Glucan beim Wachstum auf MRS-Agar. Die übrigen Stämme schienen zwar das *mob*-Gen zu besitzen, zeigten den Phänotyp beim Wachstum auf MRS-Agar unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht.

Der Nachweis des *gtf*-Gens, das für eine Glycosyltransferase codiert erfolgte nach der PCR-Methode von Werning et al. (2006). Bei 33 von 74 untersuchten Stämmen der Arten *P. damnosus* und *P. parvulus* konnte das *gtf*-Gen nachgewiesen werden (Tab. 42). Von den *gtf*-positiven Stämmen bildeten 15 ein Glucan beim Wachstum auf MRS-Agar. Bei vier Stämmen war die Glucan-Bildung vorhanden, obwohl das *gtf*-Gen nicht nachgewiesen werden konnte.

Tab. 42. Ergebnisse der Untersuchung von Genen zur Exopolysaccharid-Synthese

Stamm	Art	EPS ^a	mob ^b	gtf ^c	Stamm	Art	EPS ^a	mob ^b	gtf ^c
B2.1	<i>P. damnosus</i>	+	+	+	B441	<i>P. parvulus</i>	-	-	-
B2.2	<i>P. damnosus</i>	+	+	+	B442	<i>P. parvulus</i>	-	+	+
B7	<i>P. damnosus</i>	-	+	+	B443	<i>P. parvulus</i>	+	+	-
B8	<i>P. damnosus</i>	+	+	+	B444	<i>P. parvulus</i>	-	-	-
B9	<i>P. damnosus</i>	-	-	+	B445	<i>P. parvulus</i>	+	+	+
B12	<i>P. damnosus</i>	-	+	+	B446	<i>P. parvulus</i>	-	-	-
B13	<i>P. parvulus</i>	-	+	+	B447	<i>P. parvulus</i>	-	+	-
B14	<i>P. damnosus</i>	+	+	+	B448	<i>P. parvulus</i>	-	+	-
B15	<i>P. damnosus</i>	-	+	-	B449	<i>P. parvulus</i>	-	+	-
B16	<i>P. damnosus</i>	-	+	+	B450	<i>P. parvulus</i>	-	+	-
B47	<i>P. damnosus</i>	-	+	+	B451	<i>P. damnosus</i>	-	+	-
B55	<i>P. damnosus</i>	-	+	+	B452	<i>P. damnosus</i>	-	-	-
B68	<i>P. damnosus</i>	-	+	+	B453	<i>P. parvulus</i>	-	+	-
B69	<i>P. damnosus</i>	-	+	+	B454	<i>P. parvulus</i>	-	+	-
B78	<i>P. damnosus</i>	-	+	+	B455	<i>P. damnosus</i>	+	+	+
B89	<i>P. damnosus</i>	-	+	+	B456	<i>P. parvulus</i>	-	-	-
B91	<i>P. damnosus</i>	-	-	-	B457	<i>P. parvulus</i>	+	+	-
B93	<i>P. damnosus</i>	+	+	+	B458	<i>P. parvulus</i>	+	-	+
B97	<i>P. damnosus</i>	-	+	+	B459	<i>P. parvulus</i>	-	+	-
B98	<i>P. damnosus</i>	-	-	+	B460	<i>P. parvulus</i>	+	+	-
B99	<i>P. damnosus</i>	-	+	+	B476	<i>P. parvulus</i>	-	+	-
B140	<i>P. parvulus</i>	-	-	-	B477	<i>P. parvulus</i>	-	+	-
B141	<i>P. parvulus</i>	-	+	-	B478	<i>P. parvulus</i>	-	+	-
B266	<i>P. parvulus</i>	-	+	+	B479	<i>P. damnosus</i>	-	-	-
B267	<i>P. parvulus</i>	-	+	-	B480	<i>P. parvulus</i>	-	-	-
B391	<i>P. parvulus</i>	-	+	-	B481	<i>P. parvulus</i>	-	-	-
B395	<i>P. parvulus</i>	+	+	+	B482	<i>P. parvulus</i>	-	+	+
B397	<i>P. parvulus</i>	+	+	+	B483	<i>P. parvulus</i>	-	+	-
B398	<i>P. parvulus</i>	+	+	+	B484	<i>P. parvulus</i>	+	+	-
B399	<i>P. parvulus</i>	+	+	+	B485	<i>P. parvulus</i>	-	+	-
B400	<i>P. parvulus</i>	+	+	+	B486	<i>P. parvulus</i>	-	+	-
B401	<i>P. parvulus</i>	-	+	-	B487	<i>P. parvulus</i>	-	+	-
B404	<i>P. parvulus</i>	-	+	+	B488	<i>P. parvulus</i>	-	-	-
B405	<i>P. parvulus</i>	+	+	+	B489	<i>P. parvulus</i>	-	-	-
B427	<i>P. parvulus</i>	+	+	+	B490	<i>P. parvulus</i>	-	+	-
B428	<i>P. parvulus</i>	-	+	-	B491	<i>P. parvulus</i>	+	+	-
B440	<i>P. parvulus</i>	-	-	-	B492	<i>P. parvulus</i>	+	+	-

^a EPS: Exopolysaccharid-Bildung auf MRS-Agar (siehe Kap. 2.9.2).

^b *mob*: Identifizierung des *mob*-Gens, das für ein „mobilization“-Protein codiert.

^c *gtf*: Identifizierung des *gtf*-Gens, das für eine Glycosyltransferase codiert.

3.8 Genotypisierung durch nested SAPD-PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde die nested specifically amplified polymorphic DNA (SAPD)-PCR (Pfannebecker, 2005; Pfannebecker & Fröhlich 2006, 2007) vor allem zur Untersuchung verschiedener Milchsäurebakterien und Hefen durchgeführt. Die Identifizierung unbekannter Stämme erfolgte durch den Vergleich ihrer DNA Fingerprint-Bandenmuster mit den typischen Bandenmustern bekannter Arten. Außerdem wurde die Methode zur Stamm-Differenzierung und zur Durchführung von Cluster-Analysen verwendet. Neben der Identifizierung der Mikroorganismen wurde überprüft, ob die nested SAPD-PCR auch zur Unterscheidung höherer Eukaryoten wie Weinreben, Mäuse und Menschen angewendet werden kann.

3.8.1 Art-Identifizierung und Cluster-Analyse der Pediokokken

Zur Identifizierung und Differenzierung der neun *Pediococcus*-Arten wurde die SAPD-PCR mit den Primern A-Not, C-Not, G-Not und T-Not (Tab. 7) durchgeführt. Alle neun *Pediococcus*-Arten konnten durch SAPD-PCR differenziert werden (Abb. 14 und 15). Es wurde also für jede Art ein charakteristisches DNA Fingerprint-Bandenmuster generiert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass jeder einzelne der vier SAPD-Primer (Tab. 7) geeignet war ein artspezifisches Bandenmuster zu erzeugen. Wiederholungen derselben Ansätze zeigten, dass alle Bandenmuster reproduzierbar waren.

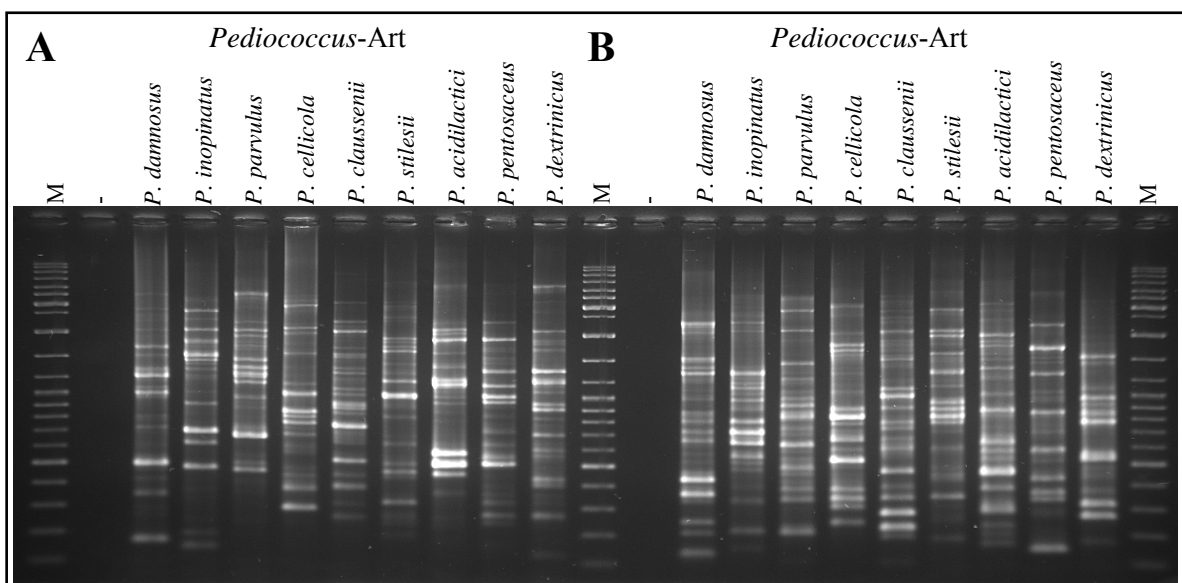


Abb. 14. SAPD-PCR mit den neun *Pediococcus*-Arten. Abbildung A: SAPD-PCR mit Primer A-Not. Abbildung B: SAPD-PCR mit Primer C-Not. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA. Es wurde jeweils der Typstamm jeder Art untersucht (Tab. 10).

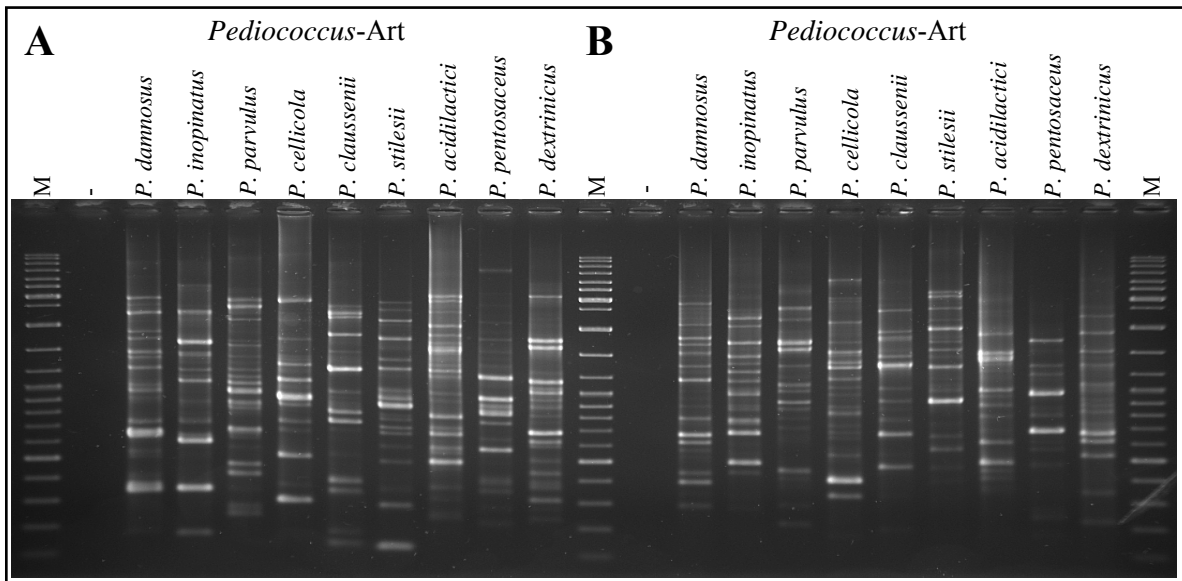


Abb. 15. SAPD-PCR mit den neun *Pediococcus*-Arten. Abbildung A: SAPD-PCR mit Primer G-Not. Abbildung B: SAPD-PCR mit Primer T-Not. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA. Es wurde jeweils der Typstamm jeder Art untersucht (Tab. 10).

Bei der Untersuchung mehrerer *Pediococcus*-Stämme einer Art konnte anschaulich gezeigt werden, dass die SAPD-PCR zur Art-Identifizierung herangezogen werden kann (Abb. 16). Die PCR wurde mit dem Primer A-Not (Tab. 7) durchgeführt. Innerhalb der meisten Arten waren die Bandenmuster der einzelnen Stämme nur leicht unterschiedlich. Eine größere Heterogenität im Bandenmuster konnte aber zwischen verschiedenen Stämmen der beiden Arten *P. acidilactici* und *P. dextrinicus* beobachtet werden. Innerhalb der *P. acidilactici*-Stämme unterschied sich das Bandenmuster des Stammes B473 von den Bandenmustern der zwei weiteren Stämme. Bei den *P. dextrinicus*-Stämmen konnten größere Unterschiede zwischen allen drei Stämmen beobachtet werden. Von den drei Arten: *P. clausenii* (DSM 14800^T), *P. cellicola* (DSM 17757^T) und *P. stilesii* (DSM 18001^T) wurde jeweils nur der Typstamm untersucht, da von jeder Art nur ein Stamm in Kulturensammlungen erhältlich war.

Die Berechnung der Identitäten im DNA Fingerprint-Bandenmuster zwischen 22 *P. parvulus*-Stämmen, die in der SAPD-PCR mit Primer G-Not untersucht wurden (Anhang 8.4; Abb. A) ergab eine Übereinstimmung von 65 %. Die fünffache Wiederholung der SAPD-PCR mit demselben *P. damnosus*-Stamm (DSM 20331^T) und Primer G-Not führten zu DNA Fingerprint-Bandenmustern mit 97 % Identität.

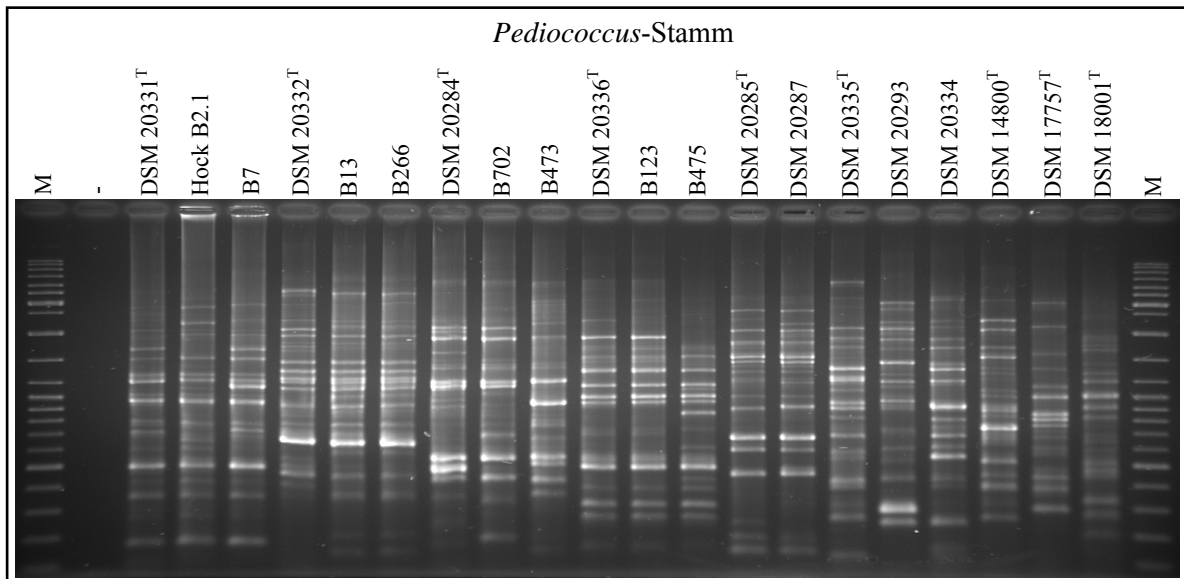


Abb. 16. SAPD-PCR mit verschiedenen *Pediococcus*-Stämmen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Die PCR wurde mit Primer A-Not durchgeführt. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA; Stamm DSM 20331^T, Hock B2.1 und B7: *P. damnosus*; DSM 20332^T, B13 und B266: *P. parvulus*; DSM 20284^T, B702 und B473: *P. acidilactici*; DSM 20336^T, B123 und B475: *P. pentosaceus*; DSM 20285^T und DSM 20287: *P. inopinatus*; DSM 20335^T, DSM 20293 und DSM 20334: *P. dextrinicus*; DSM 14800^T: *P. clausenii*; DSM 17757^T: *P. cellicola*; DSM 18001^T: *P. stilesii*.

Die durch Multiplex PCR identifizierten 97 *Pediococcus*-Stämme (Tab. 38 und 39) wurden durch SAPD-PCR unter Verwendung des Primers G-Not (Tab. 7) untersucht (siehe Anhang 8.4). Anhand der artspezifischen DNA Fingerprint-Bandenmuster konnten die Stämme eindeutig der jeweiligen Art zugeordnet werden. Die Ergebnisse der Art-Identifizierung durch Multiplex PCR wurden in allen Fällen durch die SAPD-PCR verifiziert.

Cluster-Analyse der *Pediococcus*-Typstämme

Die Gelbilder, die durch SAPD-PCR der neun *Pediococcus*-Typstämme mit vier unterschiedlichen Primern nach gelelektrophoretischer Auftrennung entstanden waren (Abb. 14 und 15), wurden mit der Software Bio-1D (Vilber-Lourmat, Eberhardzell) ausgewertet. Die Datenmatrizen, die aus der Auswertung der vier Gelbilder hervorgingen, wurden zu einer Matrix kombiniert (Anhang 8.5.1). Die aus 202 Positionen bestehende Datenmatrix wurde anschließend in NEIGHBOR des PHYLIP-Programmpakets (Felsenstein, 1989) nach der Neighbor Joining Methode berechnet und in Tree View (Page, 1996) geöffnet und editiert. Der durch Cluster-Analyse entstandene Stammbaum wurde mit dem phylogenetischen 23S rDNA-Stammbaum verglichen (Abb. 17).

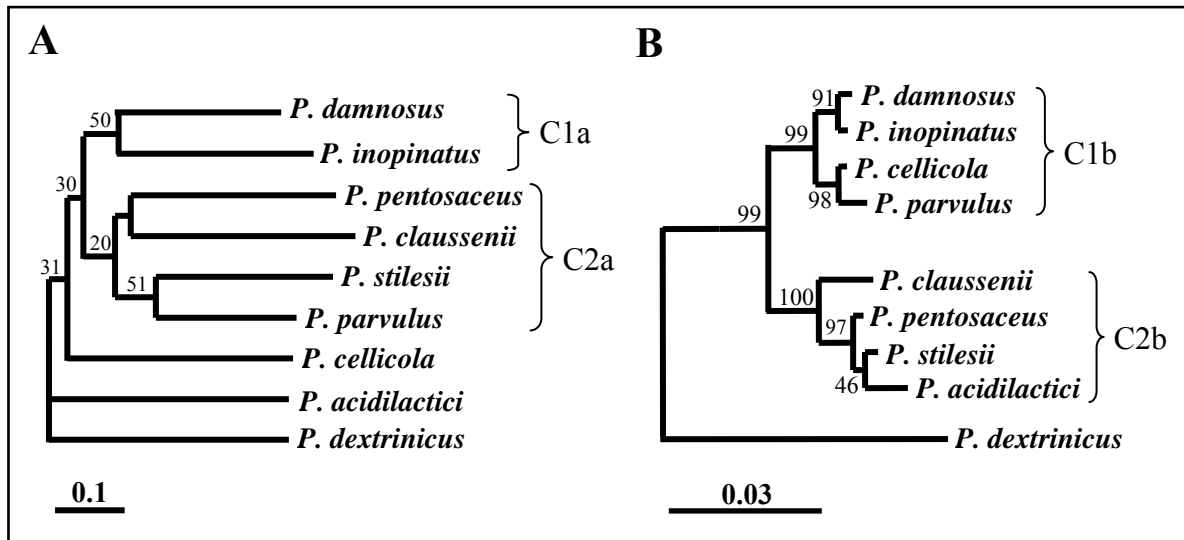


Abb. 17. Vergleich der Cluster-Analyse und der phylogenetischen LSU rDNA-Analyse der neun *Pediococcus*-Typstämme. Abbildung A: Cluster-Analyse basierend auf den Ergebnissen der SAPD-PCR mit den Primern A-Not, C-Not, G-Not und T-Not (Abb. 14 und 15) berechnet durch Neighbor Joining. Der Maßstab entspricht 10 % Merkmalsunterschieden der Bandenmuster in der SAPD-PCR. Abbildung B: Phylogenetischer Maximum Likelihood-Stammbaum auf Basis der 23S rDNA-Sequenzen (vgl. Abb. 6). Der Maßstab entspricht einer phylogenetischen Distanz von 3 %. *P. dextrinicus* wurde in beiden Analysen als Außengruppe angegeben.

Beim Vergleich der Ergebnisse der Cluster-Analyse mit der phylogenetischen LSU rDNA-Analyse der *Pediococcus*-Typstämme fiel auf, dass die Verwandtschaftsverhältnisse der einzelnen Arten in den meisten Fällen unterschiedlich waren. Nur *P. damnosus* und *P. inopinatus* waren in beiden Analysen nah verwandt. Während diese beiden Arten eine eigene Gruppe (C1a) in der Cluster-Analyse bildeten, befanden sie sich in der phylogenetischen Analyse auf einem Cluster zusammen mit *P. parvulus* und *P. cellicola* (C1b). Durch Cluster-Analyse war *P. parvulus* den Arten *P. stilesii*, *P. pentosaceus* und *P. claussenii* angliedert (C2a). *P. acidilactici* war in der phylogenetischen Analyse den Arten *P. stilesii*, *P. pentosaceus* und *P. claussenii* zugeordnet (C2b). Dagegen war *P. acidilactici* in der Cluster-Analyse entfernter verwandt zu diesen Arten. Die niedrigen Bootstrap-Werte bei der Cluster-Analyse zeigten, dass die Baum-Topologie dieses Stammbaumes nicht sehr stabil war. Die Position der Spezies *P. acidilactici* war allerdings auch in der phylogenetischen Analyse nur durch einen niedrigen Wert statistisch abgesichert (Pfannebecker & Fröhlich, 2008).

3.8.2 Identifizierung neu isolierter *Oenococcus oeni*-Stämme aus Wein

Aus rheinhessischen Weinproben wurden Bakterien isoliert, die bei der mikroskopischen Untersuchung eine für *Oenococcus oeni* typische Zellform (Diplokokken und Kokken in

Ketten) zeigten. Die Art-Zugehörigkeit dieser Bakterien wurde durch SAPD-PCR überprüft. Die SAPD-PCR wurde unter Verwendung des Primers C-Not (Tab. 7) durchgeführt. Als Vergleichsstämme dienten die *Oenococcus oeni*-Stämme, B236 und B325 der institutseigenen Kultursammlung (Tab. 14). Nach gelelektrophoretischer Trennung der PCR-Amplifikate zeigten alle untersuchten Stämme ein nahezu identisches, artspezifisches DNA-Fingerprint-Bandenmuster mit Gelbanden im Bereich zwischen 100 bp und 3,5 kb (Abb. 18). Das Bandenmuster stimmte mit dem Bandenmuster der beiden Vergleichsstämme überein. Zwischen den Bandenmustern der *Oenococcus oeni*-Stämme konnten leichte Unterschiede bezüglich des Vorhandenseins oder der Abwesenheit einzelner Gelbanden beobachtet werden. Alle neu isolierten und identifizierten *Oenococcus oeni*-Stämme wurden in der institutseigenen Kultursammlung hinterlegt.

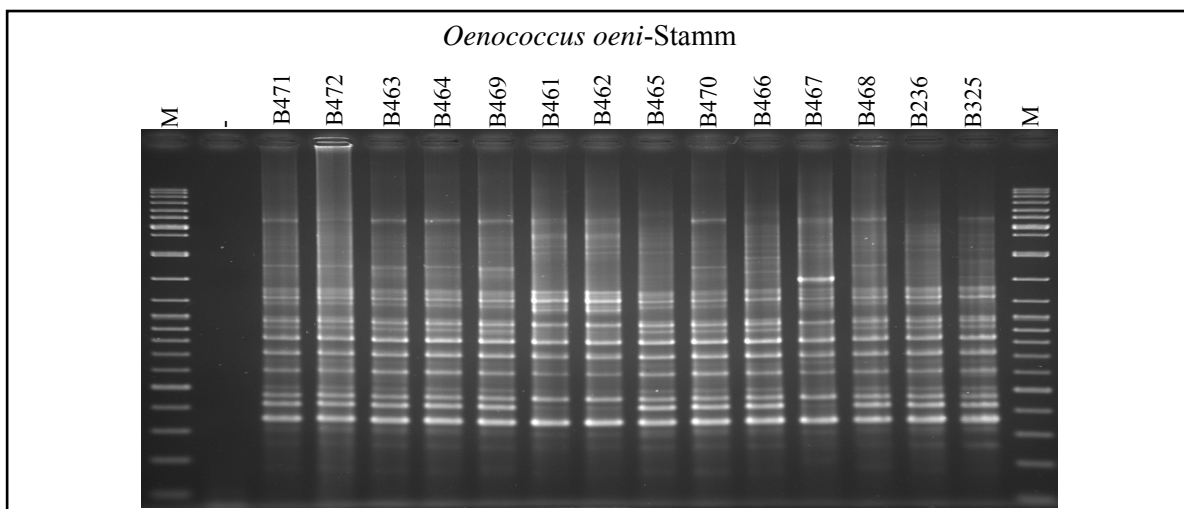


Abb. 18. SAPD-PCR zur Art-Identifizierung neu isolierter Bakterienstämme aus Weinproben. Die PCR wurde mit Primer C-Not durchgeführt. M: Marker DNA-Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA. Die Herkunft der Stämme ist in Tab. 13 angegeben.

3.8.3 Cluster-Analyse der *Oenococcus oeni*-Stämmen aus Starterkulturen

Mit 19 der in Tab. 14 aufgeführten *Oenococcus oeni*-Stämmen der institutseigenen Kultursammlung wurde eine Cluster-Analyse durchgeführt. Zunächst wurden die Stämme durch SAPD-PCR mit dem Primer C-Not (Tab. 7) amplifiziert und die PCR-Amplifikate gelelektrophoretisch aufgetrennt. (Abb. 19).

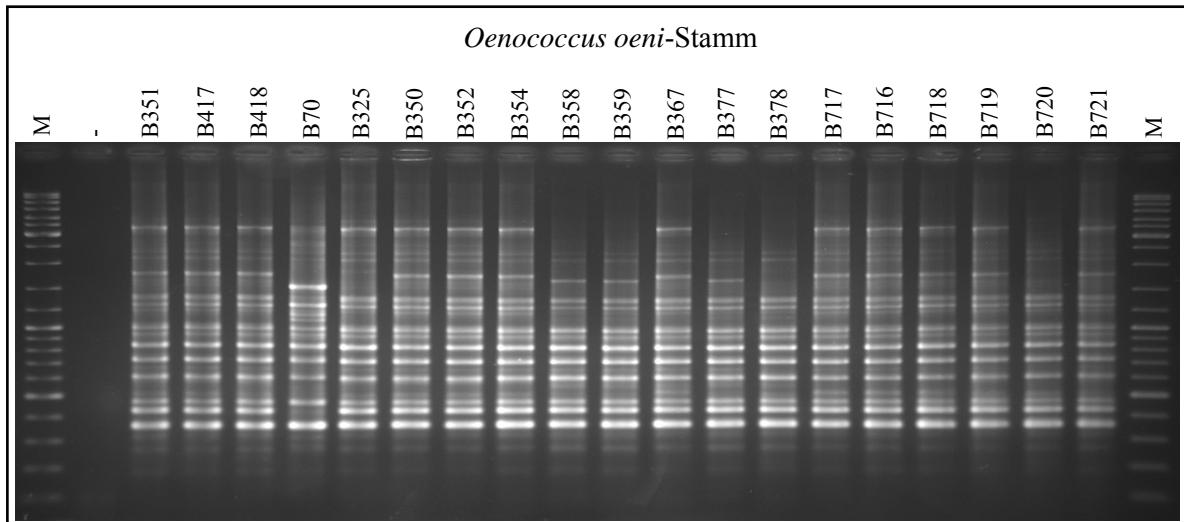


Abb. 19. SAPD-PCR zur Cluster-Analyse von *Oenococcus oeni*-Stämmen aus Starterkulturen. Es wurde der Primer C-Not verwendet. M: Marker DNA-Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA. Zur Stammbezeichnung vgl. Tab. 14.

Das PCR-Produkt der SAPD-PCR wurde anschließend als Template-DNA für eine zweite Amplifizierung in der nested SAPD-PCR verwendet. Der nested PCR-Schritt wurde mit den Primern C-Not-A, C-Not-C und C-Not-T (Tab. 7) durchgeführt. Die Ergebnisse der nested SAPD-PCR mit *O. oeni*-Stämmen aus Starterkulturen sind in Abb. 20 und 21 dargestellt.

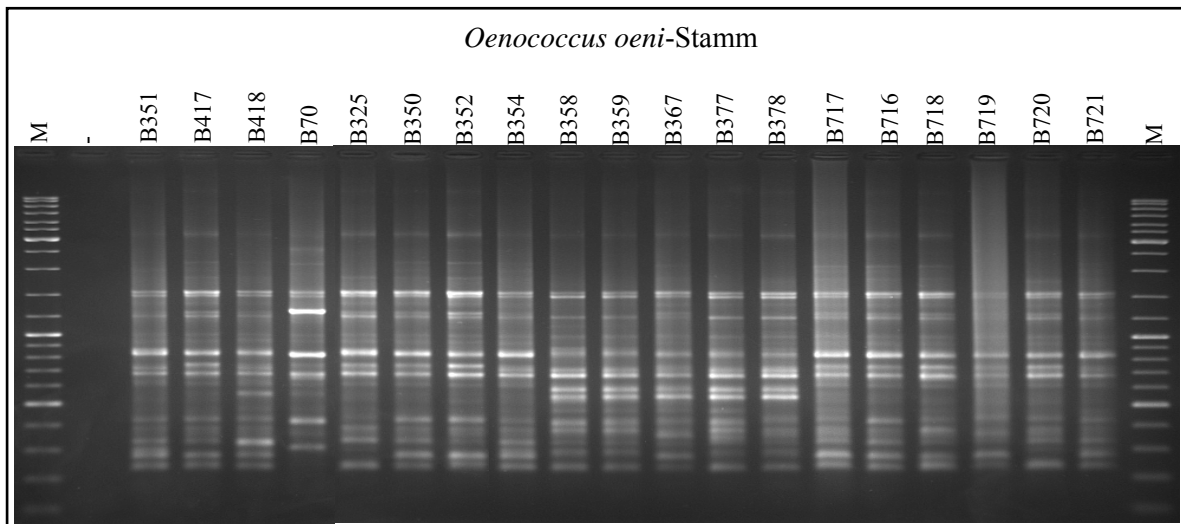


Abb. 20. Nested SAPD-PCR zur Cluster-Analyse von *Oenococcus oeni*-Stämmen aus Starterkulturen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Zur PCR wurde der Primer C-Not-A verwendet. M: Marker DNA-Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA. Zur Bezeichnung der *O. oeni*-Stämme vgl. Tab. 14.

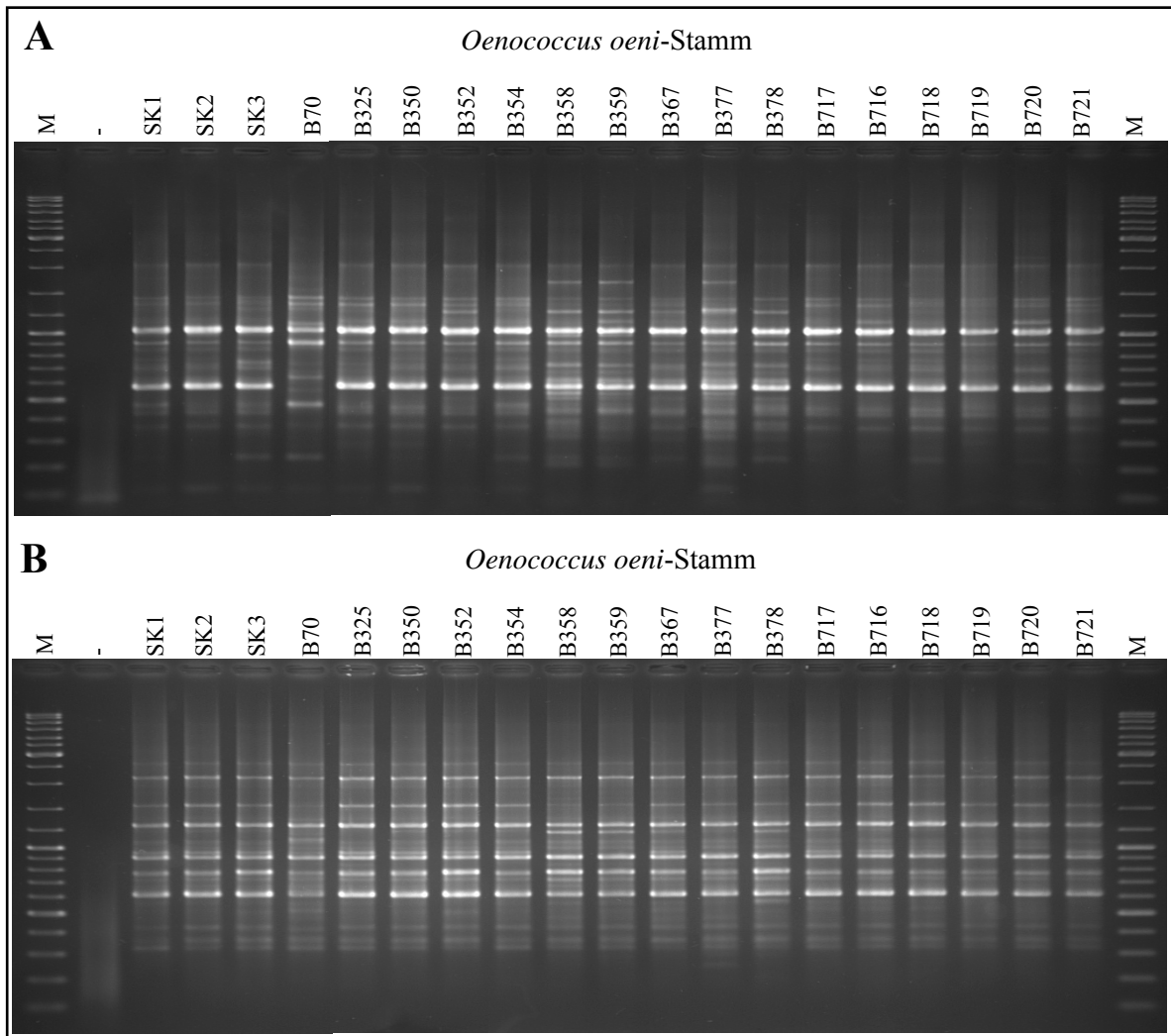


Abb. 21. Nested SAPD-PCR zur Cluster-Analyse von *Oenococcus oeni*-Stämmen aus Starterkulturen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Abbildung A: mit Primer C-Not-C; Abbildung B: mit Primer C-Not-T. M: Marker DNA-Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA. Zur Bezeichnung der *O. oeni*-Stämme vgl. Tab. 14.

Die Gelbilder, die durch die Verwendung der drei Primer in der nested SAPD-PCR mit *Oenococcus oeni*-Stämmen nach gelelektrophoretischer Trennung entstanden waren (Abb. 18 und 19) wurden mit der Software Bio-1D (Vilber-Lourmat, Eberhardzell) ausgewertet. Die Datenmatrizen, die aus der Auswertung der einzelnen Gelbilder hervorgingen, wurden zu einer Matrix kombiniert (Anhang 8.5.2). Die aus 92 Positionen bestehende Datenmatrix wurde anschließend in NEIGHBOR des PHYLIP-Programmpakets (Felsenstein, 1989) nach der Neighbor Joining Methode berechnet und in Tree View (Page, 1996) geöffnet und editiert. Das Ergebnis der Cluster-Analyse mit *Oenococcus oeni*-Stämmen ist in Abb. 22 dargestellt.

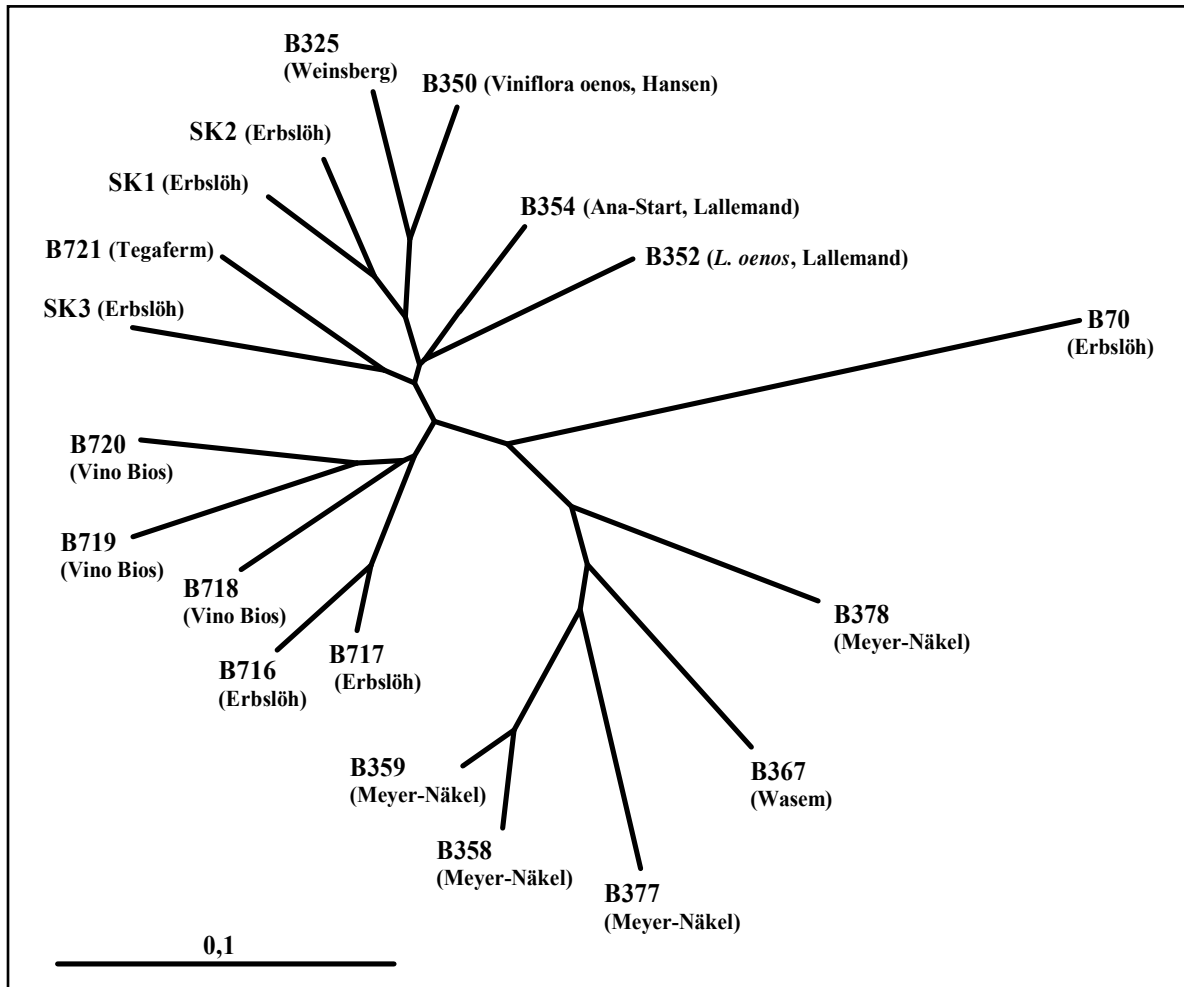


Abb. 22. Cluster-Analyse der *Oenococcus oeni*-Stämme aus Starterkulturen (Tab. 14). Die Stämme wurden in der nested SAPD-PCR unter Verwendung der drei Primer C-Not-A, C-Not-C und C-Not-T untersucht und die PCR-Amplifikate gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 20 und 21). Die Unterschiede der Stämme zueinander wurden durch die Auswertung der drei Gelbilder ermittelt. Der Maßstab entspricht 10 % Merkmalsunterschieden der Bandenmuster in der nested SAPD-PCR.

Der durch Cluster-Analyse ermittelte Stammbaum von 19 *Oenococcus oeni*-Stämmen der institutseigenen Kultursammlung zeigte, dass Stamm B70 genetisch am weitesten von allen anderen Stämmen entfernt war. Die Stämme, die aus Weinen desselben Weingutes (Meyer-Näkel) isoliert wurden bildeten einen eigenen Cluster. Auf dem gleichen Cluster befand sich auch Stamm B367 (Weingut Wasem). Die neu untersuchten Stämme der Firmen Vino Bios und Erbslöh (B716-B720) bildeten einen eigenen Cluster. Stamm B721 (Firma Tegaferm) war am nächsten mit Stamm SK3 (Erbslöh) verwandt.

Die Berechnung der Identitäten im DNA Fingerprint-Bandenmuster zwischen 19 *O. oeni*-Stämmen, die in der SAPD-PCR mit Primer C-Not untersucht wurden (Abb. 19) ergab eine Übereinstimmung von 75 %.

3.8.4 Identifizierung der Milchsäurebakterien aus Starterkulturen

Durch SAPD-PCR konnte ein Teil der Milchsäurebakterien aus Starterkulturen der Spezies *P. acidilactici* zugeordnet werden. Die Stämme wurden durch Vergleich mit dem Bandenmuster des Typstamms (DSM 20284^T) identifiziert (Abb. 23). Die Art-Identifizierung konnte durch Sequenzierung eines Teilstückes der 16S rDNA bestätigt werden (siehe Kap. 3.1.1).

Die übrigen Stämme aus den Starterkulturen zeigten das gleiche Bandenmuster. Anhand des Vergleichs der DNA Fingerprint-Bandenmuster mit bekannten Milchsäurebakterien konnten die Stämme aber zunächst keinem Bakterium zugeordnet werden. Die Sequenzierung der 16S rDNA führte nach Sequenzvergleich in der NCBI-Datenbank (GenBank) zu dem Ergebnis, dass die Stämme der Art *Enterococcus faecium* angehörten (siehe Kap. 3.1.1).

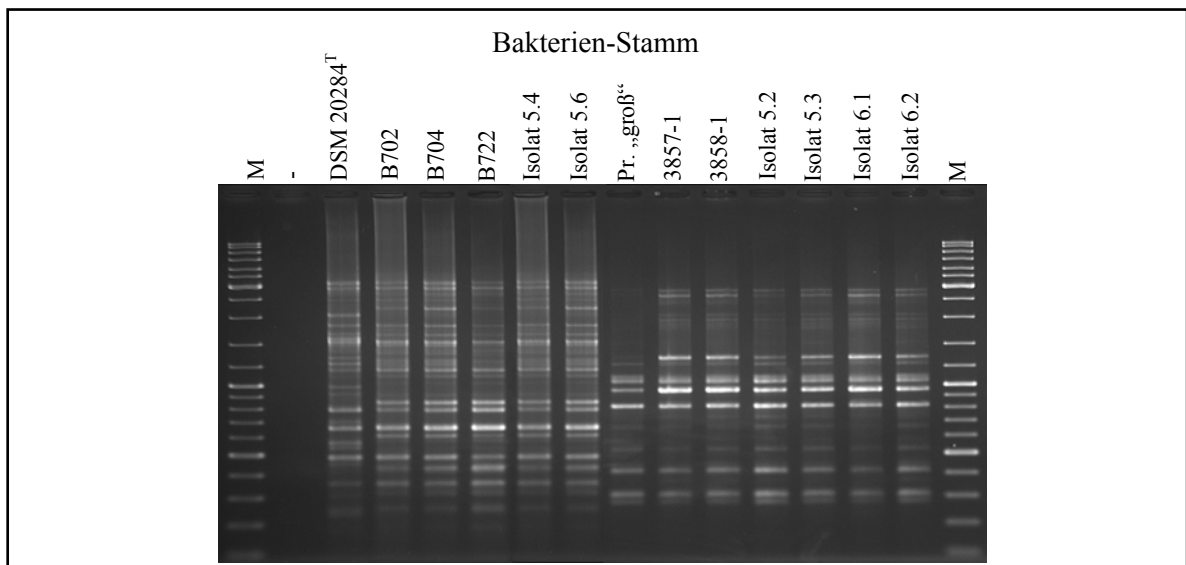


Abb. 23. SAPD-PCR zur Art-Identifizierung neu isolierter Milchsäurebakterien-Stämme aus Starterkulturen. Für die Untersuchung durch SAPD-PCR wurde der Primer G-Not verwendet. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA. Stamm DSM 20284^T, B702, B704, B722, Isolat 5.4 und Isolat 5.6: *P. acidilactici*; Stamm Pr. „groß“, 3857-1, 3858-1, Isolat 5.2, Isolat 5.3, Isolat 6.1 und Isolat 6.2: *Enterococcus faecium*.

3.8.5 Differenzierung weiterer Milchsäurebakterien

Ein weiteres Beispiel zur Art-Unterscheidung von Milchsäurebakterien durch SAPD-PCR ist in Abb. 24 dargestellt. Hier wurden verschiedene Milchsäurebakterien der Gattungen *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* und *Streptococcus* unter Verwendung des Primers C-Not (Tab. 7) untersucht. Die PCR wurde mit mindestens

zwei Stämmen jeder Art durchgeführt, sofern mehrere Stämme einer Art in der institutseigenen Kulturensammlung verfügbar waren.

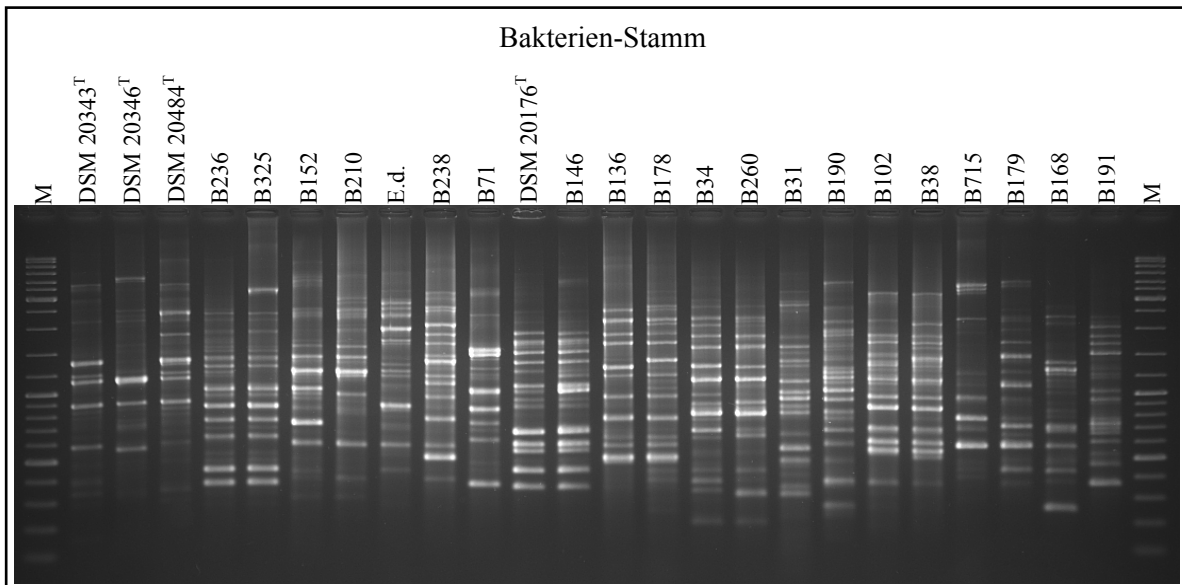


Abb. 24. SAPD-PCR mit Milchsäurebakterien unterschiedlicher Gattungen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Zur PCR wurde Primer C-Not verwendet. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA; Stamm DSM 20343^T: *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*; DSM 20346^T: *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*; DSM 20484^T: *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*; B236 und B325: *O. oeni*; B152 und B210: *E. faecalis*; E.d.: *E. durans*; B238: *L. lactis*; B71: *S. mutans*; DSM 20176^T und B146: *L. hilgardii*; B136 und B178: *L. casei*; B34 und B260: *L. brevis*; B31: *L. buchneri*; B190: *L. parabuchneri*; B102 und B38: *L. plantarum*; B715: *L. acidophilus*; B179: *L. suntoryeus*; B168: *L. paralimentarius*; B191: *L. frumenti*.

Durch SAPD-PCR konnte für jede Art ein charakteristisches DNA Fingerprint-Bandenmuster generiert werden. Das Bandenmuster war zwischen zwei Stämmen einer Art prinzipiell nur leicht heterogen. Die drei Subspezies der Art *L. mesenteroides* (DSM 20343^T, DSM 20346^T und DSM 20484^T) zeigten ein unterschiedliches Bandenmuster. Auch nahe verwandte Arten, wie *L. buchneri* (B31) und *L. parabuchneri* (B190) konnten unterschieden werden.

3.8.6 Differenzierung der *Dekkera* / *Brettanomyces bruxellensis*-Stämme

Mit den *Dekkera* / *Brettanomyces bruxellensis*-Stämmen aus der institutseigenen Kultursammlung (Tab. 19) wurde eine Cluster-Analyse durchgeführt. Zunächst wurde die DNA der Stämme durch SAPD-PCR mit Primer A-Not (Tab. 7) amplifiziert und die PCR-Amplifikate gelelektrophoretisch aufgetrennt. Alle untersuchten Stämme zeigten ein sehr homologes DNA Fingerprint-Bandenmuster nach der ersten PCR (Abb. 25).

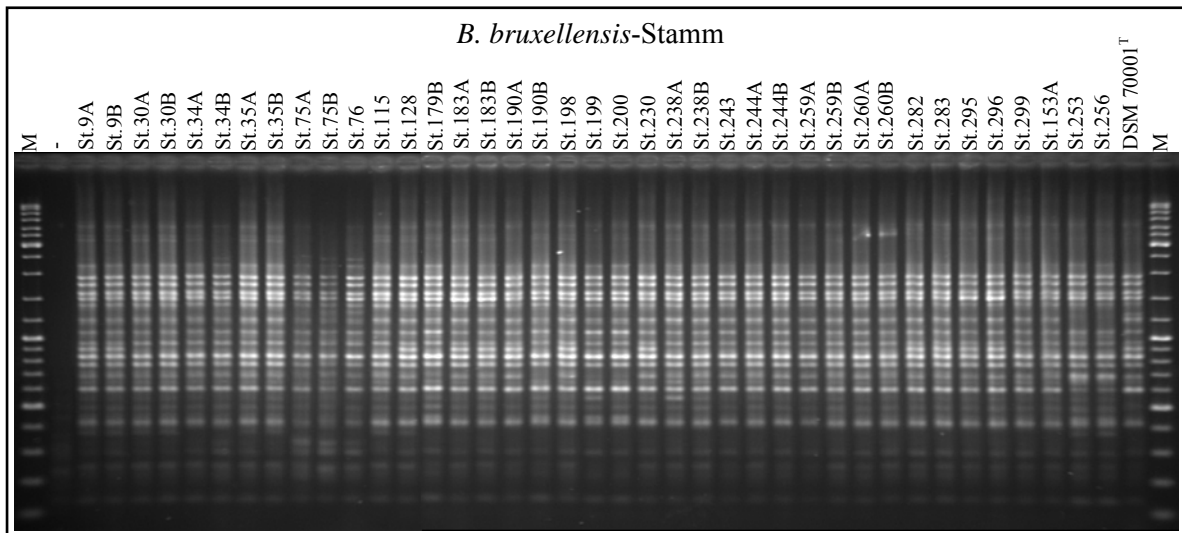


Abb. 25. SAPD-PCR zur Cluster-Analyse von *Dekkera* / *Brettanomyces bruxellensis*-Stämmen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Zur PCR wurde der Primer A-Not verwendet. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA; Zur Bezeichnung der Stämme vgl. Tab. 19.

Die Amplifikate der SAPD-PCR wurden als Template-DNA zur Amplifizierung in einer nested PCR mit den Primern A-Not-C, A-Not-G und A-Not-T (Tab. 7) verwendet. Die Ergebnisse der nested SAPD-PCR zur Cluster-Analyse der *Dekkera* / *Brettanomyces bruxellensis*-Stämme sind in Abb. 26 dargestellt.

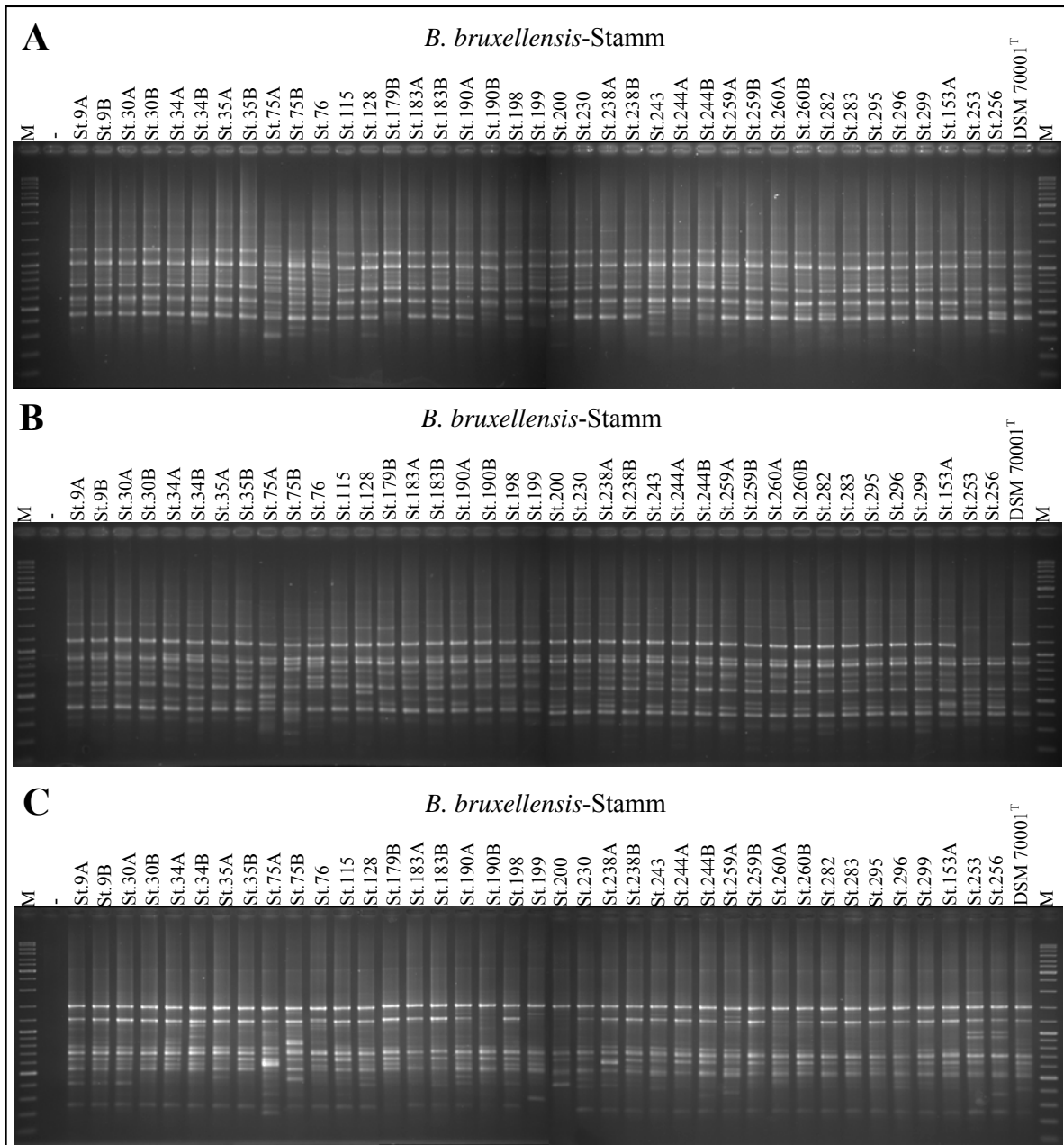


Abb. 26. Nested SAPD-PCR zur Cluster-Analyse von *Dekkera* / *Brettanomyces bruxellensis*-Stämmen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Abbildung A: mit Primer A-Not-C; Abbildung B: mit Primer A-Not-G; Abbildung C: mit Primer A-Not-T. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA; Zur Bezeichnung der Stämme vgl. Tab. 19.

Die drei Gelbilder der nested SAPD-PCR mit *Dekkera* / *Brettanomyces bruxellensis*-Stämmen (Abb. 26) wurden mit der Software Bio-1D ausgewertet. Die Datenmatrizen, die aus der Auswertung der einzelnen Gelbilder hervorgingen, wurden zu einer Matrix kombiniert (Anhang 8.5.3). Die aus 89 Positionen bestehende Datenmatrix wurde anschließend in NEIGHBOR des PHYLIP-Programmpakets (Felsenstein, 1989) nach der UPGMA-Methode berechnet und in Tree View (Page, 1996) geöffnet und editiert.

Das Ergebnis der Cluster-Analyse mit *Dekkera* / *Brettanomyces bruxellensis*-Stämmen ist in Abb. 27 dargestellt.

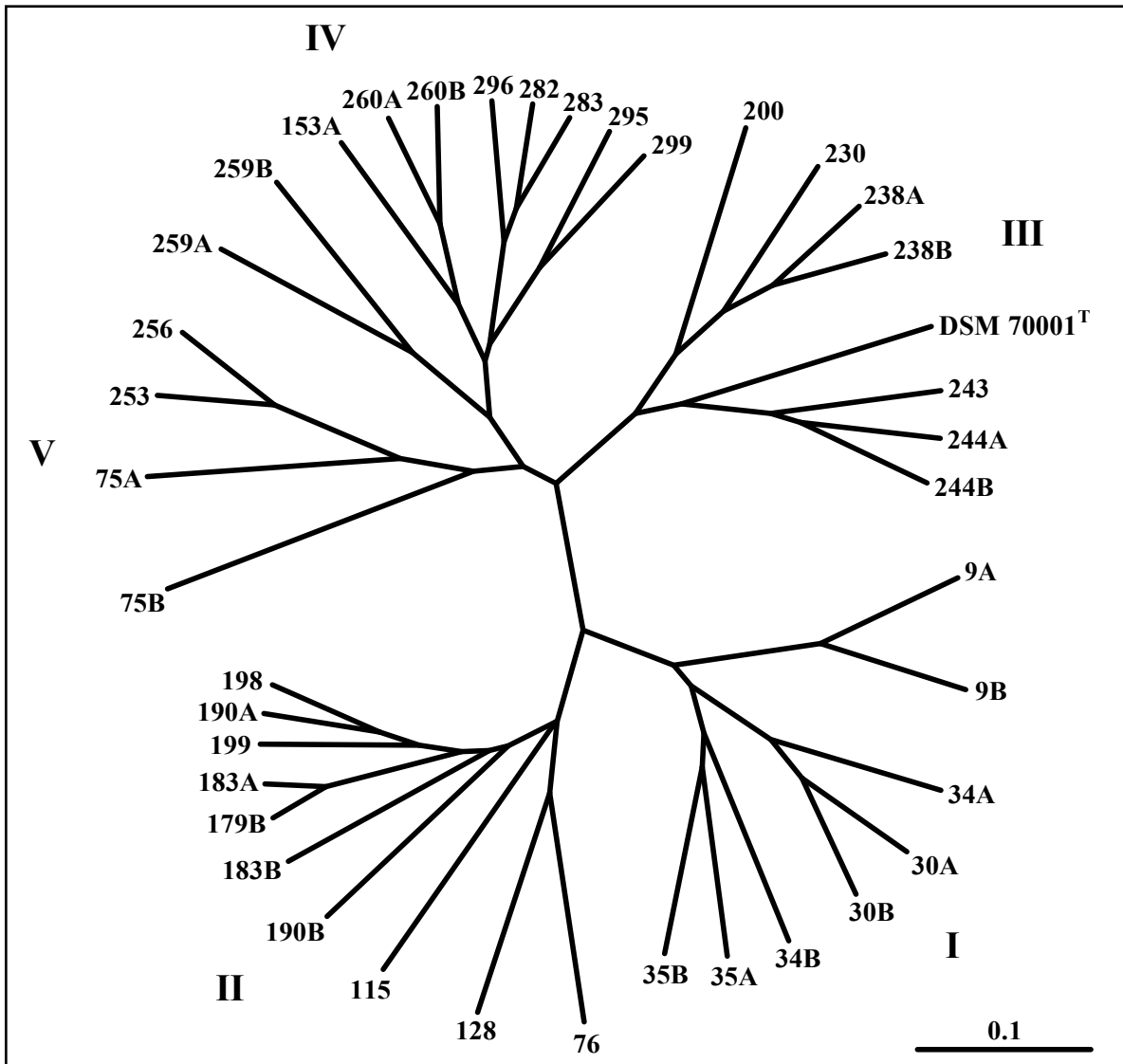


Abb. 27. Cluster-Analyse der *Dekkera* / *Brettanomyces bruxellensis*-Stämme (Tab. 19). Die Stämme wurden in der nested SAPD-PCR unter Verwendung der drei Primer A-Not-C, A-Not-G und A-Not-T untersucht (Abb. 26). Die Unterschiede der Stämme zueinander wurden durch die Auswertung der drei Gelbilder ermittelt. Die Stämme bildeten fünf Cluster (I-V). Der Maßstab entspricht 10 % Merkmalsunterschieden der Bandenmuster in der nested SAPD-PCR.

Die Cluster-Analyse der *Dekkera* / *Brettanomyces bruxellensis*-Stämme durch nested SAPD-PCR zeigte, dass die untersuchten Stämme fünf Clustern (I-V) angehörten. Beim Vergleich der einzelnen Cluster mit der Herkunft der Stämme zeigte sich eine Regionsbezogenheit (Abb. 27 und 28). Cluster I, II und III gehörten Stämme die aus der Region Wonnegau und Nierstein isoliert wurden, an. Der *Dekkera* / *Brettanomyces bruxellensis*-Typstamm (DSM 7001^T) war am nächsten mit den Stämmen aus Cluster III verwandt. Cluster IV bildeten die Stämme der nördlichen Anbauregionen Rheinhessens (Mainz und

Bingen), und von der Nahe (St.153A). Cluster V bildeten zwei Stämme, die aus Weinsberg (Baden-Württemberg) isoliert wurden, zusammen mit zwei Stämmen aus der Region Wonnegau.



Abb. 28. Ergebnis der Untersuchung der regionalen Verbreitung von *Dekkera* / *Brettanomyces bruxellensis*-Stämmen der Weinbauregion Rheinhessen durch Cluster-Analyse. Die Orte, in denen Weinproben mit *Brettanomyces*-Infektion gefunden wurden sind durch rote Punkte markiert.

3.8.7 Differenzierung von Hefen unterschiedlicher Gattungen

Neben der Cluster-Analyse mit Stämmen der Art *Dekkera / Brettanomyces bruxellensis* (Kap. 3.8.6) wurden auch Hefen weiterer Arten durch SAPD-PCR differenziert. Besonders interessant in diesem Zusammenhang war eine Differenzierung der *Saccharomyces*-Arten: *S. cerevisiae*, *S. bayanus* und *S. pastorianus*. Es sollte überprüft werden, ob die in der Literatur beschriebenen Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den drei Hefen durch Cluster-Analyse nachvollzogen werden können. Außerdem sollte untersucht werden, welcher *Saccharomyces*-Art die Sektheften aus Starterkulturen angehörten. Die verschiedenen Hefe-Stämme der Gattungen *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *Pichia anomala* und *Dekkera / Brettanomyces bruxellensis* wurden durch SAPD-PCR unter Verwendung der Primer A-Not, G-Not und T-Not (Tab. 7) untersucht. Die Ergebnisse der SAPD-PCR zur Differenzierung der Hefen unterschiedlicher Gattungen sind in Abb. 29 und 30 dargestellt.

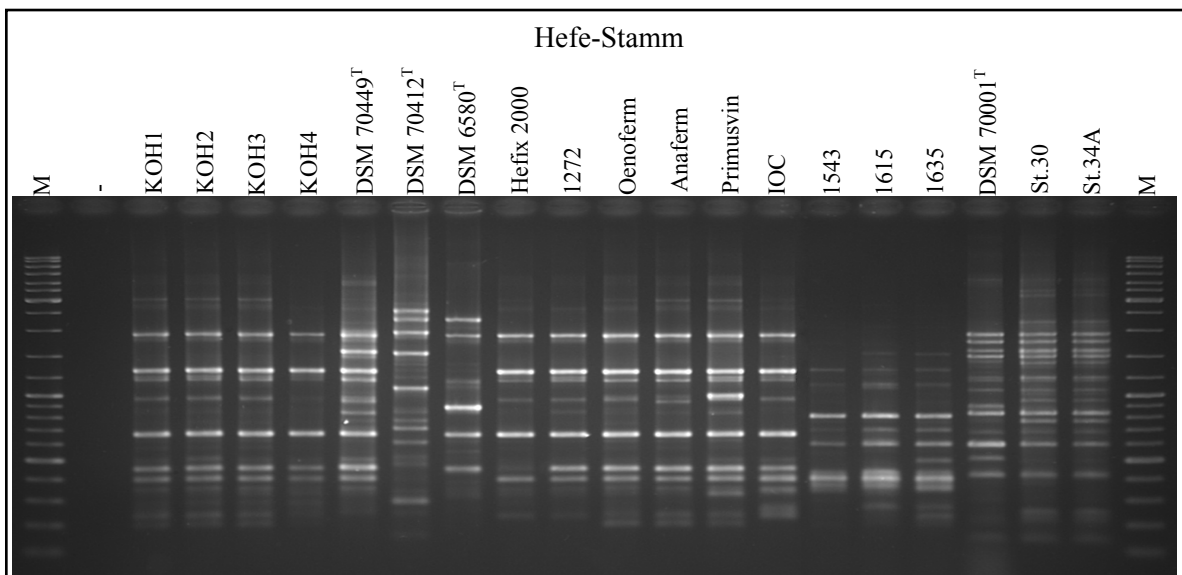


Abb. 29. SAPD-PCR mit Hefe-Stämmen der Gattungen *Saccharomyces*, *Pichia* und *Dekkera / Brettanomyces*. Zur PCR wurde der Primer A-Not verwendet. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA; Stamm KOH1, KOH2, KOH3, KOH4, DSM 70449^T, Hefix 2000, 1272, Oenoferm, Anaferm, Primusvin, IOC: *S. cerevisiae*; DSM 70412^T: *S. bayanus*; DSM 6580^T: *S. pastorianus*; 1543, 1615, 1635: *P. anomala*; DSM 70001^T, St.30, St.34A: *B. bruxellensis*.

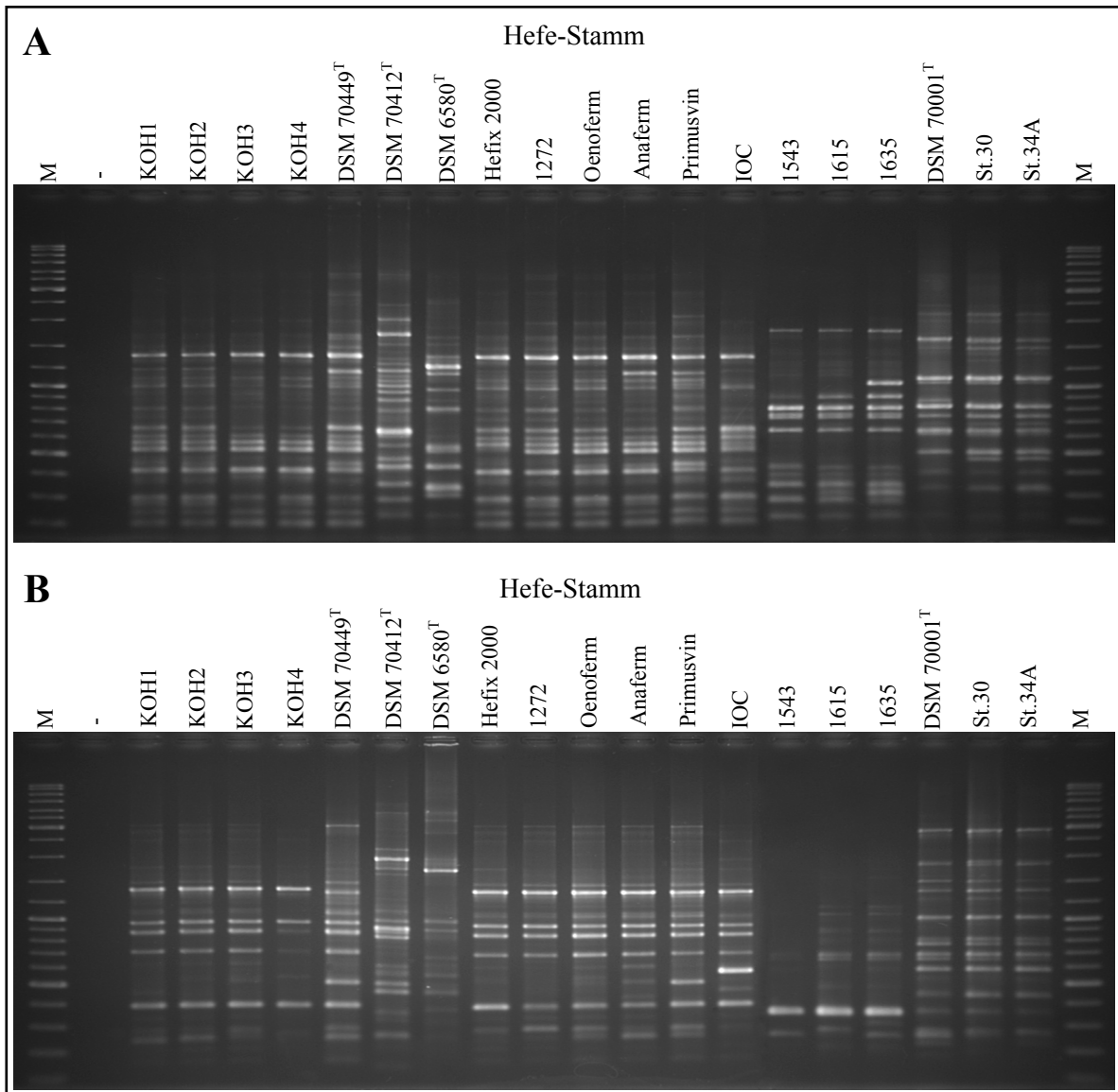


Abb. 30. SAPD-PCR mit Hefe-Stämmen der Gattungen *Saccharomyces*, *Pichia* und *Brettanomyces*. Abbildung A: mit Primer G-Not; Abbildung B: mit Primer T-Not. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA; Stamm KOH1, KOH2, KOH3, KOH4, DSM 70449^T, Hefix 2000, 1272, Oenoferm, Anaferm, Primusvin, IOC: *S. cerevisiae*; DSM 70412^T: *S. bayanus*; DSM 6580^T: *S. pastorianus*; 1543, 1615, 1635: *P. anomala*; DSM 70001^T, St.30, St.34A: *B. bruxellensis*.

Die drei Gelbilder der nested SAPD-PCR mit Hefe-Stämmen unterschiedlicher Arten (Abb. 29 und 30) wurden mit der Software Bio-1D ausgewertet. Die Datenmatrizen, die aus der Auswertung der einzelnen Gelbilder hervorgingen, wurden zu einer Matrix kombiniert (Anhang 8.5.4). Die aus 147 Positionen bestehende Datenmatrix wurde anschließend in NEIGHBOR des PHYLIP-Programmpakets (Felsenstein, 1989) nach der UPGMA-Methode berechnet und in Tree View (Page, 1996) geöffnet und editiert. Das Ergebnis der Cluster-Analyse mit Hefe-Stämmen unterschiedlicher Arten ist in Abb. 31 dargestellt.

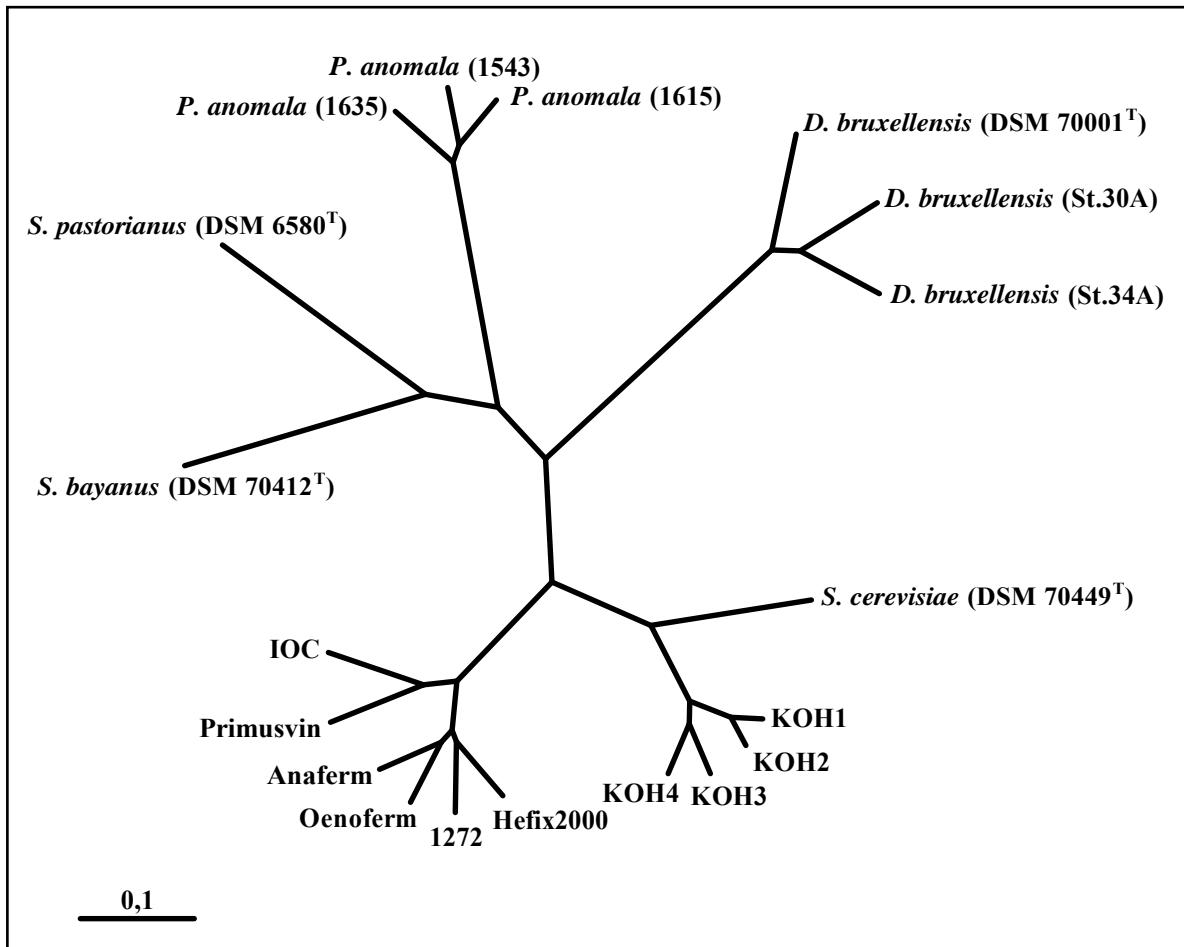


Abb. 31. Cluster-Analyse der Hefe-Stämme unterschiedlicher Gattungen. Die Stämme wurden in der SAPD-PCR unter Verwendung der drei Primer A-Not, G-Not und T-Not untersucht (Abb. 29 und 30). Die Unterschiede der Stämme zueinander wurden durch die Auswertung der drei Gelbilder ermittelt. Der Maßstab entspricht 10 % Merkmalsunterschieden der Bandenmuster in der nested SAPD-PCR. Zur Stammbezeichnung siehe Tab. 18 und 19.

Durch SAPD-PCR und Cluster-Analyse konnten alle Hefe-Stämme differenziert werden. Es bildeten sich sechs Cluster der untersuchten Stämme der fünf Hefe-Arten. Innerhalb der *S. cerevisiae*-Stämme konnten zwei Cluster beobachtet werden. Die Sekthefen aus der institutseigenen Kulturensammlung (KOH1-4) waren am nächsten mit der Spezies *Saccharomyces cerevisiae* (DSM 70449^T) verwandt. Die übrigen *S. cerevisiae*-Stämme der Firmen Erbslöh, ZEFÜG und Gon-Cruz befanden sich auf dem zweiten Cluster gemeinsam mit Stamm 1272 aus der institutseigenen Kulturensammlung. Die Stämme der drei unterschiedlichen *Saccharomyces*-Arten *S. cerevisiae* (DSM 70449^T), *S. bayanus* (DSM 70412^T) und *S. pastorianus* (DSM 6580^T) konnten differenziert werden. Dabei war die Hefe *S. bayanus* näher mit *S. pastorianus* verwandt, während zu *S. cerevisiae* eine höhere genetische Distanz bestand.

3.8.8 *Pediococcus parvulus*- und *Brettanomyces bruxellensis*-Isolate aus denselben Weinproben

Aus neun der untersuchten Weinproben konnten jeweils *P. parvulus*-Stämme und Hefestämme der Gattung *Dekkera* / *Brettanomyces bruxellensis* isoliert werden. Die beiden Arten können an der Umsetzung von Verbindungen aus Wein beteiligt sein, dessen Endprodukte mitunter die Verbindungen 4-Ethylphenol, 4-Ethylguajacol, Catechol, Isovalerinsäure und andere sind (Chatonnet et al., 1995; Dias et al., 2003). Die Stämme beider Arten wurden durch nested SAPD-PCR untersucht und die resultierenden DNA Fingerprint-Bandenmuster durch Cluster-Analyse ausgewertet.

Ergebnisse der (nested) SAPD-PCR mit *P. parvulus*

Die Differenzierung der *P. parvulus*-Stämme durch SAPD-PCR erfolgte unter Verwendung des Primers A-Not (Tab. 7). Das PCR-Produkt der SAPD-PCR wurde anschließend als Template-DNA für die nested SAPD-PCR verwendet. Es wurden drei nested PCR-Ansätze mit den Primern A-Not-C, A-Not-G und A-Not-T (Tab. 7) durchgeführt. In den Abbildungen 32 und 33 sind die Ergebnisse der nested SAPD-PCR mit *Pediococcus parvulus*-Stämmen dargestellt.

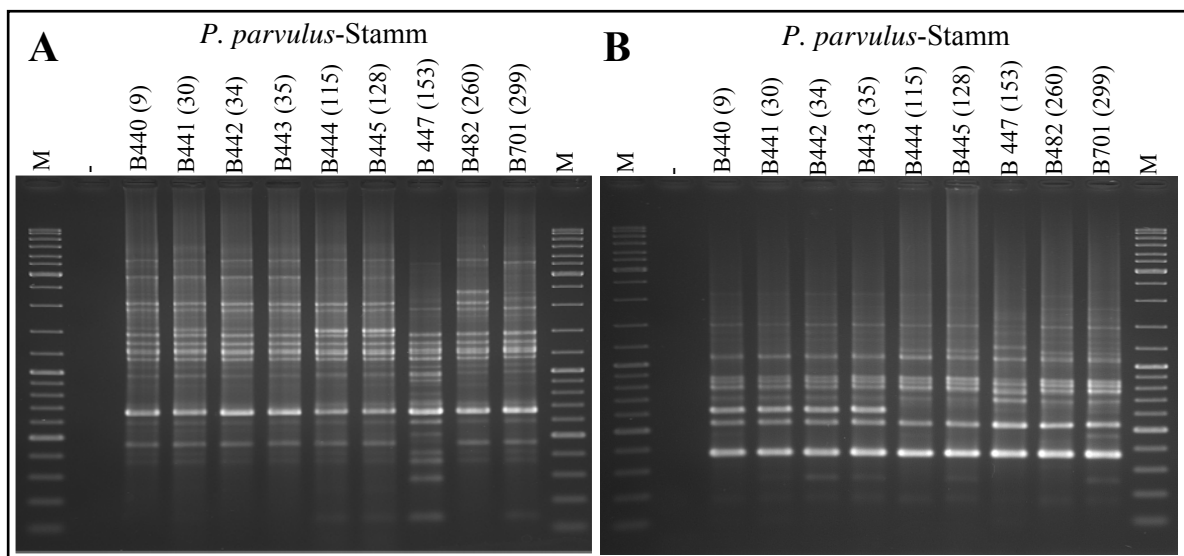


Abb. 32. Ergebnisse der nested SAPD-PCR zur Cluster-Analyse von *P. parvulus*-Stämmen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Abbildung A: SAPD-PCR mit Primer A-Not. Abbildung B: Nested SAPD-PCR mit Primern A-Not-C. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA. Die Nummerierung in Klammern bezieht sich auf die Weinproben, aus denen die Stämme isoliert wurden.

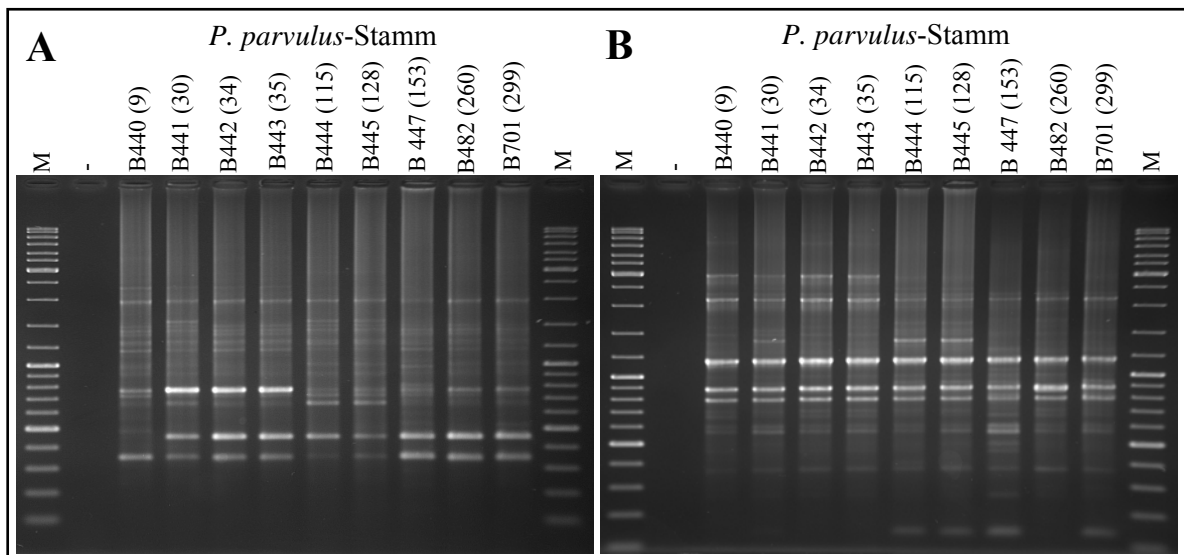


Abb. 33. Ergebnisse der nested SAPD-PCR zur Cluster-Analyse von *P. parvulus*-Stämmen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Abbildung A: Nested SAPD-PCR mit Primer A-Not-G. Abbildung B: Nested SAPD-PCR mit Primer A-Not-T. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA. Die Nummerierung in Klammern bezieht sich auf die Weinproben, aus denen die Stämme isoliert wurden.

Ergebnisse der (nested) SAPD-PCR mit *Dekkera / Brettanomyces bruxellensis*

Für die Untersuchung der *Dekkera / Brettanomyces bruxellensis*-Stämme durch nested SAPD-PCR wurden die gleichen Primer verwendet, die auch zur Untersuchung der *P. parvulus*-Stämme verwendet wurden. In den Abbildungen 34 und 35 sind die Ergebnisse der (nested) SAPD-PCR mit den *Dekkera / Brettanomyces bruxellensis*-Stämmen dargestellt.

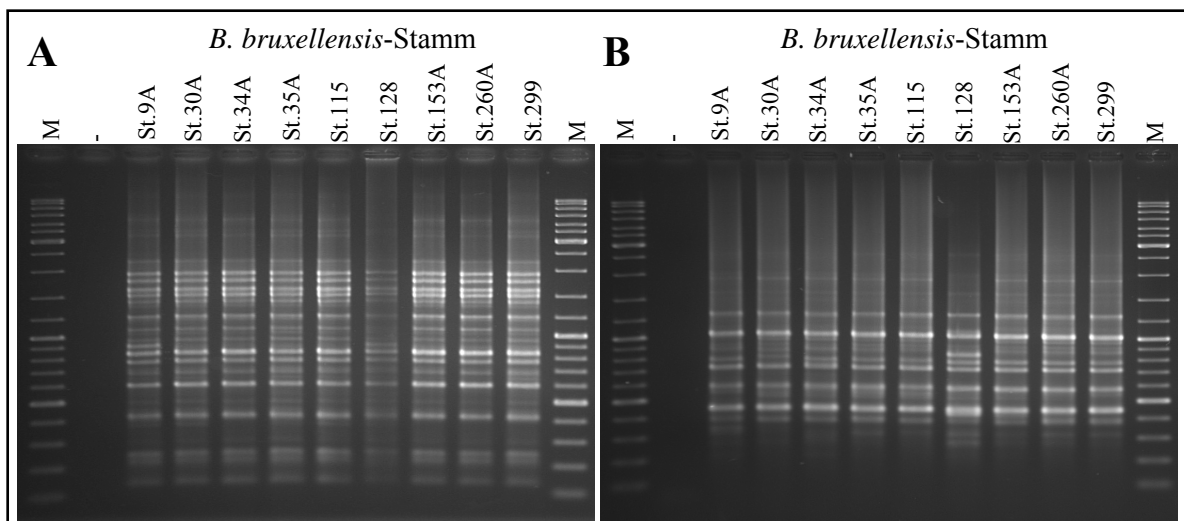


Abb. 34. Ergebnisse der nested SAPD-PCR zur Cluster-Analyse von *Dekkera / B. bruxellensis*-Stämmen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Abbildung A: SAPD-PCR mit Primer A-Not. Abbildung B: Nested SAPD-PCR mit Primer A-Not-C. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA.

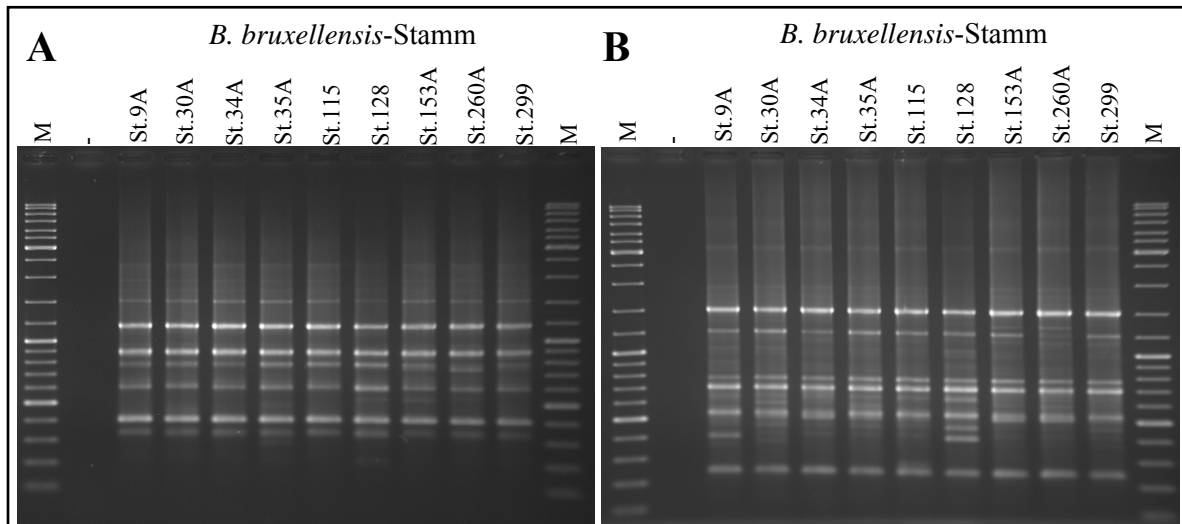


Abb. 35. Ergebnisse der nested SAPD-PCR zur Cluster-Analyse von *Dekkera* / *B. bruxellensis*-Stämmen. Abbildung A: Nested SAPD-PCR mit Primer A-Not-G. Abbildung B: Nested SAPD-PCR mit Primer A-Not-T. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA.

Für die Cluster-Analysen wurden jeweils die drei Gelbilder der nested SAPD-PCR beider Arten mit der Software Bio-1D ausgewertet. Die Datenmatrizen, die aus der Auswertung der einzelnen Gelbilder hervorgingen, wurden zu je einer Matrix kombiniert. So entstand eine Datenmatrix zur Cluster-Analyse der *P. parvulus*-Stämme mit 56 Positionen, und eine Datenmatrix zur Cluster-Analyse der *Dekkera* / *Brettanomyces bruxellensis*-Stämme mit 89 Positionen (Anhang 8.5.5). Die Datenmatrizen wurden anschließend in NEIGHBOR des PHYLIP-Programmpakets (Felsenstein, 1989) nach der Neighbor Joining Methode berechnet und in Tree View (Page, 1996) geöffnet und editiert. Die Stammbäume, die aus der Cluster-Analyse mit *Pediococcus parvulus*- und *Dekkera* / *Brettanomyces bruxellensis*-Stämmen resultierten, wurden zum Vergleich der Baum-Topologien gegenüber gestellt. Außerdem wurde die Herkunft der untersuchten Weinproben in die Karte des Weinanbaugebiets Rheinhessen eingezeichnet (Abb. 36).

Der Vergleich der Baum-Topologien beider Arten zeigte, dass die einzelnen Stämme beider Arten eine fast identische Verwandtschaft aufwiesen. Nur im Fall der Stämme aus den Weinproben 9 und 30 waren die Verwandtschaftsverhältnisse nicht identisch. Bei der Untersuchung der Herkunft der neu isolierten *P. parvulus*- und *B. bruxellensis*-Stämmen fiel auf, dass die Stämme zwei Cluster bildeten: Ein Cluster mit den Stämmen aus den nördlichen Anbaugebieten Rheinhessens (Region Mainz und Bingen) und von der Nahe, und ein Cluster mit den Stämmen aus den südlichen Anbaugebieten (Region Wonnegau und Nierstein).

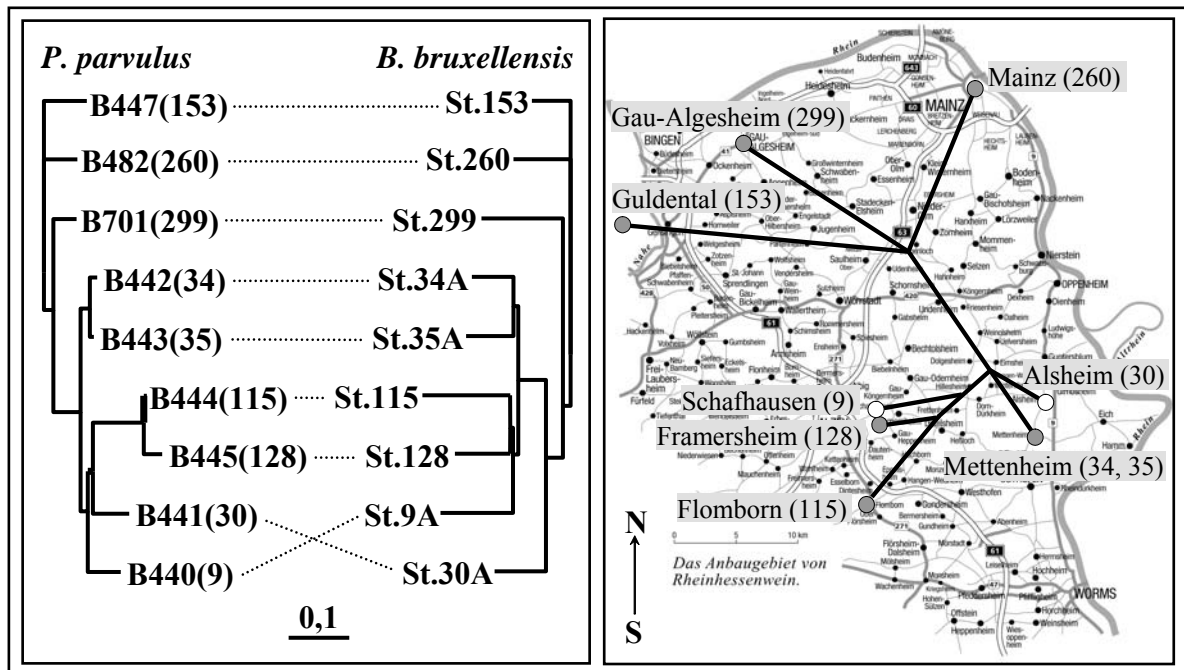


Abb. 36. Ergebnisse der Cluster-Analyse mit *P. parvulus*- und *Dekkera / Brettanomyces bruxellensis*-Stämmen aus denselben Weinproben. Abbildung links: Vergleich der Baum-Topologien beider Arten. Der Maßstab entspricht 10 % Merkmalsunterschiede der Bandenmuster in der nested SAPD-PCR. Abbildung rechts: Herkunft der untersuchten Weinproben aus dem Weinanbaugebiet Rheinhessen und von der Nahe. Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die untersuchten Weinproben.

3.8.9 Differenzierung verschiedener Weinreben

Die bisher genetisch nicht differenzierbaren Unterlagsreben SO4 und Binova waren durch SAPD-PCR unterscheidbar. Sowohl die SO4- als auch die Burgunder-Klone zeigten ein für die jeweilige Sorte charakteristisches DNA Fingerprint-Bandenmuster (Abb. 37).

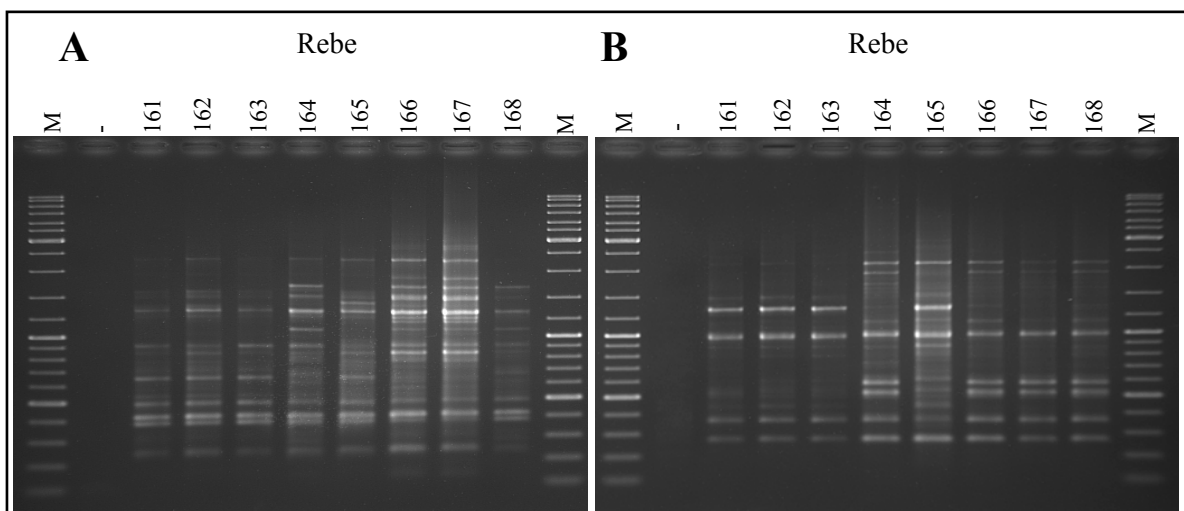


Abb. 37. Ergebnisse der SAPD-PCR mit Weinreben. Abbildung A: SAPD-PCR mit Primer C-Not. Abbildung B: SAPD-PCR mit Primer G-Not. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA. Probe 161, 162 und 163: Unterlagsrebe SO4; 165: Unterlagsrebe Binova; Probe 164, 166, 167 und 168: Spätburgunder.

Durch nested SAPD-PCR konnten auch Unterschiede zwischen den einzelnen SO4-Klonen (161, 162, 163) und innerhalb der Burgunder-Klone (kleinbeerig: 164, kompakt: 166, aufrecht: 167, lockerbeerig: 168) generiert werden (Abb. 38 und Abb. 39).

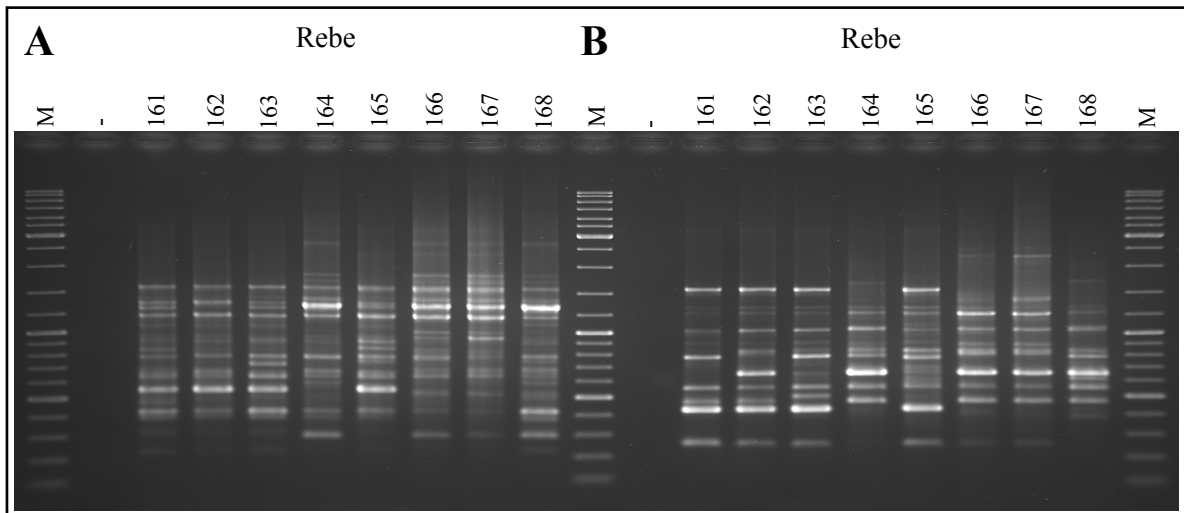


Abb. 38. Ergebnisse der nested SAPD-PCR mit Weinreben. Abbildung A: Nested SAPD-PCR mit Primer C-Not-C. Abbildung B: Nested SAPD-PCR mit Primer C-Not-T. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA. Probe 161, 162 und 163: Unterlagsrebe SO4; 165: Unterlagsrebe Binova; Probe 164, 166, 167 und 168: Spätburgunder.

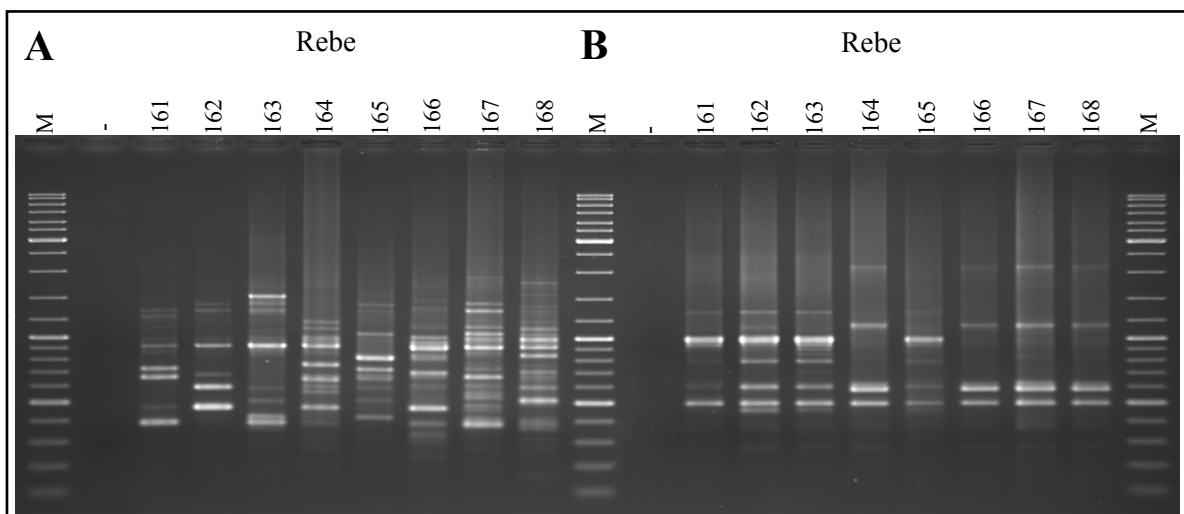


Abb. 39. Ergebnisse der nested SAPD-PCR mit Weinreben. Abbildung A: Nested SAPD-PCR mit Primer G-Not-C. Abbildung B: Nested SAPD-PCR mit Primer G-Not-G. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA. Probe 161, 162 und 163: Unterlagsrebe SO4; 165: Unterlagsrebe Binova; Probe 164, 166, 167 und 168: Spätburgunder.

Durch nested SAPD-PCR konnten geringe Unterschiede im Genom von Weinreben detektiert werden. Dadurch kann eine sichere Identifizierung verschiedener Weinreben ermöglicht werden. Somit kann die nested SAPD-PCR zur Analyse der Abstammung von Züchtungen und der Aufklärung der Verwandtschaftsverhältnisse verwendet werden.

3.8.10 Cluster-Analyse mit Mäusen

Zur Überprüfung, ob die nested SAPD-PCR auch zur Unterscheidung verschiedener Mäuse (*Mus musculus*) geeignet ist, wurde eine PCR mit Primer C-Not durchgeführt (Abb. 40). Anschließend erfolgte die nested SAPD-PCR mit den Primern C-Not-A, C-Not-C, C-Not-G und C-Not-T (Abb. 41).

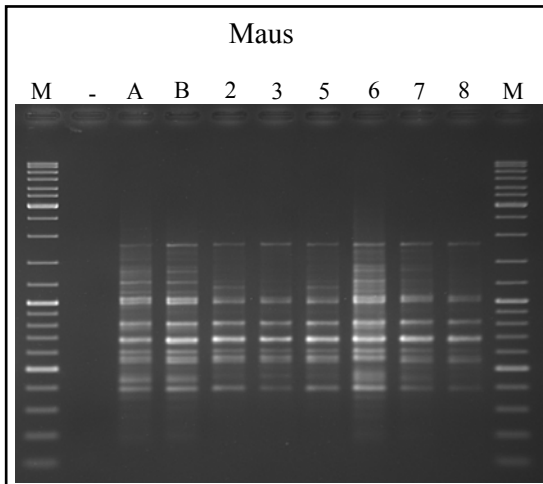


Abb. 40. SAPD-PCR zur Analyse von Mäusen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Zur PCR wurde der Primer A-Not verwendet. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA.

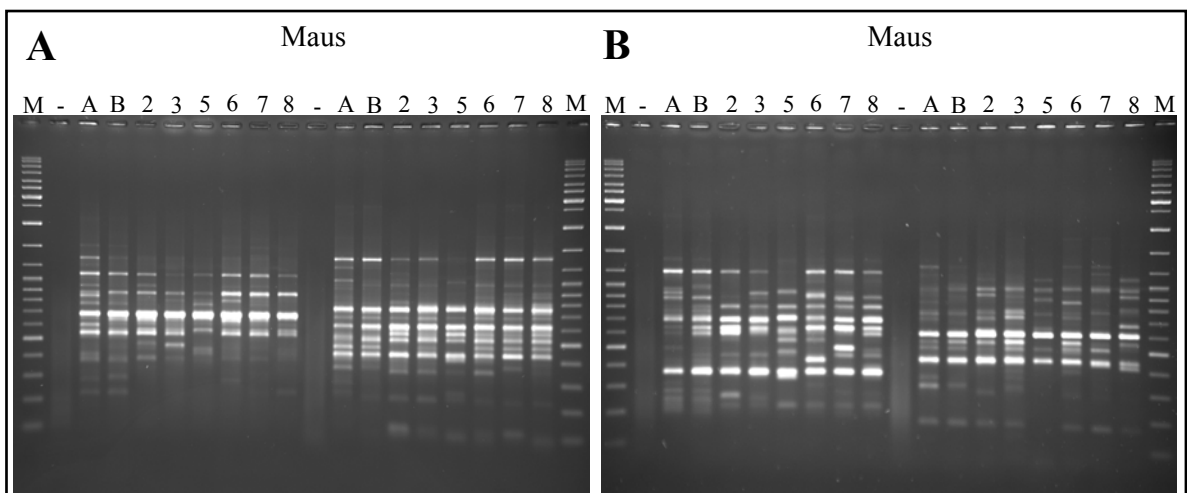


Abb. 41. Nested SAPD-PCR zur Analyse von Mäusen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Abbildung A: Nested SAPD-PCR mit Primer C-Not-A (Block links) und C-Not-C (Block rechts). Abbildung B: Nested SAPD-PCR mit Primer C-Not-G (Block links) und C-Not-T (Block rechts). M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA.

Die Gelbilder der nested SAPD-PCR mit unterschiedlichen Mäusen (Abb. 41) wurden mit der Software Bio-1D ausgewertet. Die Datenmatrizen, die aus der Auswertung der Gelbilder hervorgingen, wurden zu einer Matrix kombiniert (Anhang 8.5.6). Die aus 207 Positionen bestehende Datenmatrix wurde anschließend in NEIGHBOR des PHYLIP-Programmpakets (Felsenstein, 1989) nach der Neighbor Joining Methode berechnet und in

Tree View (Page, 1996) geöffnet und editiert. Das Ergebnis der Cluster-Analyse mit Mäusen ist in Abb. 42 dargestellt.

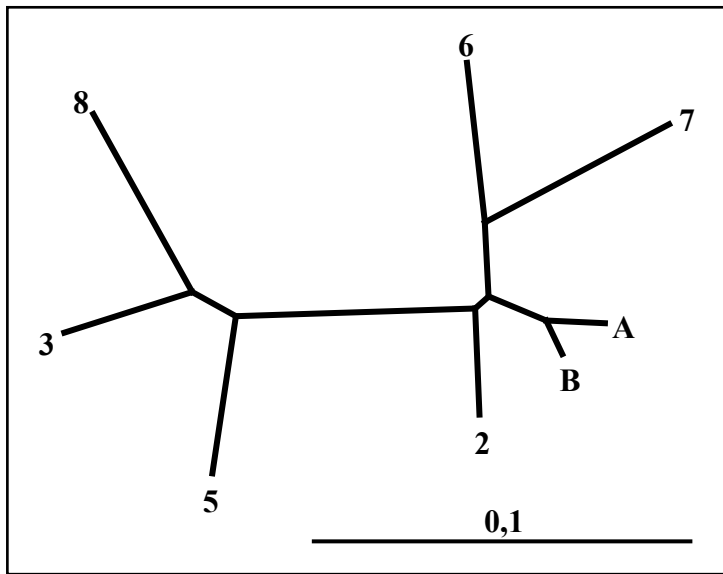


Abb. 42. Cluster-Analyse mit Labormäusen (*Mus musculus*). Der Stammbaum beruht auf der Auswertung der Gelbilder, die durch nested SAPD-PCR mit den Primern C-Not-A, C-Not-C, C-Not-G, C-Not-T (Abb. 41) generiert wurden. Der Maßstab entspricht 10 % Merkmalsunterschieden der Bandenmuster in der nested SAPD-PCR.

Die nested SAPD-PCR konnte die sichere Zuordnung der verschiedenen Labormäuse gewährleisten. Als nächster Verwandter zu dem Mäusepaar A und B konnte Maus 2 bestätigt werden.

3.8.11 Cluster-Analyse menschlicher Individuen

Durch nested SAPD-PCR und anschließender Cluster-Analyse mit DNA aus menschlichen Blutzellen wurde die Verwandtschaft von 13 Probanden zueinander ermittelt. Bei vorhergehenden Versuchen mit DNA aus Mundschleimhautzellen wurde gezeigt, dass die Methode die echten Verwandtschaftsverhältnisse nicht ausreichend zuverlässig wiedergibt. Die hohe Belastung der Zellen mit adhärenen Bakterien sorgte bei der DNA-Präparation für eine starke Verunreinigung der humanen DNA. Daher war eine Analyse basierend auf der Präparation von Blut besser geeignet.

Zunächst wurde die SAPD-PCR mit den Primern A-Not und C-Not (Tab. 7) durchgeführt. Anschließend wurden die PCR-Produkte der ersten PCR als Template-DNA in einer nested PCR mit den vier Primern A-Not-A, A-Not-G, C-Not-A und C-Not-G (Tab. 7) amplifiziert. Die Ergebnisse der nested SAPD-PCR sind in Abb. 43 dargestellt.

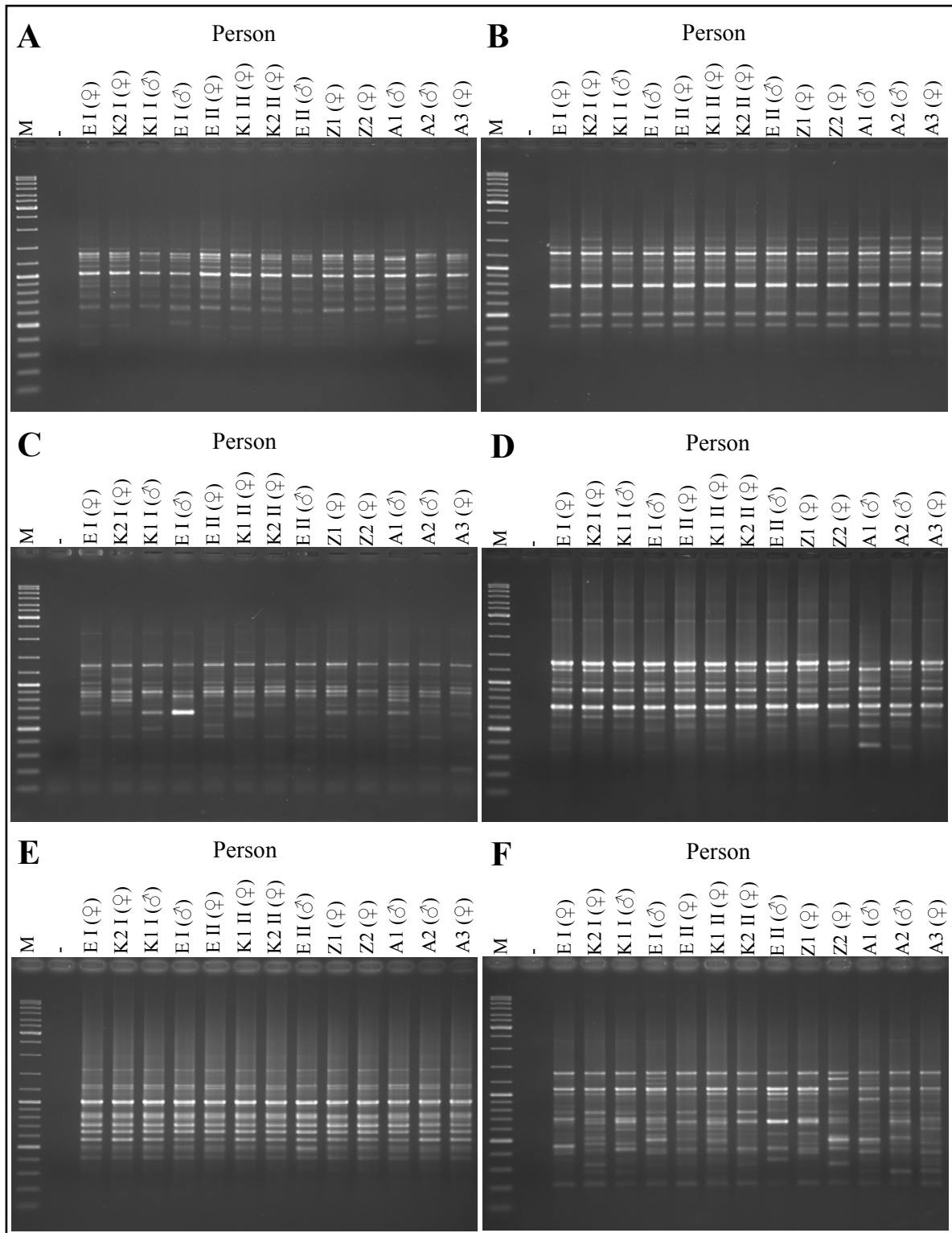


Abb. 43. Nested SAPD-PCR zur Analyse menschlicher DNA aus Blut nach gelelektrophoretischer Auftrennung. SAPD-PCR mit Primer A-Not (Abbildung A) und Primer C-Not (Abbildung B). Nested SAPD-PCR mit Primer A-Not-A (Abbildung C), A-Not-G (Abbildung D), C-Not-A (Abbildung E) und C-Not-G (Abbildung F). M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA. Zur Bezeichnung der Proben vgl. Tab. 21.

Die Gelbilder der nested SAPD-PCR mit menschlicher DNA (Abb. 43 C-F) wurden mit der Software Bio-1D ausgewertet. Die Datenmatrizen, die aus der Auswertung der Gelbilder hervorgingen, wurden zu einer Matrix kombiniert (Anhang 8.5.7). Die aus 255 Positionen bestehende Datenmatrix wurde anschließend in NEIGHBOR des PHYLIP-Programmpakets (Felsenstein, 1989) nach der Neighbor Joining Methode berechnet und in Tree View (Page, 1996) geöffnet und editiert. Das Ergebnis der Cluster-Analyse mit menschlicher DNA aus Blutzellen ist in Abb. 44 dargestellt.

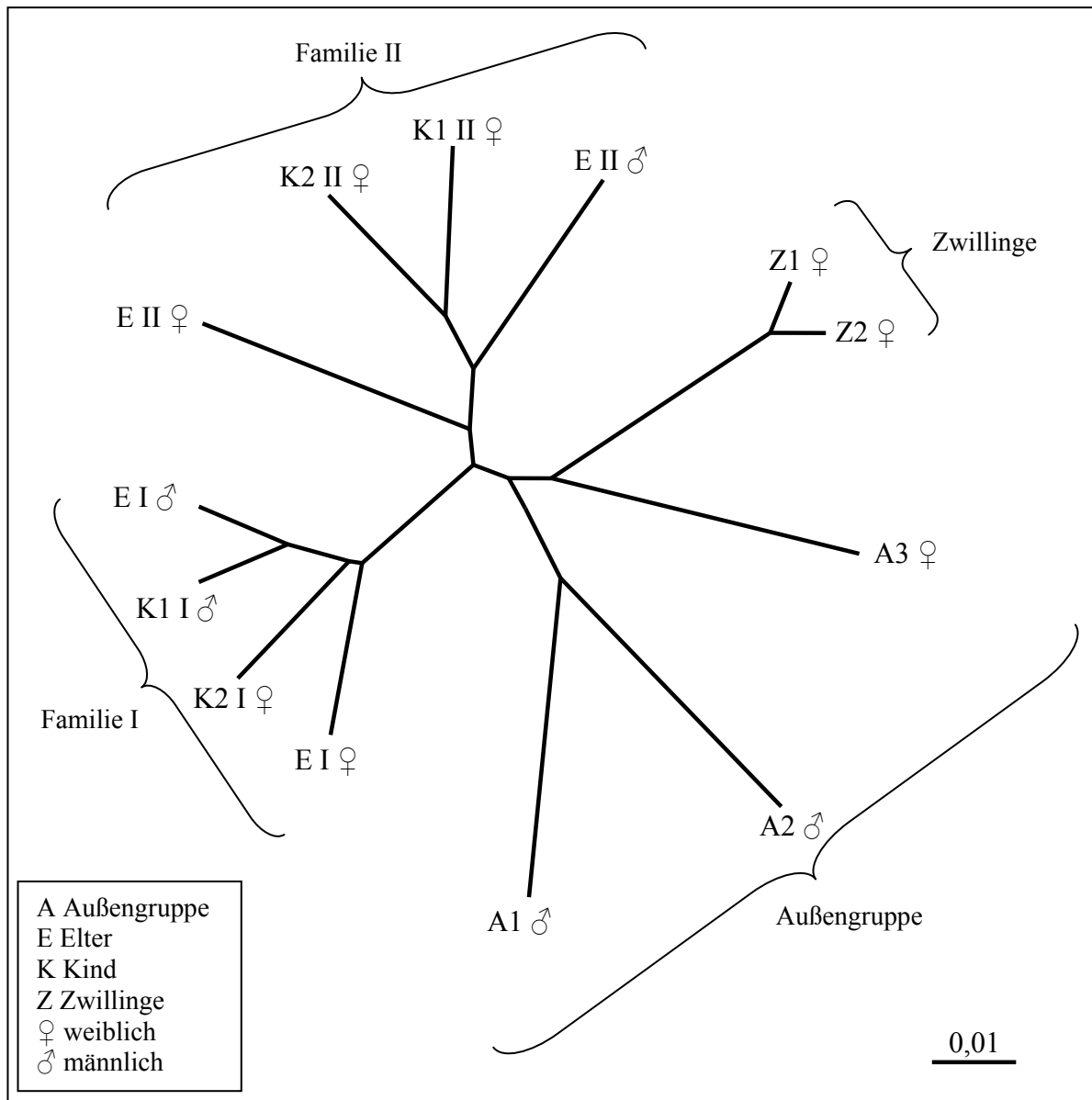


Abb. 44. Cluster-Analyse der untersuchten menschlichen Blutproben. Die Proben wurden in der SAPD-PCR unter Verwendung der vier Primer A-Not-A, A-Not-G, C-Not-A und C-Not-G untersucht (Abb. 43 C-F). Die Unterschiede der Probanden zueinander wurden durch die Auswertung der vier Gelbilder ermittelt. Der Maßstab entspricht 1 % Merkmalsunterschieden der Bandenmuster in der nested SAPD-PCR.

Durch nested SAPD-PCR und Cluster-Analyse konnten die Verwandtschaftsverhältnisse der beiden untersuchten Familien bestätigt werden. Dabei war die Person E I (♂) der Vater von K1 I (♂) und K2 I (♀) und der Bruder von Person E II (♀). Person E I (♀) war die Mutter von K1 I (♂) und K2 I (♀). Person E II (♂) war der Vater von den Personen K1 II (♀) und K2 II (♀). Person E II (♀) die Mutter von K1 II (♀) und K2 II (♀) und die Schwester von Person E I (♂). Daneben wurden die im Folgenden genannten, außenstehenden Personen mit in die Verwandtschaftsanalyse einbezogen. Die eineiigen Zwillinge Z1 (♀) und Z2 (♀) und die Personen A1 (♂), A2 (♂) und A3 (♀). Diese Personen grenzten sich deutlich von den beiden Familien ab. Geringe Unterschiede konnten beim Vergleich der Zwillinge (Z1 (♀) und Z2 (♀)) beobachtet werden.

3.9 Art-Identifizierung durch SCAR-PCR

Für die folgenden Milchsäurebakterien-Spezies wurden SCAR-Marker generiert, die zur Artidentifizierung verwendet werden konnten: *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, *P. inopinatus*, *L. hilgardii*, *P. acidilactici* und *L. mesenteroides*.

3.9.1 Generieren artspezifischer SCAR-Marker

Die (nested) SAPD-PCR (Pfannebecker, 2005; Pfannebecker & Fröhlich 2006, 2007) wurde verwendet, um geeignete SCAR-Marker (Paran & Michelmore, 1993) zur Artidentifizierung von weinschädlichen Milchsäurebakterien aufzufinden. Dazu wurden von jeder Art mehrere Stämme mit verschiedenen Primern untersucht. In den folgenden Abbildungen (Abb. 45-51) sind die Ergebnisse der (nested) SAPD-PCR der sieben untersuchten Milchsäurebakterien-Arten dargestellt. Die Gelbanden, die ausgeschnitten und kloniert wurden, sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet.

Pediococcus parvulus

Die Verwendung des Primers G-Not-T (Tab. 7) in der nested SAPD-PCR führte zur Generierung eines 539 bp großen SCAR-Markers, der bei allen untersuchten *P. parvulus*-Stämmen vorhanden war (Abb. 45).

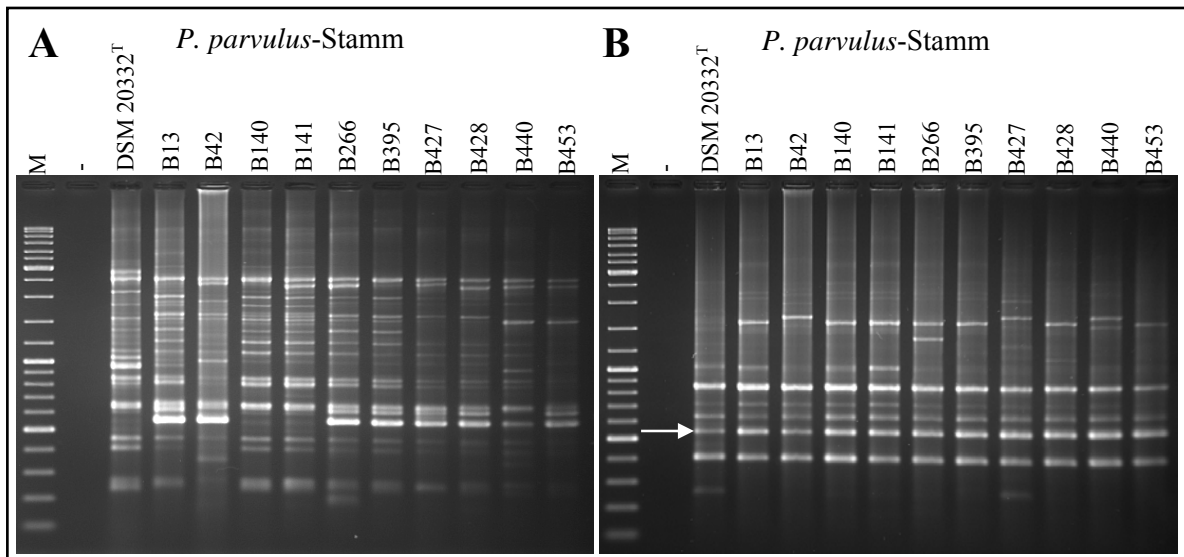


Abb. 45. Nested SAPD-PCR zur Analyse von *P. parvulus*-Stämmen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Abbildung A: SAPD-PCR mit Primer G-Not. Abbildung B: Nested SAPD-PCR mit den PCR-Produkten aus der 1. PCR unter Verwendung des Primers G-Not-T. Der weiße Pfeil zeigt die 539 bp Gelbände, die als SCAR-Marker verwendet wurde. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA. Zur Bezeichnung der Stämme vgl. Tab. 10-12.

Pediococcus pentosaceus

Primer C-Not-G (Tab. 7) führte in der nested SAPD-PCR zur Generierung eines 527 bp großen SCAR-Markers, der bei allen untersuchten Stämmen der Spezies *P. pentosaceus* vorhanden war (Abb. 44).

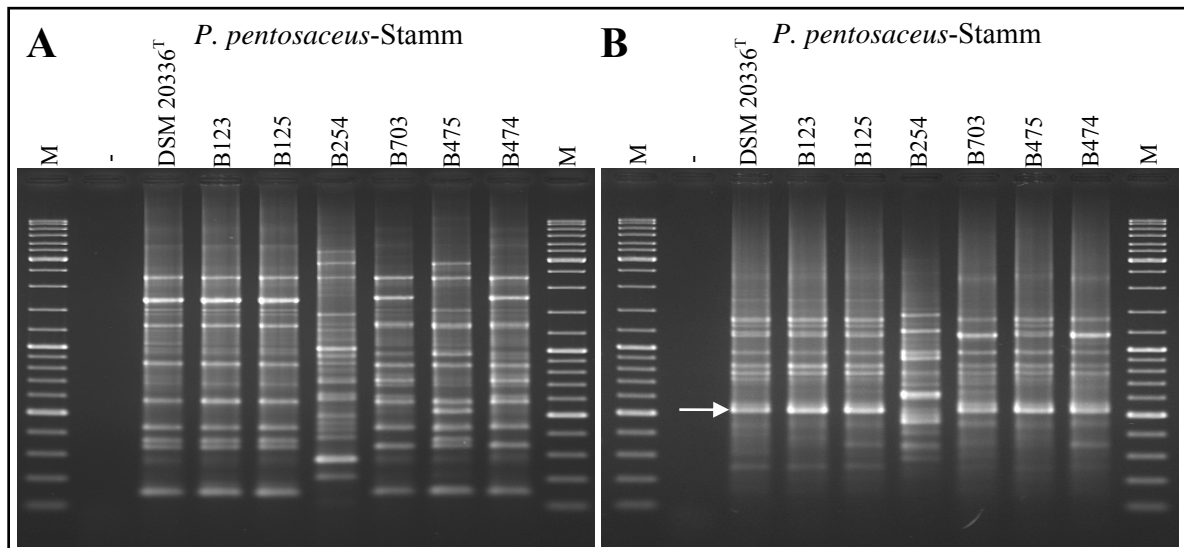


Abb. 46. Nested SAPD-PCR mit Primer C-Not zur Analyse von *P. pentosaceus*-Stämmen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Abbildung A: SAPD-PCR mit Primer C-Not. Abbildung B: Nested SAPD-PCR mit den PCR-Produkten aus der 1. PCR unter Verwendung des Primers C-Not-G. Der weiße Pfeil zeigt die 527 bp Gelbände, die ausgeschnitten wurde. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA. Zur Bezeichnung der Stämme vgl. Tab. 10, 11 und 15.

Pediococcus damnosus

Die Verwendung des Primers C-Not-C (Tab. 7) in der nested SAPD-PCR führte zur Generierung eines 712 bp großen SCAR-Markers, der bei allen untersuchten *P. damnosus*-Stämmen vorhanden war (Abb. 47).

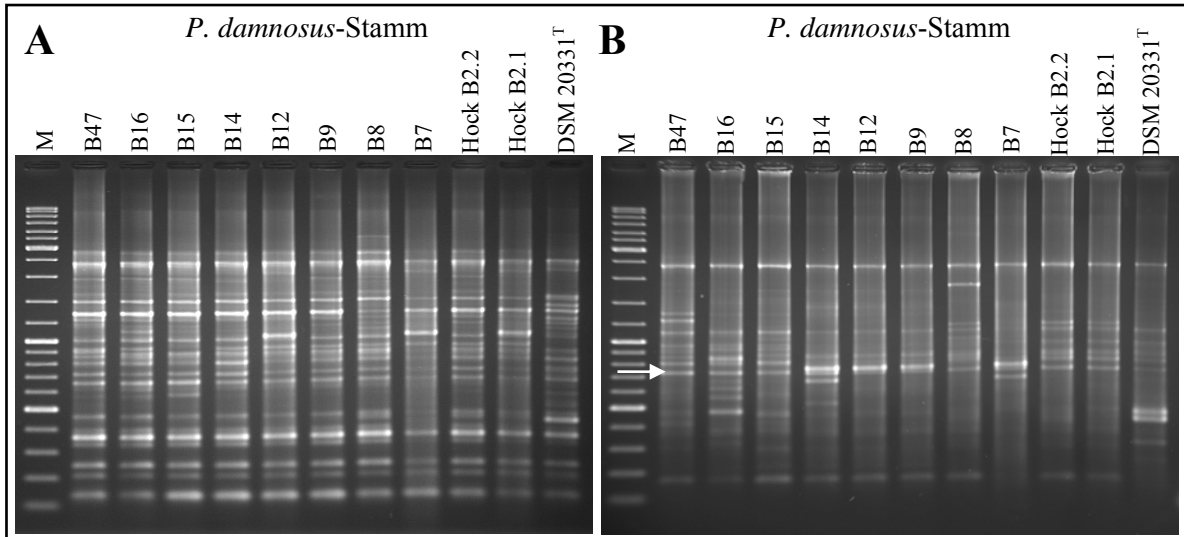


Abb. 47. Nested SAPD-PCR zur Analyse von *P. damnosus*-Stämmen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Abbildung A: SAPD-PCR mit Primer C-Not. Abbildung B: Nested SAPD-PCR mit den PCR-Produkten aus der 1. PCR unter Verwendung des Primers C-Not-C. Der weiße Pfeil zeigt die 712 bp Gelbande, die ausgeschnitten wurde. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA. Zur Bezeichnung der Stämme vgl. Tab. 10 und 11.

Pediococcus inopinatus

Primer C-Not-T (Tab. 7) führte in der nested SAPD-PCR zur Generierung eines 668 bp großen SCAR-Markers, der bei den beiden *P. inopinatus*-Stämmen vorhanden war (Abb. 48).

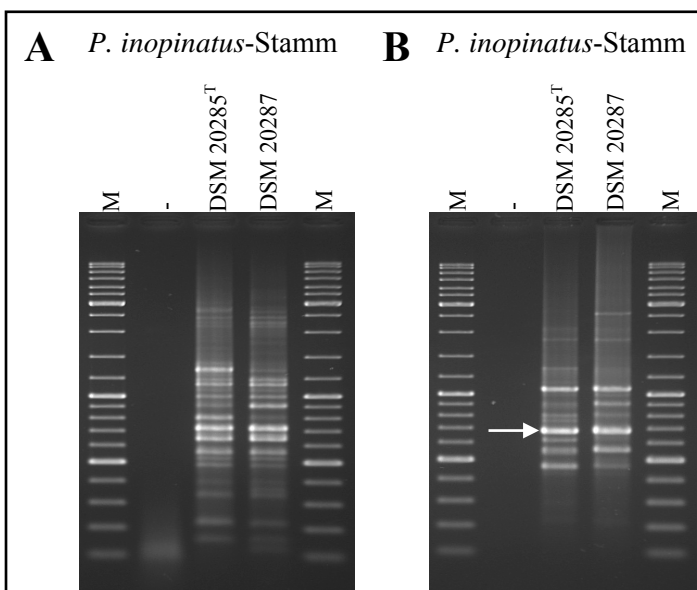


Abb. 48. Nested SAPD-PCR zur Analyse von *P. inopinatus*-Stämmen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Abbildung A: SAPD-PCR mit Primer C-Not. Abbildung B: Nested SAPD-PCR mit den PCR-Produkten aus der 1. PCR und Primer C-Not-T. Der weiße Pfeil zeigt die 668 bp Gelbande, die ausgeschnitten wurde. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA; DSM 20285^T und DSM 20287: *P. inopinatus*.

Lactobacillus hilgardii

Die Verwendung des Primers T-Not (Tab. 7) in der SAPD-PCR führte zur Generierung eines 815 bp großen SCAR-Markers, der bei allen untersuchten *L. hilgardii*-Stämmen vorhanden war (Abb. 49).

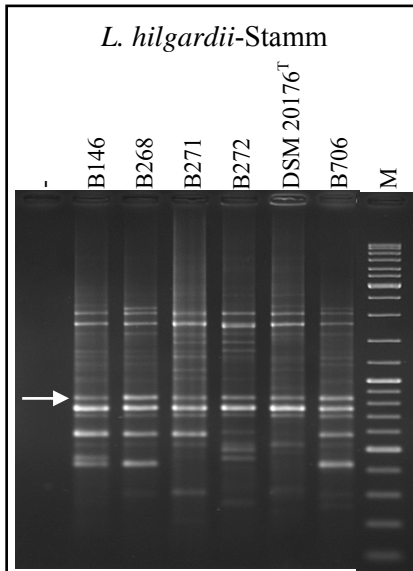


Abb. 49. SAPD-PCR mit Primer T-Not zur Analyse von *L. hilgardii*-Stämmen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Der weiße Pfeil zeigt die 815 bp Gelbande, die ausgeschnitten wurde. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA; Stamm B146, B268, B271, B272, DSM 20176^T und B706: *L. hilgardii*.

Pediococcus acidilactici

Primer G-Not-T (Tab. 7) führte in der nested SAPD-PCR zur Generierung eines 914 bp großen SCAR-Markers, der bei den vier untersuchten *P. acidilactici*-Stämmen vorhanden war (Abb. 50).

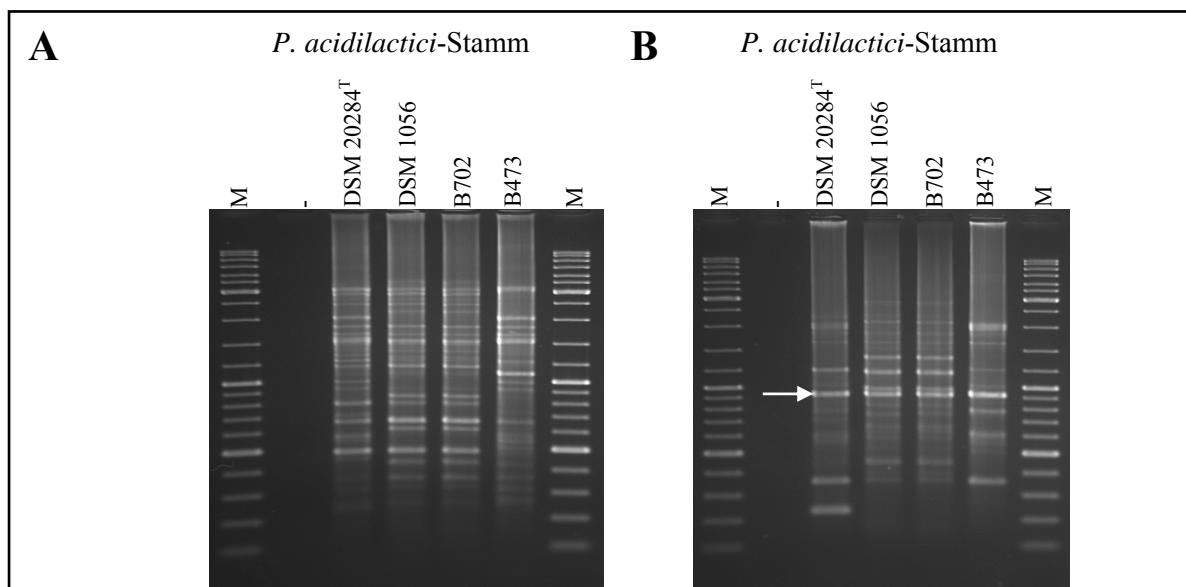


Abb. 50. Nested SAPD-PCR zur Analyse von *P. acidilactici*-Stämmen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Abbildung A: SAPD-PCR mit Primer G-Not. Abbildung B: Nested SAPD-PCR mit den PCR-Produkten der 1. PCR und Primer G-Not-T. Der weiße Pfeil zeigt die 914 bp Gelbande, die ausgeschnitten wurde. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA; DSM 20284^T, DSM 1056, B702 und B473: *P. acidilactici*.

Leuconostoc mesenteroides

Die Verwendung des Primers A-Not (Tab. 7) in der SAPD-PCR führte zur Generierung eines ~2,5 kb großen SCAR-Markers, der bei allen untersuchten *L. mesenteroides*-Stämmen vorhanden war (Abb. 51).

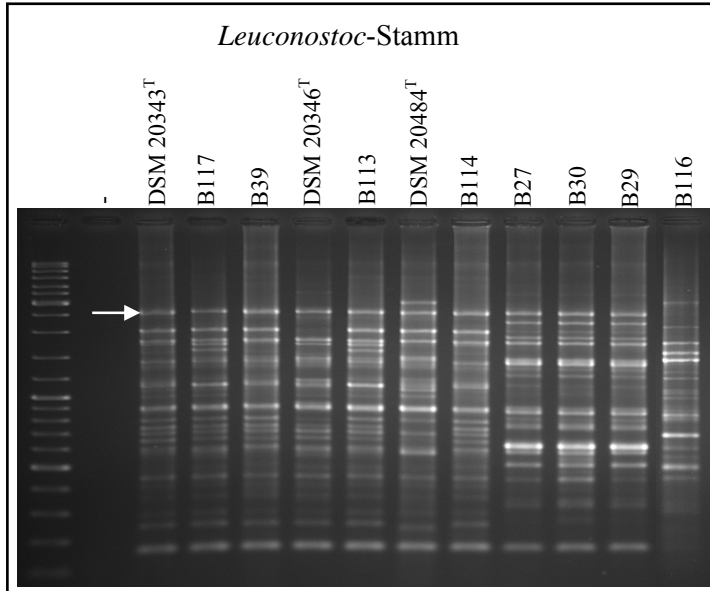


Abb. 51. SAPD-PCR mit Primer A-Not zur Analyse von *Leuconostoc*-Stämmen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Der weiße Pfeil zeigt die ~2,5 kb Gelbände, die ausgeschnitten wurde. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA; Stamm DSM 20343^T, B117 und B39: *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*; DSM 20346^T und B113: *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*; DSM 20484^T und B114: *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*; B27, B29 und B30: *L. mesenteroides*, B116: *L. pseudomesenteroides*.

Die Ergebnisse zur Generierung Art-spezifischer SCAR-Marker sind in der folgenden Tabelle (Tab. 43) zusammengefasst.

Tab. 43 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Generierung von SCAR-Markern

Spezies	(n)SAPD-PCR Gelbände	Sequenzvergleich (NCBI-BLAST)
<i>P. parvulus</i>	539 bp	Genprodukt unbekannt
<i>P. pentosaceus</i>	527 bp	Membranprotein
<i>P. damnosus</i>	712 bp	2,3,4,5-Tetrahydropyridin-2-Carboxylat-N-Succinyltransferase
<i>P. inopinatus</i>	668 bp	Pseudouridin-Synthase (23S rRNA-spezifisch)
<i>L. hilgardii</i>	815 bp	Integrales Membranprotein
<i>P. acidilactici</i>	914 bp	O-Sialoglycoprotein Endopeptidase-Acetyltransferase
<i>L. mesenteroides</i>	~2,5 kb	ATP-abhängige DNA-Helicase

3.9.2 SCAR-PCR mit spezifischen Primern

Nach Klonierung und Sequenzierung der ausgeschnittenen Gelbanden wurden die Sequenzen analysiert. Sie beinhalteten an beiden Enden die Sequenz des jeweiligen Primers, der zur (nested) SAPD-PCR verwendet wurde (siehe Anhang 8.6). Die Bereiche, die durch die Primersequenzen flankiert waren, wurden durch BLAST-Suche mit Sequenzen der NCBI-Datenbank (GenBank) verglichen. Anhand der Sequenzen wurden für jede der sieben Arten zwei Primer generiert, die komplementär zu Bereichen innerhalb der Sequenz waren (Tab. 8). Die neu generierten Primerpaare wurden zur Identifizierung mehrerer Stämme der sieben Arten in einer SCAR-PCR verwendet. Um die Spezifität der Primer zu ermitteln, wurden verwandte Milchsäurebakterien untersucht. Die Durchführung der SCAR-PCR erfolgte wie in Kap. 2.19 beschrieben. In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse der Art-Identifizierung durch SCAR-PCR aufgeführt.

Pediococcus parvulus

Die PCR mit Primerpaar SCAR-PPA-F/R (Tab. 8) führte ausschließlich bei den *P. parvulus*-Stämmen zum erwarteten Amplifikat mit einer Länge von 331 bp (Abb. 52).

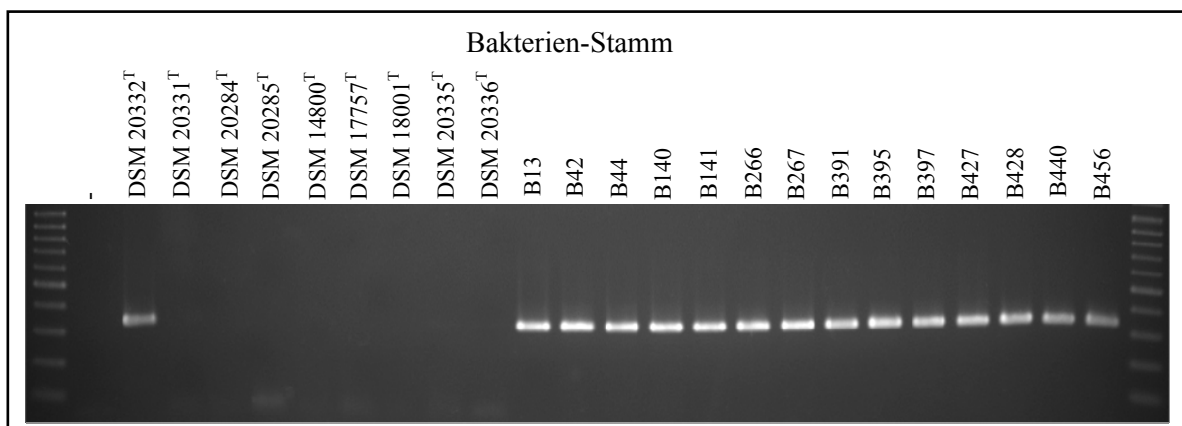


Abb. 52. SCAR-PCR zur Identifizierung von *P. parvulus*-Stämmen mit den Primern SCAR-PPA-F/R nach gelelektrophoretischer Auftrennung. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas) von 100 bis 1000 bp; -: Negativkontrolle ohne DNA; Stamm DSM 20332^T, B13, B42, B44, B140, B141, B266, B267, B391, B395, B397, B427, B428, B440 und B456: *P. parvulus*; DSM 20331^T: *P. damnosus*; DSM 20284^T: *P. acidilactici*; DSM 20285^T: *P. inopinatus*; DSM 14800^T: *P. claussenii*, DSM 17757^T: *P. cellicola*; DSM 18001^T: *P. stilesii*; DSM 20335^T: *P. dextrinicus*; DSM 20336^T: *P. pentosaceus*.

Pediococcus pentosaceus

Bei allen *P. pentosaceus*-Stämmen führte die PCR mit Primerpaar SCAR-PPE-F/R (Tab. 8) zu dem erwarteten Amplifikat mit einer Länge von 396 bp (Abb. 53).

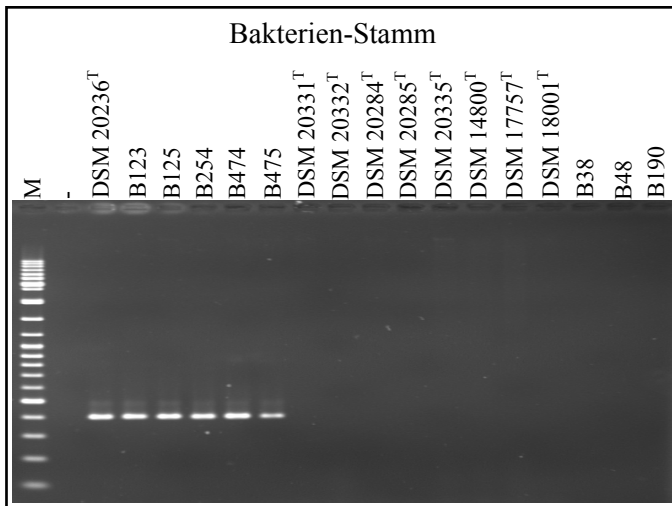


Abb. 53. SCAR-PCR zur Identifizierung von *P. pentosaceus*-Stämmen mit den Primern SCAR-PPE-F/R nach gelelektrophoretischer Auftrennung. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA; Stamm DSM 20336^T, B123, B125, B254, B474 und B475: *P. pentosaceus*; DSM 20331^T: *P. damnosus*; DSM 20332^T: *P. parvulus*; DSM 20284^T: *P. acidilactici*; DSM 20285^T: *P. inopinatus*; DSM 20335^T: *P. dextrinicus*; DSM 14800^T: *P. clausenii*, DSM 17757^T: *P. cellicola*; DSM 18001^T: *P. stilesii*; B38: *L. plantarum*; B48: *L. casei*; B190: *L. buchneri*.

Pediococcus damnosus

Die PCR mit Primerpaar SCAR-PDA-F/R (Tab. 8) führte bei den *P. damnosus*-Stämmen zu dem erwarteten Amplifikat mit einer Länge von 470 bp (Abb. 54).

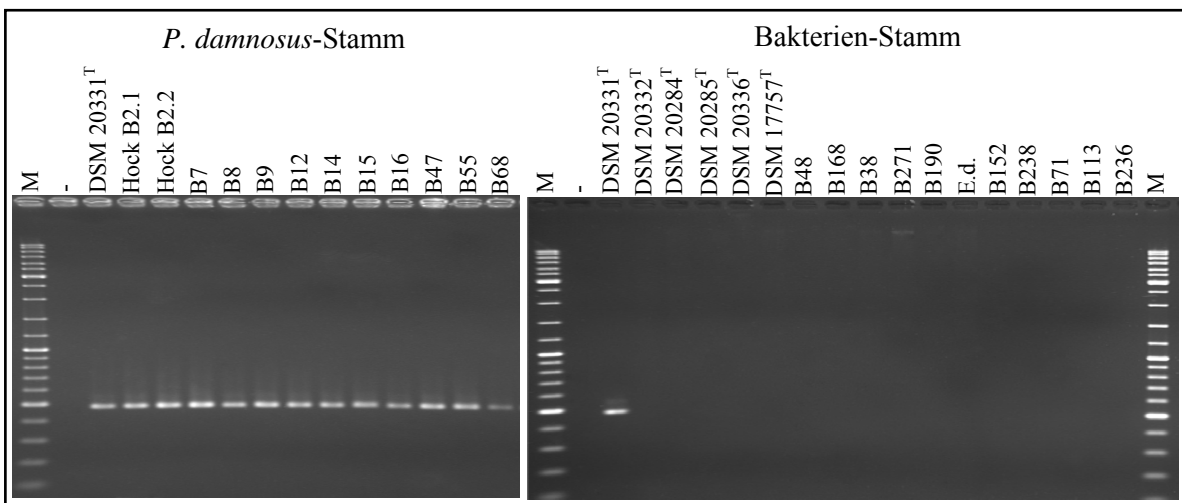


Abb. 54. SCAR-PCR zur Identifizierung von *P. damnosus*-Stämmen mit den Primern SCAR-PDA-F/R nach gelelektrophoretischer Auftrennung. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA. Zur Bezeichnung der Stämme vgl. Tab. 10, 11, 16 und 17.

Pediococcus inopinatus

Die PCR mit Primerpaar SCAR-PIN-F/R (Tab. 8) führte ausschließlich bei den beiden *P. inopinatus*-Stämmen zu dem erwarteten Amplifikat mit einer Länge von 567 bp (Abb. 55).

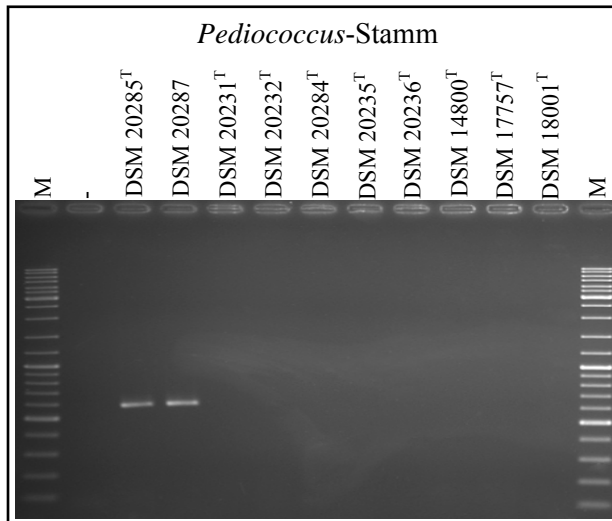


Abb. 55. SCAR-PCR zur Identifizierung von *P. inopinatus*-Stämmen mit den Primern SCAR-PIN-F/R nach gelelektrophoretischer Auftrennung. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA; DSM 20285^T und DSM 20287: *P. inopinatus*; DSM 20331^T: *P. damnosus*; DSM 20332^T: *P. parvulus*; DSM 20284^T: *P. acidilactici*; DSM 20335^T: *P. dextrinicus*; DSM 20336^T: *P. pentosaceus*; DSM 14800^T: *P. claussenii*, DSM 17757^T: *P. cellicola*; DSM 18001^T: *P. stilesii*.

Lactobacillus hilgardii

Die Verwendung des Primerpaares SCAR-LBH-F/R (Tab. 8) in einer PCR führte zu dem erwarteten Amplifikat mit einer Länge von 684 bp bei allen untersuchten *L. hilgardii*-Stämmen (Abb. 56).

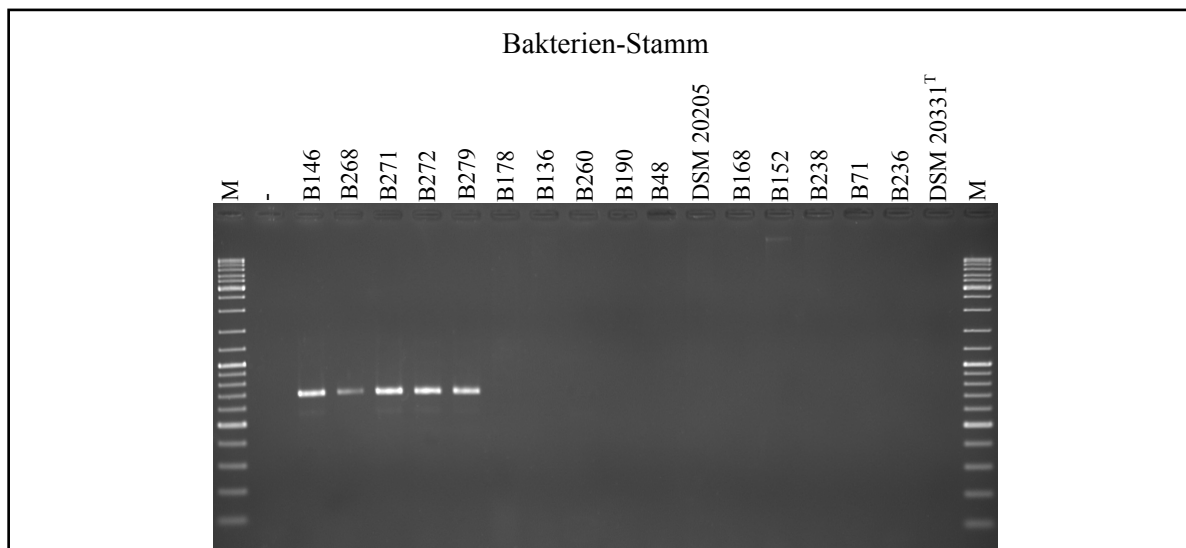


Abb. 56. SCAR-PCR zur Identifizierung von *L. hilgardii*-Stämmen mit den Primern SCAR-LBH-F/R nach gelelektrophoretischer Auftrennung (rechts). M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA; Stamm B146, B268, B271, B272, DSM 20176^T und B706: *L. hilgardii*; B178, B136 und B48: *L. casei*; B260: *L. brevis*; B190: *L. buchneri*; DSM 20205: *L. plantarum*; B168: *L. paralimentarius*; B152: *E. faecalis*; B238: *L. lactis*; B71: *S. mutans*; B236: *O. oeni*; DSM 20331^T: *P. damnosus*.

Pediococcus acidilactici

Nur bei den vier *P. acidilactici*-Stämmen führte die PCR mit Primerpaar SCAR-PAC-F/R (Tab. 8) zu dem erwarteten Amplifikat mit einer Länge von 776 bp (Abb. 57).

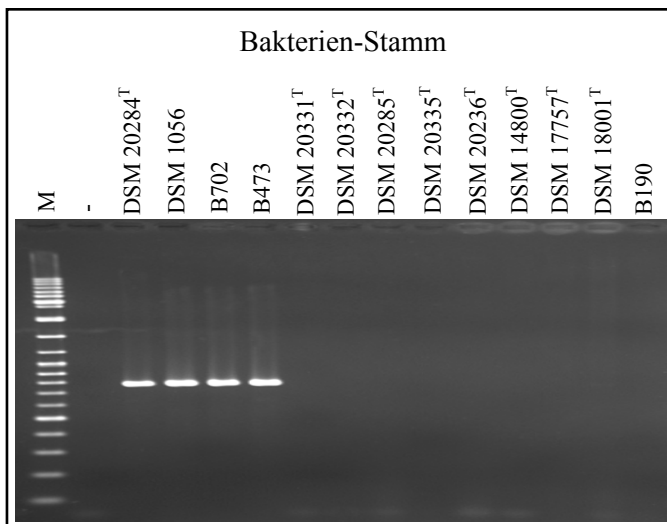


Abb. 57. SCAR-PCR zur Identifizierung von *P. acidilactici*-Stämmen mit den Primern SCAR-PAC-F/R nach gelelektrophoretischer Auftrennung. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA; DSM 20284^T, DSM 1056, B702 und B473: *P. acidilactici*; DSM 20331^T: *P. damnosus*; DSM 20332^T: *P. parvulus*; DSM 20285^T: *P. inopinatus*; DSM 20335^T: *P. dextrinicus*; DSM 20336^T: *P. pentosaceus*; DSM 17757^T: *P. cellicola*; DSM 18001^T: *P. stilesii*; B190: *L. buchneri*.

Leuconostoc mesenteroides

Die PCR mit Primerpaar SCAR-LEU-F/R (Tab. 8) führte ausschließlich bei den untersuchten *L. mesenteroides*-Stämmen zu dem erwarteten Amplifikat mit einer Länge von 886 bp (Abb. 58).

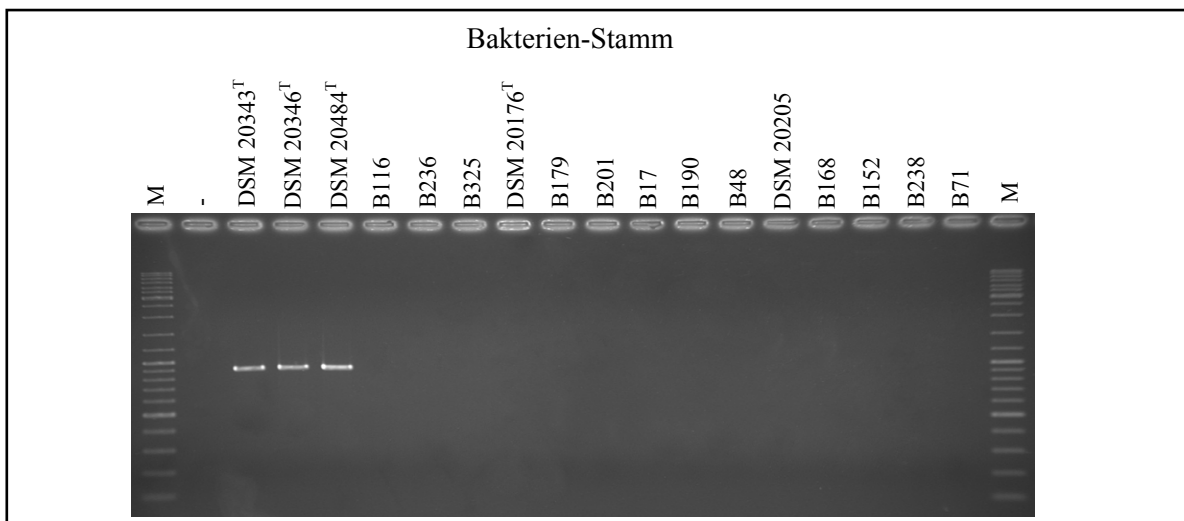


Abb. 58. SCAR-PCR zur Identifizierung von *L. mesenteroides*-Stämmen mit den Primern SCAR-LEU-F/R nach gelelektrophoretischer Auftrennung. M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas); -: Negativkontrolle ohne DNA; Stamm DSM 20343^T: *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*; DSM 20346^T: *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*; DSM 20484^T: *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*; B116: *L. pseudomesenteroides*; B236 und B325: *O. oeni*; DSM 20176^T: *L. hilgardii*; B179: *L. suntoyensis*; B201: *L. plantarum*; B17: *L. hilgardii*; B190: *L. buchneri*; B48: *L. casei*; DSM 20205: *L. plantarum*; B168: *L. paralimentarius*; B152: *E. durans*; B238: *L. lactis*; B71: *S. mutans*.

Neben den in den Abbildungen 52-58 angegebenen Milchsäurebakterien wurden weitere Milchsäurebakterien als Positiv- und Negativkontrollen durch SCAR-PCR untersucht. Die Ergebnisse der Art-Identifizierung mit den SCAR-Primern sind zusammengefasst in Tab. 44 angegeben.

Tab. 44. Ergebnisse der SCAR-PCR-Identifizierung

Stamm	Spezies	PCR-Produkt mit Primerpaar						
		PPA F/R ^a	P PE F/R ^b	PDA F/R ^c	PIN F/R ^d	PAC F/R ^e	LBH F/R ^f	LEU F/R ^g
DSM 20332 ^T	<i>P. parvulus</i>	+	-	-	-	-	-	-
DSM 20336 ^T	<i>P. pentosaceus</i>	-	+	-	-	-	-	-
DSM 20331 ^T	<i>P. damnosus</i>	-	-	+	-	-	-	-
DSM 20285 ^T	<i>P. inopinatus</i>	-	-	-	+	-	-	-
DSM 20284 ^T	<i>P. acidilactici</i>	-	-	-	-	+	-	-
DSM 20176 ^T	<i>L. hilgardii</i>	-	-	-	-	-	+	-
DSM 20343 ^T	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	-	-	-	-	-	-	+
DSM 20346 ^T	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	-	-	-	-	-	-	+
DSM 20484 ^T	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	-	-	-	-	-	-	+
B116	<i>L. pseudomesenteroides</i>	-	-	-	-	-	-	-
DSM 20335 ^T	<i>P. dextrinicus</i>	-	-	-	-	-	-	-
DSM 14800 ^T	<i>P. clausenii</i>	-	-	-	-	-	-	-
DSM 17757 ^T	<i>P. cellicola</i>	-	-	-	-	-	-	-
DSM 18001 ^T	<i>P. stilesii</i>	-	-	-	-	-	-	-
B48	<i>L. casei</i>	-	-	-	-	-	-	-
B38	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-	-	-	-
B190	<i>L. parabuchneri</i>	-	-	-	-	-	-	-
B168	<i>L. paralimentarius</i>	-	-	-	-	-	-	-
B260	<i>L. brevis</i>	-	-	-	-	-	-	-
B236	<i>O. oeni</i>	-	-	-	-	-	-	-
E.d.	<i>E. durans</i>	-	-	-	-	-	-	-
B152	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-
E. sp. J.F.	<i>Enterococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-
B238	<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-
B71	<i>S. mutans</i>	-	-	-	-	-	-	-

^a Weitere positive *P. parvulus*-Stämme: B13, B42, B44, B140, B141, B266, B267, B395, B397, B398, B399, B400, B401, B404, B405, B427, B428, B440, B441, B442, B443, B444, B445, B446, B447, B448, B449, B450, B453, B454, B456, B457, B458, B459, B460, BPc 149, BPc 152, BPc 158, BPc 184.

^b Weitere positive *P. pentosaceus*-Stämme: B123, B125, B254, B474, B475.

^c Weitere positive *P. damnosus*-Stämme: Hock B2.1, Hock B2.2, B7, B8, B9, B12, B14, B15, B16, B47, B68, B69, B78, B89, B91, B93, B97, B98, B99, B451, B452, B455, BPc 260.

^d Weiterer positiver *P. inopinatus*-Stamm: DSM 20287^T.

^e Weitere positive *P. acidilactici*-Stämme: DSM 1056, B473, B702.

^f Weitere positive *L. hilgardii*-Stämme: B146, B268, B271, B272, B706.

^g Weitere positive *L. mesenteroides*-Stämme: B27, B29, B39, B113, B114, B117.

^T Typstamm

3.9.3 Multiplex PCR mit SCAR-Primern

Jede der sieben Milchsäurebakterien-Arten, für die ein SCAR-Marker generiert wurde, konnte durch Multiplex PCR sowohl einzeln, als auch in einer Mischung mit den anderen Milchsäurebakterien identifiziert werden (Abb. 59). Die Bakterien wurden anhand ihres spezifischen PCR-Amplifikats identifiziert. Die erwarteten Größen der PCR-Amplifikate zur Art-Identifizierung der Milchsäurebakterien waren: 331 bp für *P. parvulus*, 396 bp für *P. pentosaceus*, 470 bp für *P. damnosus*, 567 bp für *P. inopinatus*, 684 bp für *L. hilgardii*, 776 bp für *P. acidilactici* und 886 bp für *L. mesenteroides*.

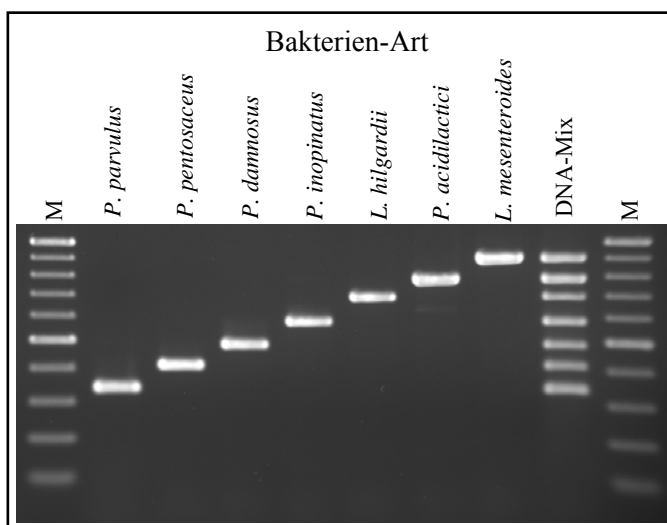


Abb. 59 Verwendung der generierten SCAR-PCR Primer in einem Multiplex PCR Ansatz. Es wurde eine Primer-Mischung mit den Primerpaaren SCAR-PPA-F/R, SCAR-PPE-F/R, SCAR-PDA-F/R, SCAR-PIN-F/R, SCAR-LBH-F/R, SCAR-PAC-F/R und SCAR-LEU-F/R verwendet. Zur PCR wurde jeweils die DNA des Typstamms jeder Art verwendet (*L. mesenteroides*: Stamm DSM 20343^T). M: Marker DNA Ladder Mix (Fermentas) von 100 bis 1000 bp; DNA-Mix: Mischung der DNA aller sieben untersuchten Arten.

4. Diskussion

4.1 Art-Identifizierung durch vergleichende rDNA-Sequenzanalysen

Die ribosomalen Gensequenzen zahlreicher Mikroorganismen sind bekannt. Sie bestehen aus Bereichen höherer und geringerer Konservierung und können daher zu phylogenetischen und taxonomischen Analysen verwendet werden. Am häufigsten werden vergleichende Sequenzanalysen der kleinen ribosomalen Untereinheit (engl. small subunit; SSU) zur Identifizierung unbekannter Spezies durchgeführt. Aufgrund der hohen Sequenzidentität ist eine Art-Differenzierung auf Basis der SSU rDNA für viele Spezies jedoch nur eingeschränkt oder überhaupt nicht möglich.

Beim Vergleich der durch nested SAPD-PCR generierten DNA Fingerprint-Bandenmuster einiger Milchsäurebakterien aus der institutseigenen Kultursammlung mit den Bandenmustern bekannter Spezies wurde festgestellt, dass die Bandenmuster einiger Spezies nicht dem erwarteten Bandenmuster entsprachen. Diese Stämme wurden durch 16S rDNA-Sequenzvergleich identifiziert (siehe Kap. 3.1.1). Die vergleichenden Sequenzanalysen zeigten, dass diese Stämme tatsächlich unter falschen Artnamen hinterlegt bzw. seit ihrer Hinterlegung reklassifiziert wurden. So waren untypische DNA Fingerprint-Bandenmuster in allen Fällen ein Indiz, dass es sich nicht um die angegebenen Arten handelte. Die Ergebnisse der Art-Identifizierung neu isolierter *Pediococcus*-Stämme aus Starterkulturen durch die 23S rDNA basierende Multiplex PCR konnten durch 16S rDNA-Sequenzierung und vergleichende Sequenzanalysen verifiziert werden. Weitere Isolate aus Starterkulturen konnten eindeutig der Spezies *Enterococcus faecium* zugeordnet werden. Hier muss überprüft werden, wie dieses Bakterium der Risikogruppe 2 in kommerziell erhältliche *Oenococcus oeni*-Starterkulturen gelangen konnte.

Die zwei Internal Transcribed Spacer (ITS)-Bereiche (ITS1 und ITS2) trennen in Eukaryoten die konservierte 18S und 26S von der 5.8S rDNA. Die nicht-kodierenden ITS-Bereiche unterliegen einem geringeren evolutionären Selektionsdruck als die kodierenden rRNA-Gene (Musters et al., 1990). Die ITS-Bereiche sind daher weniger konserviert und können aufgrund ihrer höheren Variabilität zur Art- und teilweise Stammdifferenzierung von Hefen verschiedener Gattungen verwendet werden. Durch die ITS-Sequenzierung der Hefen aus Starterkulturen und Datenbankvergleich konnte deren Artzugehörigkeit eindeutig ermittelt werden. Zwischen den ITS-Regionen verschiedener Stämme der Arten *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia anomala* konnten jedoch keine stammspezifischen

Unterschiede festgestellt werden. Die ITS-Sequenzierung erlaubte eine rasche und standardisierte molekulare Differenzierung weinrelevanter Hefen auf Speziesniveau.

4.2 Die Phylogenie der Gattung *Pediococcus*

Obwohl *P. acidilactici* und *P. pentosaceus* durch physiologische Tests nur schwer zu unterscheiden sind, zeigen sie nur eine geringe Ähnlichkeit von 5-35 % bei der DNA-DNA-Hybridisierung (Back & Stackebrandt, 1978; Dellaglio & Torriani, 1986; Simpson & Taguchi, 1995). Trotzdem besitzen diese beiden Spezies beim Vergleich ihrer 16S rDNA-Sequenzen eine engere Verwandtschaft zueinander, als zu den übrigen Pediokokken. *P. damnosus* zeigt eine enge Verwandtschaft zu den Arten *P. inopinatus* und *P. parvulus* auf Basis von DNA-DNA-Hybridisierungsexperimenten. Diese Tatsache wird durch die phylogenetische Untersuchung dreier Arten basierend auf 16S rDNA-Sequenzvergleichen unterstützt (Simpson & Taguchi, 1995; Dobson et al., 2002). Zur Erstellung einer phylogenetischen Analyse verschiedener *Pediococcus*-Arten kombinierten Dobson et al. (2002) die Untersuchung der 16S rDNA, des ITS1-Bereichs und des Hitzeschock Protein 60 Gens. Die Sequenzanalysen der drei Genbereiche bestätigten die nahe Verwandtschaft der beiden Arten *P. acidilactici* und *P. pentosaceus*, und die enge Verwandtschaft der drei Arten *P. damnosus*, *P. inopinatus* und *P. parvulus*. In dieser Studie wurde auch eine neue Art, *P. claussenii* beschrieben, die anhand der Untersuchung der drei Genbereiche eine engere Verwandtschaft zu den beiden Arten *P. pentosaceus* und *P. acidilactici* zeigte, als zu den Arten *P. damnosus*, *P. inopinatus* und *P. parvulus* (Dobson, 2002). Auf der Basis von 16S rDNA-Sequenzvergleichen weist die Art *P. cellicola* eine hohe Sequenz-Homologie mit den Arten *P. damnosus* (98,3 %), *P. parvulus* (98,3 %) und *P. inopinatus* (98,5 %) auf (Zhang et al., 2005), während die Art *P. stilesii* eine nahe Verwandtschaft zu den Arten *P. acidilactici* (97,5 %) und *P. pentosaceus* (98,2 %) zeigt (Franz et al., 2006).

Die auf Basis der 23S rRNA-Gensequenzen ermittelten Verwandtschaftsverhältnisse (Abb. 6) stimmen zum Teil nicht mit der 16S rDNA basierenden Phylogenie aus anderen Arbeiten (Zhang et al., 2005, Franz et al., 2006, Liu et al., 2006) überein. Die Verwandtschaft innerhalb des *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus* und *P. cellicola* Clusters unterscheidet sich von der Verwandtschaft, die von Zhang et al. (2005) und Liu al. (2006) ermittelt wurde. Im 23S rDNA-Stammbaum (Abb. 6) sind die beiden Arten *P. parvulus* und *P. cellicola* näher verwandt. Weitere Unterschiede in Bezug auf den

P. acidilactici, *P. pentosaceus*, *P. stilesii* und *P. claussenii* Cluster werden im Vergleich zur phylogenetischen Studie von Franz et al. (2006) deutlich. Im Vergleich zum 23S rDNA-Stammbaum (Abb. 6) sind die beiden Arten *P. acidilactici* und *P. pentosaceus* in dieser Studie näher verwandt. Jedoch sind die Abzweigungen dieses Clusters in beiden Studien nur durch geringe Bootstrap-Werte statistisch abgesichert. Über die entfernte Verwandtschaft von *P. dextrinicus* zu den typischen Pediokokken wurde von Dobson et al. (2002) berichtet. Es wurde bereits früher vorgeschlagen diese Art zu reklassifizieren (Collins et al., 1991; Stiles & Holzapfel, 1997). In Bezug auf den in dieser Arbeit erstellten large subunit (LSU)-rDNA Stammbaum (Abb. 6) wurde die entfernte Verwandtschaft des Bakteriums *P. dextrinicus* zu den anderen Pediokokken bestätigt.

4.3 Identifizierung der Pediokokken auf Basis von 23S rDNA-Sequenzen

Einerseits werden Pediokokken wegen der Fähigkeit einiger Stämme zur Bildung von Stoffwechselprodukten wie Diacetyl und Acetoin (Wibowo et al., 1985), biogenen Aminen (Landete et al., 2005) und β -D-Glucan (Llaubères et al., 1990, Duenas-Chasco et al., 1997, Velasco et al., 2007) als Schädlingsorganismen bei der Lebensmittelherstellung angesehen. Andererseits werden speziell ausgewählte Stämme als Starterkulturen wegen ihrer Lactat-, Diacetyl- und Bacteriocin-Bildung während der Fermentierung bestimmter Lebensmittel gezielt eingesetzt (Raccach, 1987; Stiles, 1996; Back, 1999; Albano et al., 2007). In allen Fällen sind schnelle und sichere Identifizierungsmethoden vorteilhaft, um das Wachstum der Pediokokken zu kontrollieren und die Qualität von Lebensmitteln zu sichern. Der Nachweis bestimmter *Pediococcus*-Arten aus Lebensmitteln und Getränken ist durch klassische Nachweisverfahren zeitaufwändig und oft unzuverlässig. Da molekularbiologische Nachweisverfahren schnell und kultivierungsunabhängig durchzuführen sind, stellen sie eine sichere Alternative zu den klassischen Nachweisverfahren dar und sind in der heutigen Zeit unerlässlich.

In der vorliegenden Arbeit wurden die 23S rRNA-Gene von neun in Kulturensammlungen erhältlichen *Pediococcus*-Arten vollständig sequenziert. Die Sequenz-Daten lieferten neue Möglichkeiten für eine taxonomische Diskriminierung der einzelnen Arten und für phylogenetische Analysen. Alle Sequenzen wurden in der NCBI-Datenbank (GenBank) öffentlich zugänglich gemacht (Tab. 36). Neben der phylogenetischen Analyse konnten die Sequenzen zur Generierung Art-spezifischer PCR-Primer verwendet werden. Im Vergleich

zu Sequenzen der 16S rRNA und der ITS-Regionen waren die 23S rDNA-Sequenzen aufgrund ihrer Größe und ihrer höheren Variabilität als Zielregionen für die Entwicklung Spezies-spezifischer PCR-Primern besonders geeignet. Jeweils ein Primerpaar wurde zur Identifizierung der typischen *Pediococcus*-Arten und der atypischen Art, *P. dextrinicus* entwickelt. Parallel dazu wurde ein 23S rDNA basierendes Multiplex PCR System zur simultanen Art-Identifizierung der acht typischen Pediokokken entwickelt.

Über Vorkommen unterschiedlicher *Pediococcus*-Arten in Wein wurde in einigen Studien berichtet (Davis et al., 1986, Davis et al., 1988, Edwards et al., 1992). Die Isolierung und Identifizierung von 47 *Pediococcus*-Stämmen aus 100 Weinproben zeigte, dass Bakterien der Gattung *Pediococcus* im Weinanbaugebiet Rheinhessen weit verbreitet sind. Die Artdiversität war in den untersuchten Weinen gering, da ausschließlich die beiden Arten *P. parvulus* und *P. damnosus* isoliert werden konnten. Durch Multiplex PCR Identifizierung zweier unterschiedlicher Spezies aus einer Weinprobe wurde bestätigt, dass mehrere *Pediococcus*-Arten gleichzeitig im selben Wein vorkommen können. Die Multiplex PCR-Identifizierung konnte sowohl mit DNA aus Reinkulturen, als auch mit Gesamt-DNA aus Wein- und Mostproben erfolgreich durchgeführt werden. Der Nachweis von 10 Zellen / ml in einem künstlich beimpften Wein zeigte, dass die 23S rDNA basierende Multiplex PCR eine sehr empfindliche Identifizierungsmethode darstellt. Das entwickelte Multiplex PCR Nachweissystem ist daher eine ausgezeichnete Methode zur schnellen Identifizierung unterschiedlicher Arten in Wein. Mit dieser Methode könnten auch Pediokokken aus anderen Lebensmitteln identifiziert werden.

Neben der Identifizierung von Pediokokken aus Wein wurde die Multiplex PCR auch zur Überprüfung kommerziell erhältlicher Starterkulturen angewandt. Einige der aus den Starterkulturen isolierten Bakterienstämme konnten den Arten *P. acidilactici* und *P. pentosaceus* zugeordnet werden (Tab. 40). Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse der Art-Identifizierung durch die 23S rDNA basierende Multiplex PCR Methode den tatsächlichen Art-Identitäten entsprachen, wurde die Art-Zugehörigkeit aller untersuchter Stämme durch die SAPD-PCR überprüft. Dabei konnte die durch Multiplex PCR ermittelte Artzugehörigkeit für jeden Stamm durch charakteristische DNA Fingerprint-Bandenmuster verifiziert werden (Abb. 23).

In einer früheren Arbeit (Dobson et al., 2002) wurde die Art-Zugehörigkeit mehrerer Stämme der Gattung *Pediococcus* durch vergleichende Sequenzanalysen überprüft. Dabei wurde festgestellt, dass viele Stämme unter falschen Artnamen hinterlegt waren. Durch die Multiplex PCR Untersuchung von Stämmen aus der institutseigenen Kultursammlung

wurde bestätigt, dass klassische biochemische Nachweisverfahren zu falschen Art-Identifizierungen führen können, und in einigen Fällen keine exakte Artidentifizierung garantieren.

Das zur Identifizierung von Organismen unterschiedlicher Taxa verwendete rRNA-Gencluster beinhaltet Sequenzbereiche, die in unterschiedlichem Maße konserviert sind. Bei den Milchsäurebakterien der Gattung *Pediococcus* bietet nur die 23S rDNA aufgrund ihrer Länge und ihrer teilweisen höheren Variabilität das Potential für die sichere Differenzierung auf Spezies-Ebene durch Multiplex PCR. Eine Stamm-Differenzierung derselben *Pediococcus*-Art ist auf Basis der rDNA-Sequenzen aufgrund der hohen Identität nicht möglich.

4.4 Generierung von rRNA-Sekundärstrukturen

Die Generierung der 23S rRNA-Sekundärstrukturen für neun Arten der Gattung *Pediococcus* wurde auf Basis der Referenzstruktur des Bakteriums *Lactococcus lactis* durchgeführt. Die LSU rRNA-Sekundärstrukturen der neun *Pediococcus*-Arten wurden mit der neu entwickelten Software Structure Star 1.0 (Fröhlich, pers. Mitteilung) generiert. Aufgrund der vergleichsweise geringen Anzahl variabler Sequenzen blieb die Grundstruktur von *L. lactis* größtenteils erhalten. In einer früheren Arbeit wurden bereits DNA-Sonden für andere Mikroorganismen nach der gleichen Vorgehensweise entwickelt (Röder, 2007). Allerdings mussten die rRNA-Sekundärstrukturen an die neue Sequenz in mehreren zeitaufwendigen Arbeitsschritten unter Verwendung mehrerer Programme manuell angepasst werden. Der aufwendige und komplexe Prozess zur Generierung von rRNA-Sekundärstrukturen führte zur Überlegung der Programmierung einer geeigneten Software, die alle Arbeitsschritte in einem Programm vereint und das Erstellen der Sekundärstrukturen vereinfacht. Durch das daraus resultierende Programm Structure Star 1.0 kam es zu wesentlichen Erleichterungen bei der Erstellung von rRNA-Sekundärstrukturen. Neue rRNA-Gensequenzen lassen sich auf bereits existierende homologe rRNA-Sekundärstrukturen übertragen. Diese Referenzsequenzen sind auf der Homepage des Institute for Cellular and Molecular Biology and The Section for Integrative Biology, University of Texas at Austin (<http://www.rna.cccb.utexas.edu>, Gutell et al., 1993; Cannone et al., 2002) frei verfügbar. Nach Übertragung einer rRNA-Gensequenz auf eine homologe rRNA-Sekundärstruktur können die von der Referenzsequenz abweichenden Bereiche durch die Interaktion mit der

Software Mfold (Zuker, 2000) thermodynamisch neu berechnet und in die Sekundärstruktur integriert werden. Innerhalb weniger Minuten lassen sich komplette Sekundärstrukturen erstellen, deren Generieren durch manuelles Editieren mehrere Stunden in Anspruch genommen hätte. Im Vergleich zu früheren Arbeiten kommt es mit Verwendung der Software Structure Star zu erheblicher Zeitersparnis. Die neu erstellten rRNA-Sekundärstrukturen können als Grundlage für die Generierung weiterer Sekundärstrukturen verwendet werden.

Mit Structure Star können aufgrund von Art-spezifischen Nukleotiden geeignete Zielbereiche für FISH-Sonden in der rRNA-Sekundärstruktur aufgefunden und angezeigt werden. Dabei kann auch die Generierung von Sonden nach dem Gemeinschafts-Sonden (sideprobe) Effekt (Fröhlich & König, 2002; Fröhlich et al., 2003; Hirschhäuser et al., 2005; Röder et al., 2007) oder dem Helfer-Sonden-Prinzip (Fuchs et al., 2000) berücksichtigt werden. Die ausgewählten Sonden können durch BLAST-Suche auf Spezifität geprüft werden.

4.5 Identifizierung der Pediokokken durch FISH

Durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) können Mikroorganismen unter Verwendung geeigneter Sonden spezifisch in einer komplexen Lebensgemeinschaft lokalisiert und quantifiziert werden. Blasco et al. (2003) entwickelten 16S rRNA-gerichtete Sonden zur Identifizierung weinrelevanter Milchsäurebakterien der Gattungen *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Oenococcus* und *Leuconostoc*. Zur direkten Identifizierung von *Oenococcus oeni* in Wein wurden darüber hinaus FISH-Sonden entwickelt, die gegen die 16S rRNA, 23S rRNA (Fröhlich & König, 2002; Fröhlich et al., 2003) und die 5S rDNA (Hirschhäuser et al., 2005) gerichtet waren.

Die mit der Software Structure Star erstellten 23S rRNA-Sekundärstrukturen der neun *Pediococcus*-Arten erleichterten das Auffinden variabler Bereiche, die als Ziel für FISH-Sonden dienen sollten. Da die Unterschiede zwischen einigen nah verwandten *Pediococcus*-Arten wie *P. damnosus* und *P. inopinatus* nur gering waren, konnten keine Art-spezifischen Fluoreszenz-Sonden generiert werden. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Arten reichten aber aus, um zwei Gruppen voneinander unterscheiden zu können. So wurde die Sonde Pedio23S5 zur Identifizierung der Arten *P. acidilactici* und *P. pentosaceus* generiert und die Sonde Pedio23S6 zur Identifizierung der Gruppe *P. damnosus*, *P. parvulus* und *P. inopinatus* (Abb. 12 und Tab. 41). Die unmarkierten Hel-

Personen wurden unter Berücksichtigung der rRNA-Sekundärstrukturen so gewählt, dass sie sich in unmittelbarer Nähe der FISH-Sonden befanden und teilweise komplementär zu den FISH-Sonden waren (Abb. 11). Durch Bindung der Helfersonden sollten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären Bereichen der Sekundärstruktur aufgebrochen werden. Dadurch sollte die in situ Zugänglichkeit der rRNA in der Zielregion gemäß dem Helfer-Sonden-Prinzip (Fuchs et al., 2000) verbessert werden. Der Effekt der Verwendung der FISH-Sonde in Kombination mit unmarkierten Helfersonden zeigte sich deutlich durch ein stärkeres Fluoreszenzsignal im Vergleich zur Hybridisierung ohne Helfersonden. Die Bindung der teilweise komplementären, unmarkierten Helfersonden an die rRNA verbesserte die Zugänglichkeit der fluoreszenzmarkierten Sonde an die hoch strukturierte rRNA. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen aus früheren Studien (Fuchs et al., 2000) überein, in denen unmarkierte Helfersonden zu einer signifikanten Verbesserung der FISH von 16S rRNA in *E. coli* geführt haben. Die anfänglichen Probleme bei der FISH von Exopolysaccharid-bildenden *Pediococcus*-Stämmen konnten durch die Inkubation der Zellen mit Lysozym gelöst werden. Offensichtlich wurde durch den teilweisen Abbau der Zellwand das Eindringen der Sonden in die Zellen verbessert.

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung ist eine zeitnahe, spezifische und relativ kostengünstige Nachweismethode. Unter Verwendung der neu generierten Sonden zur Identifizierung verschiedener *Pediococcus*-Arten könnte die FISH z.B. in Weinanalytik Instituten zur prozessbegleitenden Qualitätssicherung bei der Weinherstellung eingesetzt werden.

4.6 Differenzierung der Milchsäurebakterien durch DGGE

Die Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) (Muyzer et al., 1993) ist eine der wichtigsten Methoden zur Untersuchung des Verlaufs mikrobieller Populationen. Guerrini et al. (2003) untersuchten die variable 16S rDNA V3-Region von Stämmen der Gattungen *Leuconostoc*, *Weissella* und *Oenococcus* durch DGGE. Sie fanden heraus, dass die DGGE dieses 16S rDNA-Bereichs zur Artidentifizierung der untersuchten Stämme geeignet war. Zwischen den Stämmen einer Art konnten keine Unterschiede auf dem betreffenden Genfragment beobachtet werden. Lopez et al. (2003) untersuchten mehrere Primerpaare, die zur Analyse von Bakterien durch DGGE entwickelt wurden und stellten fest, dass durch einige Primer auch DNA von Hefen, Pilzen und Pflanzen amplifiziert wur-

de. Da die Verwendung dieser Primer die Ergebnisse der Untersuchung von Bakterien aus Wein verfälschen könnte, wurden zwei neue Primerpaare entwickelt. Ein Primerpaar wurde für die Untersuchung der 16S rDNA V4 und V5-Region von Milchsäurebakterien und das zweite Primerpaar zur Untersuchung der 16S rDNA V7 und V8-Region von Essigsäurebakterien generiert. Mit den neu entwickelten Primern konnten schließlich verschiedene Arten der Gattungen *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Acetobacter* und *Gluconobacter* erfolgreich differenziert werden. Bae et al., 2006 konnten Milchsäurebakterien der Gattungen *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Weissella* und weitere Bakterien der Gattungen *Sporolactobacillus*, *Asaia* und *Bacillus* nach Anreicherung auf intakten Weintrauben durch DGGE nachweisen. Dagegen konnte *Oenococcus oeni* nicht auf Trauben identifiziert werden. Die Differenzierung der Bakterien erfolgte anhand der Auftrennung variabler 16S rDNA-Gensequenzen durch DGGE. Zur Differenzierung von Milchsäurebakterien aus Wein führten Renouf et al. (2006 a) eine DGGE des *rpoB*-Gens durch, welches für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase kodiert. Dieses Gen stellt eine Alternative zu der Untersuchung ribosomaler Gene dar, bei denen innerhalb einiger Arten Heterogenitäten festgestellt wurden, die die Art-Identifizierung erschwerten. In weiteren Studien derselben Arbeitsgruppe konnten weinrelevante Arten der Gattungen *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* und *Oenococcus* durch die DGGE eines *rpoB*-Teilbereichs erfolgreich differenziert werden (Renouf et al., 2006 c). Die Diversität zahlreicher Mikroorganismen auf Trauben und in Wein wurde durch die DGGE von *rpoB*-Teilbereichen für Bakterien und 26S rDNA-Sequenzen für Hefen untersucht (Renouf et al., 2007). Darüber hinaus konnte in dieser Studie die Dynamik des Wachstums der Mikroorganismen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Weinherstellung durch DGGE analysiert werden.

Durch die Verwendung der in dieser Arbeit neu generierten Primer DGGE_F1 und DGGE_R1 (Tab. 5) konnte ein hoch variabler 23S rDNA-Bereich der untersuchten Milchsäurebakterien in einer PCR amplifiziert werden. Die Auftrennung der Amplifikate durch DGGE zeigte nach Färbung mit Ethidiumbromid, dass alle Milchsäurebakterien anhand des Auftretens artspezifischer Gelbanden voneinander differenziert werden konnten (Abb. 13). So konnten die weinrelevanten Arten *Pediococcus parvulus*, *P. damnosus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Oenococcus oeni* und *Leuconostoc mesenteroides* durch DGGE differenziert werden. Da die Primer an konservierte Bereiche der 23S rDNA binden, die den hoch variablen Bereich flankieren, sind die Primer neben den untersuchten Arten auch zur Untersuchung weiterer Milchsäurebakterien geeignet (vgl. Alignment Anhang 8.2). Die DGGE ist eine der besten Methoden, um unterschiedliche Mikroorganismen in einer Mik-

robiota nachzuweisen. Vor allem zur Verfolgung der mikrobiellen Diversität während Fermentationsprozessen wurde diese Methode in zahlreichen Untersuchungen erfolgreich eingesetzt. Die 23S rDNA-gerichteten PCR-Primer stehen in Kombination mit der DGGE-Methode zukünftigen Versuchen, beispielsweise zur Untersuchung der Veränderung der mikrobiologischen Diversität während der Fermentierung von Wein zur Verfügung. Allerdings ist die Anwendung der DGGE zur Identifizierung technisch aufwendig, da die DNA bekannter Arten als Standards mit auf das Gel aufgetragen werden müssen. Darüber hinaus ist das gleiche Laufverhalten zweier Gelbanden nicht immer der Beweis dafür, dass es sich um die gleiche Art handelt. Wenn viele Arten in einer Probe vorhanden sind, kann eine Komigration unterschiedlicher Sequenzen auftreten, die das Ergebnis verfälscht (Gafan & Spratt, 2005). Bei einigen nah verwandten Arten kann mitunter selbst ein hoch variabler rDNA-Bereich identisch sein.

4.7 Nachweis der Gene zur Exopolysaccharid-Synthese

Die Exopolysaccharid-Bildung durch Milchsäurebakterien kann zum „Zäh- oder Lindwerden“ des Weines führen. Dieser Weinefehler macht sich durch eine erhöhte Zunahme der Viskosität bemerkbar (Walling et al., 2005). Während eine leichte Zähigkeit noch durch eine kräftige Schwefelung rückgängig gemacht werden kann, wirkt in schweren Fällen nur das Ablassen des Weines durch ein Reißrohr oder Weinbrause entgegen, was zu einer unerwünschten Oxydation des Weines führt (Dittrich & Großmann, 2005). Auch der Abbau des Glucans durch eine β -1,3-Glucanase ist möglich. Diese Enzyme werden aus bestimmten Pilzen gewonnen (z.B. *Trichoderma harzianum*, *T. reesei*) und vor allem zum Abbau des *Botrytis*-Glucans in belastetem Lesegut eingesetzt. Aufgrund der 1,2-glycosidisch verknüpften Seitenketten ist das *Pediococcus*-Glucan jedoch wesentlich schwerer abbaubar, als das β -1,3;1,6-glycosidisch verknüpfte *Botrytis*-Glucan (Dittrich und Großmann, 2005). Ein Einsatz dieser Enzyme ist darüber hinaus mit erheblichen Kosten verbunden. Um dem Zähwerden des Weines vorzubeugen, bedarf es geeigneter Methoden, die eine möglichst frühzeitige Identifizierung Exopolysaccharid (EPS)-bildender Milchsäurebakterien erlauben, um rechtzeitig Gegenmaßnahmen einleiten zu können.

In dieser Arbeit wurden zwei bereits beschriebene PCR-Methoden (Gindreau et al., 2001; Werning et al., 2006) zum Nachweis EPS-bildender *Pediococcus*-Stämme angewandt. Das Vorhandensein des *mob*-Gens, das für ein mobilization-Protein kodiert, wurde bei ver-

schiedenen Stämmen der Arten *Pediococcus parvulus* und *P. damnosus* überprüft. Während Gindreau et al (2001) das *mob*-Gen nur bei Glucan-bildenden *P. damnosus*-Stämmen nachweisen konnten, wurde das Vorhandensein des Gens in der vorliegenden Arbeit auch bei *P. parvulus* nachgewiesen. Bei 60 der 74 untersuchten Stämme (81 %) konnte das *mob*-Gen nachgewiesen werden. Nur 20 der *mob*-positiven Stämme bildeten ein Exopolysaccharid (EPS) auf MRS-Agar unter den gewählten Wachstumsbedingungen. Ein Stamm bildete ein EPS, obwohl kein *mob*-Gen nachgewiesen werden konnte (Tab. 42). Die Ergebnisse unterscheiden sich von den Ergebnissen der Forschungsarbeit von Gindreau et al. (2001), in der bei allen Glucan-bildenden Stämmen das *mob*-Gen nachgewiesen werden konnte, während alle Stämme die kein Glucan bildeten das betreffende Gen nicht besaßen. Die Wachstumsbedingungen waren in beiden Studien nahezu identisch (MRS-Agar; 20-25 °C). In der Arbeit von Walling et al. (2005) entstanden nach mehrmaligem Überimpfen eines Glucan-bildenden *P. damnosus*-Stammes Kolonien, die kein Glucan mehr bildeten. Die betreffenden Kolonien hatten das Plasmid verloren, auf dem sich das *mob*-Gen befand. Die PCR mit den Primern PF5 und PF6 führte dennoch zu dem erwarteten Amplifikat. Sie vermuteten, dass eine zu der Ziel DNA der Primer homologe Sequenz im Genom verblieb und es so zu falsch-positiven Ergebnissen kam. Möglicherweise hatten die 40 Stämme, bei denen das *mob*-Gen nachgewiesen werden konnte, die aber kein EPS bildeten, ebenfalls die Fähigkeit zur Glucan-Synthese verloren.

Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Untersuchung des *gtf*-Gens gemacht, dass für eine Glycosyltransferase kodiert. Bei 33 von 74 (44,5 %) der untersuchten *Pediococcus*-Stämme konnte dieses Gen nachgewiesen werden. Nur 15 der *gtf*-positiven Stämme zeigten eine EPS-Synthese auf MRS-Agar. Vier Stämme bildeten ein EPS auf MRS-Medium, obwohl das *gtf*-Gen nicht nachgewiesen werden konnte (Tab. 42). Die Ergebnisse unterscheiden sich von den Ergebnissen bei Werning et al. (2006). In dieser Studie bildeten alle *gtf*-positiven Stämme ein EPS, während alle *gtf*-negativen Stämme kein EPS bildeten. Dols-Lafargue et al. (2008) konnten bei der Untersuchung einiger *Oenococcus oeni*-Stämme ebenfalls das *gtf*-Gen nachweisen, obwohl diese Stämme kein EPS bildeten.

Die Überprüfung des *mob*-Gens und des *gtf*-Gens zeigte, dass das Vorhandensein dieser Gene allein nicht ausreicht um nachzuweisen, ob ein *Pediococcus*-Stamm zur Glucan-Bildung befähigt ist oder nicht. Vielmehr ist die Glucan-Bildung auch von chemischen und physikalischen Faktoren wie der Nährstoffversorgung und der Temperatur abhängig. So wurde beobachtet, dass niedrige Temperaturen oder ein Kälteschock (4 °C) die EPS-Bildung bei einigen Stämmen auslösen konnten. Weiterhin auffällig war, dass mehrfaches

Überimpfen eines EPS-bildenden Stammes zum Verlust der EPS-Bildung führte. Auch andere Faktoren wie pH-Wert des Mediums oder Ethanol-Konzentration können einen Einfluss auf die EPS-Bildung ausüben.

4.8 Die Anwendung der nested SAPD-PCR

Die 8 bp lange, palindrome Erkennungssequenz der *Not* I-Restriktionsendonuklease (GCGGCCGC) wurde in allen zur nested SAPD-PCR verwendeten Primer integriert. Die Sequenz wurde ausgewählt, da sie im Genom verschiedener Organismen im Vergleich zu den Erkennungssequenzen anderer Restriktionsendonukleasen seltener vorkommt. Die Sequenz eignet sich daher zur Verwendung bei der SAPD-PCR, da nicht zu viele Abschnitte der genomischen DNA-Matrize amplifiziert werden, die die Auswertung des Bandenmusters nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte erschweren würden (Fröhlich & Pfannebecker, 2006).

Der erste PCR-Schritt (SAPD-PCR) basiert auf der Methode der RAPD PCR. Durch die Verwendung einer Rampe, also einer langsamen, schrittweisen Temperaturerhöhung zwischen Annealing und Elongation der Primer wird die Reproduzierbarkeit im Vergleich zur klassischen RAPD PCR erhöht. Zum Beispiel konnte für *P. damnosus* (DSM 20331^T) bei fünffacher Wiederholung der SAPD-PCR eine Identität im DNA Fingerprint-Bandenmuster von 97 % errechnet werden. In der Regel wurde nach der ersten PCR das Subspezies-Niveau dargestellt. Um die Konzentration der Stamm-relevanten, schwachen Amplifikate aus der ersten PCR zu erhöhen, wurde bei der nested SAPD-PCR ein PCR-Beschleuniger (Enhancer Solution P, Peqlab) verwendet und die Reaktion wurde ohne Rampe durchgeführt. Dies führte zu einer spezifischeren Bindung der Primer an die DNA-Matrize und zu einer Nivellierung der Intensitäten der PCR-Amplifikate. Durch die Erweiterung des Primers in der nested PCR, also zum Beispiel dem Gebrauch von Primer A-Not-A (5'-GCGGCCGCAA-3') in Kombination mit dem PCR-Produkt aus der SAPD-PCR, dass unter Verwendung des Primers A-Not (5'-AGCGGCCGCA-3') erzeugt wurde, wird der Einfluss nicht-reproduzierbarer PCR-Amplifikate gemindert. In diesem Punkt ist die nested SAPD-PCR der RAPD PCR überlegen. Gegenüber anderen Fingerprint-Verfahren, wie beispielsweise der RFLP-PFGE oder RAPD PCR überzeugt die nested SAPD-PCR durch ein höheres Auflösungsvermögen, eine hohe Reproduzierbarkeit und die relativ schnelle, einfache und kostengünstige Durchführbarkeit. Der größte Vorteil der nested

SAPD-PCR gegenüber bekannten DNA Fingerprint-Verfahren ist die universelle Einsetzbarkeit für alle Organismen. Bisher konnte die Methode bei allen untersuchten Organismen-Gruppen, selbst bei Organismen mit sehr konserviertem Genom (*Oenococcus oeni*) angewandt werden, ohne zuvor eine Vielzahl zufällig ausgewählter Primern untersuchen zu müssen. Der gesamte Primersatz, der für die nested SAPD-PCR entwickelt wurde umfasst vergleichsweise nur 20 Primer. Dank ihrer universellen Einsetzbarkeit für alle Organismen ist die nested SAPD-PCR eine ausgezeichnete Methode, um die Art-Zugehörigkeit von Stämmen zu überprüfen und Stämme innerhalb einer Art zu differenzieren. Allerdings muss wie bei anderen Fingerprint-Techniken sichergestellt werden, dass es sich bei den zu untersuchenden Proben nicht um Mischkulturen handelt. Ein durch SAPD-PCR erzeugtes DNA Fingerprint-Bandenmuster unter Verwendung einer DNA-Mischung kann die Identifizierung einer bestimmten Spezies stark einschränken bzw. unmöglich machen. Die Auswertung mehrerer Gelbilder, die durch die Amplifikation der gleichen DNA in der nested SAPD-PCR mit verschiedenen Primern entstanden waren zeigte, dass Fehler, die durch das Auftreten oder dem Verschwinden einzelner Gelbanden entstehen können minimiert werden (Pfannebecker, 2005). So wurden für jede Cluster-Analyse mindestens drei Gelbilder ausgewertet.

4.8.1 Milchsäurebakterien

Art-Identifizierung und Cluster-Analyse der Pediokokken

Zur Artidentifizierung der Pediokokken wurden unterschiedliche molekularbiologische Verfahren entwickelt. Satokari et al. (2000) benutzten einen Restriktionsverdau des kompletten Genoms zur Differenzierung der *Pediococcus*-Arten *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus* und *P. pentosaceus*. Bei dieser auch als Ribotyping bezeichneten Methode wurde die DNA der Zellen mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Hybridisierung mit rDNA-Sonden detektiert. Es wurde festgestellt, dass einige Stämme der Arten *P. dextrinicus*, *P. inopinatus* und *P. parvulus*, die aus verdorbenem Bier isoliert wurden durch biochemische Tests (API 50 CHL, Bio-Mérieux, Nürtingen) entweder fälschlicherweise als *P. damnosus* identifiziert wurden oder nicht identifiziert werden konnten. Darüber hinaus konnten geringe Unterschiede zwischen Bandenmustern verschiedener Stämme einer Art detektiert werden. Ein ähnliches Verfahren zur Identifizierung verschiedener *Pediococcus*-Arten durch Ribotyping wurde von Barney et al. (2001) unter Verwendung weiterer Restriktionsenzyme

durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass das Subspeziesniveau durch die Verwendung der Restriktionsenzyme *Pst*I und *Pvu*II besser aufgelöst werden konnte als durch *Eco*RI. Fingerprint-Methoden wie der Restriktionsverdau amplifizierter 16S rDNA-Sequenzen (16S-ARDRA) (Rodas et al., 2003), wurden zur Unterscheidung weinrelevanter Milchsäurebakterien der Gattungen *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* und *Oenococcus* durchgeführt. Während die meisten untersuchten Bakterien durch den Verdau ihrer 16S rDNA mit den Restriktionsendonukleasen *Mse*I und / oder *Bfa*I und *Alu*I differenziert werden konnten, reichte diese Vorgehensweise nicht aus, um verwandte Arten wie *L. plantarum* und *L. pentosus* zu differenzieren. Die Differenzierung durch 16S-ARDRA ist aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zwischen den ribosomalen Gene einiger nah verwandter Arten eingeschränkt. Nigatu et al. (1998) nutzten die RAPD PCR, um sieben Arten der Gattung *Pediococcus* zu differenzieren. Sie konnten 116 Stämme durch den Vergleich ihrer DNA Fingerprint-Bandenmuster einer bestimmten Art zuordnen. Die Puls Feld Gelelektrophorese mit DNA-Fragmenten (RFLP-PFGE) wurde zur Unterscheidung von Stämmen einiger *Pediococcus*-Arten auf Art- und Stammniveau durchgeführt (Luchansky et al., 1992, Barros et al., 2001). Simpson et al. (2002) untersuchten *Pediococcus*-Stämme von sechs verschiedenen Arten durch RAPD PCR und RFLP-PFGE. Dabei wurde festgestellt, dass die Ergebnisse der Stamm-Identifizierung durch RAPD PCR nicht in allen Fällen mit denen der PFGE übereinstimmten. Einige Stämme wurden je nach verwendetem Primer in der RAPD PCR unterschiedlichen Arten zugeordnet. Ferner war die RFLP-PFGE in dieser Studie im Vergleich zur RAPD PCR besser geeignet, um Stämme zu differenzieren.

In dieser Arbeit konnten alle *Pediococcus*-Typstämme durch SAPD-PCR anhand ihres charakteristischen DNA Fingerprint-Bandenmuster differenziert werden. Dabei waren alle in der SAPD-PCR verwendeten Primer geeignet, ein charakteristisches Bandenmuster zu erzeugen (Abb. 14 und 15). Die Ergebnisse der Art-Identifizierung von insgesamt 97 *Pediococcus*-Stämmen durch 23S rDNA basierende Multiplex PCR (Tab. 11 und Tab. 12), konnten in allen Fällen durch SAPD-PCR verifiziert werden. Dabei reichte bereits der erste PCR-Schritt aus, um eine sichere Artzuordnung anhand der DNA Fingerprint-Bandenmuster zu gewährleisten (siehe Kap. 8.4). Für *P. parvulus* konnte eine Homogenität von 65 % zwischen den Fingerprint-Bandenmustern unterschiedlicher Stämme berechnet werden. Mora et al. (2000) untersuchten *P. acidilactici*-Stämme durch RAPD PCR. Dabei wurde festgestellt, dass einige Stämme dieser Art ein heterogenes Bandenmuster zeigten. Diese Beobachtungen stimmen mit den heterogenen DNA Fingerprint-Bandenmustern

zwischen den in dieser Arbeit durch SAPD-PCR untersuchten *P. acidilactici*-Stämme (Abb. 16) überein. Eine noch größere Heterogenität konnte in der vorliegenden Arbeit zwischen den *P. dextrinicus*-Stämmen beobachtet werden (Abb. 16). Dadurch wurde die Art-Identifizierung dieser Stämme erschwert. Größere Unterschiede im Bandenmuster der *P. dextrinicus*-Stämme wurden auch von Simpson et al. (2002) bei der Untersuchung derselben Stämme durch RFLP-PFGE und RAPD PCR festgestellt. Satokari et al. (2000) untersuchten *P. dextrinicus*-Stämme durch Ribotyping und stellten fest, dass sich Stamm DSMZ 20293 vom *P. dextrinicus*-Typstamm (DSMZ 20335^T) unterschied. Daraufhin wurde Stamm DSMZ 20293 als Kandidat zur Schaffung einer neuen Spezies vorgeschlagen. Die Cluster-Analyse der neun *Pediococcus*-Typstämme führte zu einem Stammbaum, der größtenteils unterschiedliche Verwandtschaftsverhältnisse zeigte, als der phylogenetische 23S rDNA-Stammbaum (Abb. 17). Nur die beiden Arten, *P. damnosus* und *P. inopinatus* waren in beiden Analysen nah verwandt. Dagegen befand sich beispielsweise die Art *P. parvulus* auf einem unterschiedlichen Cluster. Weitere Unterschiede waren die entferntere Verwandtschaft der Art *P. acidilactici* zu den typischen Pediokokken und die nahe Verwandtschaft von *P. stilesii* zu *P. parvulus* bei der Cluster-Analyse. Bei früheren Vergleichen von Cluster-Analysen mit phylogenetischen Stammbäumen konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Simpson et al. (2002) untersuchten die Typstämme der Arten *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus*, *P. pentosaceus*, *P. acidilactici* und *P. dextrinicus* durch RAPD PCR und führten Cluster-Analysen durch. Beim Vergleich der Cluster-Analysen mit 16S rDNA-Stammbäumen stellten sie ebenfalls fest, dass sich die Verwandtschaftsverhältnisse in den Cluster-Analysen von denen der phylogenetischen Analysen unterschieden. Zum Beispiel zeigten die Typstämme der Arten *P. damnosus* und *P. parvulus* sehr unterschiedliche RAPD-Bandenmuster, und konnten durch Cluster-Analyse nicht zusammen gruppiert werden, während der phylogenetische Stammbaum eine viel nähere Verwandtschaft zeigte. Es ist vorstellbar, dass die hohe genetische Variabilität der Stämme einiger Arten (z.B. *P. acidilactici*) dazu führt, dass die Ergebnisse der Cluster-Analyse nicht durch die Analyse eines einzelnen Genes widerspiegelt werden können. Diese Tatsache könnte die unterschiedlichen Baum-Topologien beim Vergleich der Cluster-Analyse mit der 23S rDNA basierenden phylogenetischen Analyse erklären.

Identifizierung und Cluster-Analyse der *Oenococcus oeni*-Stämme

Zur Identifizierung der Spezies *Oenococcus oeni* wurden unterschiedliche molekularbiologische Methoden beschrieben. Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) hat sich als

geeignet herausgestellt, um *O. oeni* direkt in Weinproben zu detektieren. In früheren Untersuchungen wurde diese Technik unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Sonden, die an spezifische Regionen der rRNA binden erfolgreich angewandt (Fröhlich et al., 2003, Hirschhäuser et al., 2005). Andere Methoden wie Ribotyping (Viti et al., 1996) und RFLP-Analysen der 16S rDNA (Sato et al., 2000) waren zur Art-Identifizierung geeignet. Eine Anwendung der SAPD-PCR in dieser Arbeit war die Artidentifizierung neu isolierter *O. oeni*-Stämme aus rheinhessischen Weinproben. Alle Stämme konnten aufgrund ihres charakteristischen DNA Fingerprint-Bandenmusters durch den Vergleich mit den Bandenmustern bekannter Arten eindeutig identifiziert werden (Abb. 18). Die SAPD-PCR stellt eine einfach durchführbare und kostengünstige Identifizierungsmethode dar, mit der Mikroorganismen relativ schnell identifiziert werden können. So konnte in diesem Beispiel auf eine 16S rDNA-Sequenzierung zur Art-Identifizierung verzichtet werden.

Bei der Untersuchung der 16S-23S Intergenic Spacer Region (ITS1) mehrerer *O. oeni*-Stämme wurde festgestellt, dass das Genom sehr konserviert ist (Zavaleta et al., 1997 a; Le Jeune & Lonvaud-Funel, 1997). Die gleiche Beobachtung wurde auch bei der Untersuchung von *O. oeni*-Stämmen durch Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)-Analyse der 16S rDNA gemacht. Alle untersuchten Stämme zeigten ein sehr ähnliches Bandenmuster (Viti et al., 1996). Zur Unterscheidung von *O. oeni*-Stämmen konnte die Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) erfolgreich angewandt werden. Kelly et al. (1993) fanden heraus, dass die Restriktionsenzyme *NotI* und *SfiI* zur Differenzierung einiger *O. oeni*-Stämme geeignet waren. Jedoch konnte das Stamm-Niveau nicht bei allen untersuchten Oenokokken aufgelöst werden. Weitere Restriktionsenzyme wie *ApaI*, *AscI* und *SmaI* wurden in ähnlichen Studien zur Stamm-Differenzierung durch PFGE verwendet (Daniel et al., 1993; Lamoureux et al., 1993; Tenreiro et al., 1994; Guerrini et al., 2003). Larisika et al. (2008) untersuchten 65 *O. oeni*-Stämme aus sechs deutschen Weinanbaugebieten durch PFGE nach Verdau mit den Restriktionsenzymen *SfiI*, *NotI* und *ApaI*. Anhand der Cluster-Analyse von 54 *O. oeni*-Stämmen, deren DNA mit *SfiI* geschnitten wurde, konnte keine eindeutige Regionsbezogenheit der Stämme aus demselben Anbaugebiet nachgewiesen werden. Zavaleta et al. (1997 b) nutzten die Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) PCR zur Differenzierung von 70 *O. oeni*-Stämmen. Mehrere RAPD PCR Ansätze mit 10 unterschiedlichen Primern zeigten, dass aufgrund des konservierten Genoms die DNA Fingerprint-Bandenmuster der *O. oeni*-Stämme im Vergleich zu RAPD PCR-Analysen mit anderen Spezies (z.B. *E. coli*; *L. monocytogenes*) sehr homogen waren. Die Cluster-Analyse zeigte, dass die Bandenmuster der meisten Stämme zu 80-100 %

identisch waren. Trotz der geringen Diversität führte die Cluster-Analyse der Stämme zu zwei klar abgegrenzten Gruppen. Darüber hinaus wurde ein Zusammenhang zwischen der Gruppierung der Stämme und ihrer geografischen Herkunft festgestellt. In weiteren Studien wurde durch unterschiedliche Methoden bestätigt, dass das *O. oeni*-Genom hoch konserviert ist (Zè Zè et al., 2000; Sato et al., 2001; Guerrini et al., 2003). Zapparoli et al. (2000) untersuchten 60 *O. oeni*-Stämme durch PFGE und RAPD PCR. In dieser Studie war die RAPD PCR besser zur Stammdifferenzierung geeignet. Die Cluster-Analyse der durch RAPD PCR untersuchten Stämme zeigte eine Gruppierung von Stämmen, die aus der gleichen Region isoliert wurden. Die DNA Fingerprint-Bandenmuster einiger Stämme, die aus Weinen desselben Weingutes isoliert wurden waren zu 92 % identisch. Guerrini et al. (2003) konnten erst nach der Kombination einer phänotypischen (Fettsäureanalyse) und einer genotypischen Methode (PFGE) ein Zusammenhang zwischen dem Clustern von Stämmen aus den gleichen Regionen beobachten.

Bei der SAPD-PCR Identifizierung neu isolierter *O. oeni*-Stämme aus Weinproben (Abb. 18) und Starterkulturen (Abb. 19) wurde festgestellt, dass die DNA Fingerprint-Bandenmuster der untersuchten Stämme nach dem ersten PCR-Schritt recht homogen waren. Zum Beispiel konnte bei der Verwendung von Primer C-Not eine Homologie von 75 % zwischen den Bandenmustern unterschiedlicher Stämme ermittelt werden. Erst durch nested SAPD-PCR konnte eine höhere Diversität zwischen den Bandenmustern der Stämme erzielt werden (Abb. 20 und 21). Diese Unterschiede im Bandenmuster reichten aus, um eine Cluster-Analyse mit *O. oeni*-Stämmen aus der institutseigenen Kulturensammlung durchzuführen (Abb. 22). Für die Analyse wurden die Datenmatrizen kombiniert, die aus der Auswertung dreier Gelbilder generiert wurden. 13 der 19 untersuchten *O. oeni*-Stämme wurden bereits in einer früheren Arbeit durch nested SAPD-PCR und Cluster-Analyse untersucht (Pfannebecker, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden dieselben Primer zur nested SAPD-PCR verwendet, wie in der Analyse 2005. Die Verwandtschaftsverhältnisse der 13 Stämme, die in beiden Arbeiten untersucht wurden stimmten in nahezu allen Fällen überein. Geringe Unterschiede im Vergleich zur Cluster-Analyse von 2005 zeigten Stämme B358 und B377, wobei Stamm B377 in der Analyse 2005 näher mit Stamm B358 verwandt war. Immerhin befanden sich diese Stämme, die aus dem gleichen Weingut isoliert wurden, auf dem gleichen Cluster, so dass eine Zuordnung der Stämme dennoch gewährleistet war. Der zweite Unterschied zur Cluster-Analyse von 2005 war, dass Stamm B325 näher mit Stamm SK3 verwandt war. Dennoch befanden sich die Stämme auch in diesem Fall auf dem gleichen Cluster. Die geringen Unterschiede der Baum-Topologie im

Vergleich zur früheren Cluster-Analyse resultierten möglicherweise aus dem Einbeziehen weiterer Stämme in die Analyse, die die Verwandtschaftsverhältnisse der Stämme zueinander änderten. Ein weiterer Grund für die leicht unterschiedliche Baum-Topologie kann die Verwendung einer anderen Software zur Auswertung der Gelbilder sein. In der früheren Cluster-Analyse wurden die Gelbilder durch die Software TINA 2.0 (Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt) ausgewertet. Dabei wurde neben Vorhandensein und Abwesenheit einzelner Gelbanden auch die Intensität der Gelbanden mit in die Analyse einbezogen. So erhielten stärkere Banden eine höhere Gewichtung bei der Auswertung als schwächere Gelbanden (Pfannebecker, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden die Gelbanden mit der Software Bio-1D (Vilber-Lourmat, Eberhardzell) nur bezüglich des Vorhandenseins oder der Abwesenheit der Gelbanden ausgewertet. Trotz des Einbeziehens weiterer Stämme in die Cluster-Analyse und der Verwendung einer anderen Software zur Auswertung waren die Ergebnisse bis auf zwei kleinere Unterschiede vollständig reproduzierbar. Die hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zur Cluster-Analyse von *O. oeni*-Stämmen unterstützt die Eignung der nested SAPD-PCR als generelle Methode zur Cluster-Analyse auf Stamm-Niveau. So kann die Methode zur Rückverfolgbarkeit bestimmter Stämme verwendet werden, zum Beispiel um die Identität desselben Stammes aus unterschiedlichen Chargen einer Starterkultur zu überprüfen und damit die Qualität des Produkts zu sichern.

Identifizierung der Milchsäurebakterien aus Starterkulturen

Eine Anwendung der SAPD-PCR war die Artidentifizierung der Milchsäurebakterien aus Starterkulturen. Dabei konnte die Spezies *P. acidilactici* anhand des Vergleichs der DNA Fingerprint-Bandenmuster verschiedener Isolate mit dem Bandenmuster des Typstammes (DSM 20284^T) identifiziert werden. Die Bandenmuster der *P. acidilactici*-Stämme, die aus unterschiedlichen Chargen einer kommerziell erhältlichen Starterkultur isoliert wurden, unterschieden sich geringfügig vom Bandenmuster des Typstammes. Zwischen den verschiedenen Stämmen, die aus Starterkulturen isoliert wurden, waren die Bandenmuster zu 100 % identisch, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich in allen Fällen um denselben Stamm handelt. Neben den *P. acidilactici*-Stämmen wurden aus den gleichen Starterkulturen weitere Milchsäurebakterien isoliert. Die Bakterien fielen auf, da sie beim Wachstum auf MRS-Agar größere Kolonien bildeten im Vergleich zu den *P. acidilactici*-Stämmen. Die Bakterien konnten zunächst nicht anhand ihres DNA Fingerprint-Bandenmusters identifiziert werden. Durch 16S rDNA-Sequenzierung und vergleichende

Sequenzanalysen konnten die Isolate schließlich als *Enterococcus faecium* identifiziert werden. Beim Vergleich der DNA Fingerprint-Bandenmuster der *Enterococcus*-Stämme wurde festgestellt, dass das Bandenmuster zu 100 % identisch war. Auch bei diesen Isolaten aus unterschiedlichen Chargen handelte es sich sehr wahrscheinlich um denselben Stamm. Die Art-Identifizierung und der Vergleich von Stämmen aus Starterkulturen zeigten eine weitere Anwendung der SAPD-PCR. Durch die universelle Einsetzbarkeit der Primer konnten auch Stämme von *Enterococcus faecium* untersucht werden, von denen zunächst nicht erwartet wurde, dass sie in den Starterkulturen enthalten sind.

Untersuchung weiterer Milchsäurebakterien

Neben der Untersuchung der Pediokokken und Oenokokken wurden weitere Milchsäurebakterien durch SAPD-PCR untersucht. Darunter befanden sich verschiedene Arten der Gattungen *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* und *Streptococcus* (Abb. 24). Die Spezies *L. mesenteroides* lässt sich in drei Subspezies *mesenteroides*, *cremoris* und *dextranicum* unterteilen (Garvie, 1983). Die Subspezies unterscheiden sich phänotypisch bezüglich der Verwertung bestimmter Zucker (Garvie, 1986 a). Auf Basis ihrer rRNA-Gene unterscheiden sich die Subspezies nur um einzelne Nukleotide bzw. sind zu 100 % identisch (Björkroth & Holzapfel, 2006). Cibik et al. (2000) untersuchten Stämme verschiedener *Leuconostoc*-Arten durch 16S rDNA-Sequenzierung und RAPD PCR. Während die Art-Unterscheidung durch die angewandten Methoden erfolgreich durchgeführt werden konnte, war es nicht möglich die drei *L. mesenteroides*-Subspezies zu unterscheiden. Dagegen konnten die drei Subspezies durch eine von Guerrini et al. (2003) durchgeführte RAPD PCR differenziert werden. Auch die in dieser Arbeit angewandte SAPD-PCR unter Verwendung des Primers C-Not war geeignet, um die Typstämme der drei Subspezies klar zu differenzieren (Abb. 24). Dagegen zeigten die durch SAPD-PCR mit Primer A-Not erzeugten DNA Fingerprint-Bandenmuster der drei *L. mesenteroides*-Subspezies eine höhere Homogenität (Abb. 51). Die beiden nah verwandten Arten, *L. pseudomesenteroides* und *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, deren 16S rDNA zu 99,5 % identisch ist (Björkroth & Holzapfel, 2006) konnten ebenfalls durch SAPD-PCR differenziert werden (Abb. 51). Durch die Differenzierung nah verwandter Spezies bzw. Subspezies wurde das hohe Auflösungsvermögen der nested SAPD-PCR bestätigt.

Eine weitere Anwendung der SAPD-PCR war die Differenzierung *Enterococcus*-Arten. Die Gattung *Enterococcus* umfasst über 30 Arten. Zur Art-Identifizierung wurden verschiedene molekularbiologische Methoden wie die Sequenzierung der 16S rDNA

(Williams et al., 1991; Patel et al., 1998) und der ITS1-Region (Tyrrell et al., 1997) durchgeführt. Während die Unterscheidung einiger Arten basierend auf dem Sequenzvergleich dieser Gene ausreichte, konnten nahe verwandte Arten wie *E. faecalis* und *E. faecium* nicht differenziert werden. Dutka-Malen et al. (1995) führten eine Multiplex PCR durch, mit der sie die beiden Arten *E. faecalis* und *E. faecium* aufgrund unterschiedlicher Gensequenzen ihrer D-Alanin-Ligasen (*ddlE*-Gene) identifizieren konnten. Die Unterscheidung der beiden Arten *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* beruhte auf Sequenzunterschieden in den Genen *vanC-1* und *vanC-2*, die für Vancomycin-Resistenzen kodieren. Obwohl die Art-Identifizierung in dieser Multiplex PCR gut funktionierte, war die Methode doch eingeschränkt, da nur vier Arten identifiziert werden konnten. Eine Unterscheidung weiterer Arten konnte durch RAPD PCR erfolgreich durchgeführt werden. So konnten Descheemaeker et al. (1997) die Arten *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* unterscheiden. Quednau et al. (1998) konnten alle klinisch relevanten Arten anhand ihrer DNA Fingerprint-Bandenmuster differenzieren ohne eine computergestützte Auswertung durchführen zu müssen. Die charakteristischen DNA Fingerprint-Bandenmuster der Arten *E. faecalis*, *E. faecium* und *E. durans*, die in der vorliegenden Arbeit durch SAPD-PCR generiert wurden (Abb. 23 und 24) zeigten, dass die SAPD-PCR zur Differenzierung der untersuchten *Enterococcus*-Arten geeignet war. Durch nested SAPD-PCR konnte darüber hinaus eine Differenzierung auf Stamm-Niveau erreicht werden. Auch in dieser Arbeit konnten die betreffenden Arten anhand ihres Fingerprint-Bandenmusters ohne die Notwendigkeit eines speziellen Auswertesystems identifiziert werden. Zur Frage, ob die nested SAPD-PCR auch zur Identifizierung weiterer *Enterococcus*-Arten geeignet ist, müssten weitere Versuche durchgeführt werden.

Vergleichende Sequenzanalysen der 16S rDNA reichen in einigen Fällen nicht aus, um nah verwandte *Lactobacillus*-Arten zu unterscheiden (Fox et al., 1992). So besteht zum Beispiel zwischen den 16S rRNA-Genen der Arten *L. plantarum*, *L. pentosus* und *L. paraplantarum* eine Sequenzähnlichkeit zwischen 99,7 und 99,9 %. Aus diesem Grund mussten andere molekularbiologische Nachweisverfahren zur Art-Identifizierung entwickelt werden. Für die Identifizierung der Arten *L. plantarum*, *L. pentosus* und *L. paraplantarum* wurden Sonden entwickelt, die gegen zufällig amplifizierte Genfragmente oder definierte Gene (*pyrDEF*) gerichtet waren (Bringel et al., 1996; Quere et al., 1997). Die ITS-Regionen zwischen den rRNA-Gensequenzen sind variabler als die rRNA-Gene und konnten in mehreren Studien zur Identifizierung einiger Arten verwendet werden (Tilsala-Timisjarvi & Alatossava, 1997; Berthier & Ehrlich, 1998; Chen et al., 2000; Tan-

nock et al., 1999). DNA-Fingerprintverfahren wie die 16S-ARDRA wurden in einigen Arbeiten zur Identifizierung der Spezies *L. delbrueckii*, *L. helveticus* (Moschetti et al., 1997; Giraffa et al., 1998; Bouton et al., 2002), der *L. casei*- und *L. acidophilus*-Gruppe (Roy et al., 2001) und weiteren *Lactobacillus*-Arten (Ventura et al., 2000) angewandt. Zahlreiche Methoden, wie Ribotyping, RAPD PCR, RFLP-PFGE und AFLP wurden zur Identifizierung verschiedener *Lactobacillus*-Arten bis hin zum Stamm-Niveau entwickelt. Die SAPD-PCR-Versuche mit verschiedenen *Lactobacillus*-Arten unterstreichen die universelle Einsetzbarkeit dieser Methode zur Art-Identifizierung. So konnten die Arten *L. hilgardii*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. parabuchneri*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. suntoryeus*, *L. paralimentarius* und *L. frumenti* anhand ihrer charakteristischen DNA Fingerprint-Bandenmuster voneinander abgegrenzt werden (Abb. 24). Die Methode stellt eine Alternative zu bereits beschriebenen DNA Fingerprint-Methoden dar.

4.8.2 Hefen

Cluster-Analyse der *Dekkera* / *Brettanomyces bruxellensis*-Stämme

Hefen der Gattungen *Brettanomyces* / *Dekkera* treten immer wieder während der Fermentierung bestimmter Getränke (z.B. Bier, Apfelwein, Sekt und Wein) auf. In der Weinbereitung sind sie häufig verbreitet, und zählen zu den Schädlingshefen. Durch die Bildung charakteristischer Sekundärmetabolite wie 4-Ethylphenol, 4-Ethylguajakol und höherer Alkohole wie Isoamylalkohol kann es zu einer geschmacklichen Veränderung des Weins kommen (Romano et al., 2008). Die klassischen Methoden für die Identifizierung und Zellzahlbestimmung von Hefen der Gattungen *Dekkera* / *Brettanomyces* beruhen auf der Kultivierung auf semiselektivem Medium mit anschließender Charakterisierung durch biochemische und physiologische Tests, sowie durch mikroskopische Prüfung (Fugelsang, 2007). Molekulare Verfahren zur Hefe-Identifizierung durch direkte DNA-Analyse haben die Identifizierung beschleunigt und die Ergebnisse sicherer gemacht. Basierend auf dem mitochondrialen Genom (Hoeben & Clark-Walker, 1986; Martorell et al., 2005) und der rRNA-Gene (Molina et al., 1993 b) wurden molekularbiologische Studien der Arten innerhalb der Gattungen *Dekkera* / *Brettanomyces* durchgeführt. Molina et al. (1993 b) führten eine Restriktionsanalyse der 18S rDNA verschiedener *Brettanomyces*-Hefen durch und fanden Übereinstimmungen der Ergebnisse mit Isoenzym-Elektrophorese und DNA-DNA-Hybridisierung. Weitere Untersuchungen von Teilsequenzen der 18S und 26S rRNA-Gene wurden von Yamada et al. (1994) und Cai et al. (1996) durchgeführt. Ibeas et al. (1996)

benutzten eine nested PCR-Methode, um *Brettanomyces*-Stämme in Sherrywein nachzuweisen. Alternativ dazu wurden ribosomale Gene verwendet, um Auskunft über phylogenetische Beziehungen zu geben. RFLP-Analysen der rDNA und vergleichende Sequenz-Analysen der zwei ITS-Regionen mit *Brettanomyces* / *Dekkera*-Typstämmen und Wein-Isolaten wurden von Egli & Henick-Kling (2001) durchgeführt. Es wurden Oligonukleotide für jede *Brettanomyces* / *Dekkera*-Spezies entworfen, die eine Art-spezifische Unterscheidung ermöglichten. Die Untersuchungen der *Brettanomyces* / *Dekkera*-Isolate aus Wein zeigten, dass alle Stämme der Spezies *B. bruxellensis* angehörten. Delaherche et al. (2004) entwickelten eine auf Real Time PCR basierende Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von *B. bruxellensis* in Wein. Mit diesem Nachweissystem konnten 10^4 KBE / ml nachgewiesen werden. Zur direkten Identifizierung von *Brettanomyces bruxellensis* in Wein wurde die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) mit Sonden die gegen die SSU bzw. LSU rRNA gerichtet waren durchgeführt (Stender et al., 2001; Röder et al., 2007). Mitrakul et al. (1999) verwendeten die RAPD PCR um Hefe-Stämme innerhalb der Spezies *B. bruxellensis* zu differenzieren. Obwohl die Stammdifferenzierung gut durch die RAPD PCR funktionierte, waren die Ergebnisse dieser Methode nur schwer reproduzierbar. Miot-Sertier & Lonvaud-Funel (2007) untersuchten mehrere DNA Fingerprint-Methoden zur Unterscheidung von *B. bruxellensis*-Stämmen. Während RAPD PCR, Mikrosatelliten-Analyse und die Amplifizierung von Restriktionsfragmenten (SAU-PCR) für die Differenzierung weniger geeignet waren, konnte das Stamm-Niveau durch RFLP-PFGE besser aufgelöst werden. Curtin et al. (2007) untersuchten 244 *B. bruxellensis*-Stämme aus 31 Regionen Australiens durch eine AFLP-Methode und 26S rDNA-Sequenzierung. Durch AFLP konnten acht Genotypen unterschieden werden. Drei der acht Genotypen waren über mehrere Regionen verteilt. So zeigten Stämme, die aus unterschiedlichen Regionen und Weingütern isoliert wurden, dasselbe DNA Fingerprint-Bandenmuster. Es konnte daher keine Regionsbezogenheit der Stämme mit identischen Bandenmustern nachgewiesen werden. Bei den weiteren fünf Genotypen handelte es sich jeweils um einzelne Stämme. Durch die teilweise Sequenzierung der 26S rDNA konnten die Stämme in drei phylogenetische Gruppen eingeteilt werden.

Um einzelne *Brettanomyces bruxellensis*-Stämme differenzieren zu können, sind diese Methoden nicht geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde die nested SAPD-PCR zur Differenzierung von 40 *B. bruxellensis*-Stämmen angewandt. Alle Stämme aus rheinhessischen Weinproben zeigten nach der ersten PCR ein für *B. bruxellensis* charakteristisches DNA Fingerprint-Bandenmuster verglichen mit dem Bandenmuster des Typstammes

(Abb. 25). Durch die nested PCR mit den Primern A-Not-C, A-Not-G und A-Not-T wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen deutlicher (Abb. 26). Für die Cluster-Analyse wurde die Auswertung der drei Gelbilder kombiniert. Der nach der UPGMA-Methode berechnete Stammbaum unterteilte die Stämme in fünf Gruppen (Cluster I-V) (Abb. 27). Die Ergebnisse der Cluster-Analyse wurden mit der geographischen Herkunft der Isolate verglichen (Abb. 28). Dabei wurde festgestellt, dass alle Stämme die den Clustern I, II und III angehörten aus der Region Wonnegau und Nierstein isoliert wurden. Die Stämme, die aus den nördlichen Anbaugebieten Mainz, Bingen und von der Nahe isoliert wurden, zeigten einen eigenen Genotyp (Cluster IV). Zwei Stämme die aus Weinsberg (Baden-Württemberg) isoliert wurden, bildeten einen Cluster (V) mit zwei Stämmen aus der Region Wonnegau. Die Gruppierung der Stämme, die aus den gleichen Regionen eines Weinanbaugebietes isoliert wurden spiegelte das gute Auflösungs-vermögen der nested SAPD-PCR wieder. Im Vergleich zur AFLP-Analyse (Curtin et al., 2007) konnte trotz des wesentlich kleineren Einzugsgebietes der untersuchten Stämme eine Regionsbezogenheit durch nested SAPD-PCR nachgewiesen werden. Eine Differenzierung auf Stammniveau bildet in jedem Fall die Basis für eine Rückverfolgbarkeit („Traceability“) von weinrelevanten Mikroorganismen.

Untersuchung weiterer Hefen

Eine sichere Hefe-Identifizierung ist oft problematisch. Die klassischen Nachweisverfahren beruhen auf phänotypischen Merkmalen, wie der Verwertung bestimmter Zucker. Die Durchführung dieser Methoden ist oft zeitaufwendig und die Ergebnisse können aufgrund der unterschiedlichen Stoffwechseleigenschaften verschiedener Stämme unzuverlässig sein. Die genaue Differenzierung der Arten *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus* und *S. pastorianus* ist wegen ihrer bedeutenden Rolle als Starterkulturen in der Lebensmittelindustrie besonders wichtig. Es wird angenommen, dass *S. pastorianus* aus einer natürlichen Kreuzung von *S. cerevisiae* mit *S. bayanus* entstanden ist (Vaughan Martini & Martini, 1987). Dafür spricht die Tatsache, dass die Chromosomensätze beider Arten, *S. cerevisiae* und *S. bayanus* in diesem Hybrid enthalten sind (Kielland-Brandt et al., 1995; Tamai et al., 1998). Zur Identifizierung der *Saccharomyces*-Hefen wurden zahlreiche Methoden beschrieben. So wurden artspezifische Primer zur PCR-Identifizierung entwickelt (Ryu et al., 1998; Josepa et al., 2000; Torriani et al., 2004) und ITS-Analysen (Montrocher et al., 1998; Ganley et al., 2005) durchgeführt. Zur Differenzierung auf Subspeziesniveau wurden Methoden wie die Minisatelliten- (Mannazzu et al., 2002; Marinangeli et al., 2004) und

Mikrosatelliten-Analysen (Baleiras Couto et al., 1996; Hennequin et al., 2001) angewandt. Darüber hinaus waren Fingerprint-Methoden wie die RFLP- (Molina et al., 1993 a; Masneuf et al., 1996; Fernandez-Espinar et al., 2000) und AFLP-Methode (Azumi & Goto-Yamamoto, 2001; Lopandic et al., 2007) hilfreich zur Differenzierung von Stämmen. Weitere angewandte Fingerprint-Methoden sind die RAPD PCR (Baleiras Couto et al., 1996, Torriani et al., 1999; Xufre et al., 2000; Bujdoso et al., 2001), repetitive extragenic palindromic (REP)- und enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR (Hierro et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die drei Typstämme der Hefen *S. cerevisiae*, *S. bayanus* und *S. pastorianus* durch SAPD-PCR differenziert werden können und ob Verwandtschaftsverhältnisse dieser Hefen durch Cluster-Analyse nachvollzogen werden können. Außerdem wurden einige Hefestämme aus kommerziell erhältlichen Starterkulturen untersucht. Es handelte sich um Starterkulturen, die vor allem zur Sektherstellung eingesetzt werden. Laut Angaben des Herstellers handelte es sich bei den Hefen um *S. bayanus* (SIHA 4 der Firma Begerow) und um *S. cerevisiae* var. *bayanus* (Hefix 2000, Oenoferm InterDry, Oenoferm Freddo der Firma Erbslöh). Durch Cluster-Analyse sollte überprüft werden, welcher *Saccharomyces*-Art diese Hefen angehören. Darüber hinaus wurden zwei weitere weinassoziierte Hefen, *Pichia anomala* und *B. bruxellensis* durch SAPD-PCR untersucht. Durch SAPD-PCR konnten die Hefen der Arten *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *Pichia anomala* und *B. bruxellensis* anhand eines charakteristischen DNA Fingerprint-Bandenmusters klar differenziert werden (Abb. 29 und 30). Damit besitzt diese Fingerprint-Methode Vorteile gegenüber Methoden, die auf der Untersuchung ribosomaler Gensequenzen basieren. Zum Beispiel waren die Sequenzunterschiede der ITS1-Region zwischen den beiden Arten *S. bayanus* und *S. pastorianus* zu gering, um Art-spezifische Primer generieren zu können (Josepa et al., 2000).

Die Untersuchung der Sekthefen aus Starterkulturen zeigte, dass die Bandenmuster am nächsten mit den Bandenmustern des *S. cerevisiae*-Typstammes übereinstimmten (Abb. 29 und 30). Die Auswertung der drei Gelbilder durch Cluster-Analyse zeigte noch deutlicher, dass die Sekthefen der Art *S. cerevisiae* angehören. Zusätzlich wurde die Art-Zugehörigkeit der Hefeisolate KOH1-KOH4 durch ITS-Sequenzierung bestätigt. Die Ergebnisse der Hefe-Identifizierung aus Starterkulturen bestätigten die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen. Sekthefen werden oft aufgrund bestimmter Stoffwechseleigenschaften, wie der Fermentierung von Galactose und einer erhöhten Ethanoltoleranz als

S. bayanus bezeichnet. Dabei handelt es sich meistens nicht um einen „echten“ *S. bayanus*-Stamm (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Durch eine RFLP-Analyse des *met2*-Genes lassen sich die Hefen *S. cerevisiae* und *S. bayanus* anhand des Auftretens oder der Abwesenheit einzelner Genfragmente unterscheiden (Hansen & Kielland-Brandt, 1994). Bei der Untersuchung von 82 Weinhefen durch diese RFLP-Methode wurde festgestellt, dass 47 Stämme die als *S. bayanus* deklariert waren in Wirklichkeit der Art *S. cerevisiae* angehörten (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Die Auswertung der SAPD-PCR Ergebnisse durch Cluster-Analyse zeigte, dass *S. pastorianus* näher mit *S. bayanus* verwandt war als mit *S. cerevisiae* (Abb. 31). Dieses Ergebnis entspricht der phylogenetischen Untersuchung dieser Hefen basierend auf ihren ITS1- und ITS2-Sequenzen (Ganley et al., 2005).

Die Möglichkeit zur Differenzierung der Hefe-Spezies unterschiedlicher Gattungen durch SAPD-PCR unterstreicht die universelle Einsetzbarkeit dieser Methode. Alle Primer waren zur Generierung eines charakteristischen DNA Fingerprint-Bandenmusters geeignet.

4.8.3 *Brettanomyces bruxellensis*- und *Pediococcus parvulus*-Stämme aus denselben Weinproben

Die Weinfermentation ist das Ergebnis der Vermehrung und der Stoffwechselaktivität zahlreicher Hefen und Bakterien. Nach der Fermentierung wird der Wein in der Regel durch eine Behandlung mit Schwefeldioxid stabilisiert. Schwefeldioxid besitzt neben einer antioxidativen Wirkung auch eine antimikrobielle Wirkung. Die Schwefelung des Weines soll zum Absterben aller Mikroorganismen führen. Trotzdem können einige tolerante Mikroorganismen überleben oder durch Kontaminierung nachträglich in den Wein gelangen. Durch die Stoffwechselaktivität dieser Mikroorganismen kann es zum Verderben der Weine während der Lagerung kommen. In manchen Fällen werden die betroffenen Weine erst nach der Abfüllung auffällig. Die zwei häufigsten Weinverderber in diesem Stadium sind Hefen der Gattungen *Dekkera* / *Brettanomyces* und Milchsäurebakterien der Gattung *Pediococcus* (Delaherche et al., 2004). *B. bruxellensis* besitzt aufgrund einer hohen Alkohol-toleranz, eines langsamen Wachstums und einem geringen Nährstoffanspruch einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Weinhefen. Die Ethanol-Toleranz dieser Hefe ist beträchtlich, und sie vermehrt sich in Sherry-Weinen mit bis zu 15 Vol. % Alkohol (Ibeas et al., 1996). Einige Stämme zeichnen sich durch eine erhöhte Toleranz gegenüber Schwefeldioxid aus (Dittrich & Großmann 2005). Ähnliche Eigenschaften besitzen auch die

Pediokokken. Es wurden Stämme mit einer erhöhten Ethanol-Toleranz (> 12 Vol. %), erhöhter Säure- und Schwefeldioxid-Toleranz (30 mg freies SO₂ / l) isoliert. Bei Exopolysaccharid-bildenden Stämmen konnte sogar ein Wachstum bei einer noch höheren SO₂-Konzentration (50 mg / l) beobachtet werden (Dittrich & Großmann 2005). Es wird angenommen, dass die Exopolysaccharid-Bildung eine Schutzfunktion dieser Bakterien gegen erhöhte Ethanol- und Schwefeldioxid-Konzentrationen darstellt. Insbesondere in Holzfass-gelagerten Rotweinen führen bestimmte Sekundärmetabolite (flüchtige Phenole) der *Dekkera* / *Brettanomyces*-Hefen zur Bildung des berüchtigten „*Brettanomyces*“ oder „Pferdeschweiß“-Tons (Suárez et al. 2007). Eine starke Acetat-Produktion und ihre Fähigkeit zur Ausbildung eines Mäusel-Tons (Snowdon et al. 2006) sind für diese Hefen darüber hinaus charakteristisch.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Hefen der Gattungen *Dekkera* / *Brettanomyces* und Milchsäurebakterien der Gattung *Pediococcus* aus denselben Weinen isoliert werden können. In neun der 100 untersuchten Weinproben konnten jeweils Stämme von *B. bruxellensis* (Röder, 2007) und *P. parvulus* isoliert werden. Die Verwandtschaft zwischen Stämmen der Hefe und den Stämmen des Bakteriums wurde jeweils durch nested SAPD-PCR unter Verwendung derselben Primer und Cluster-Analyse ermittelt (Abb. 32-35). Bei Gegenüberstellung der Stammbäume beider Arten zeigte sich eine große Übereinstimmung der Baum-Topologien von Stämmen, die aus denselben Weinproben isoliert wurden (Abb. 36). Nur bei Stämmen aus zwei Weinproben (9, 30) waren die Verwandtschaftsverhältnisse nicht identisch. Beim Vergleich der Stammbäume mit der Herkunft der Isolate konnten jeweils zwei Cluster beobachtet werden. Ein Cluster mit Stämmen, die aus den nördlichen Anbaugebieten Rheinhessens (Mainz, Bingen) und von der Nahe isoliert wurden und ein Cluster mit Stämmen, die aus Weinproben der südlichen Anbaugebiete (Wonnegau, Nierstein) isoliert wurden.

Obwohl keine echte Symbiose zwischen Hefen der Gattung *Brettanomyces* und Milchsäurebakterien der Gattung *Pediococcus* besteht, ist das gleichzeitige Vorkommen dieser Mikroorganismen in denselben Weinproben auffällig. Da diese Mikroorganismen ähnliche Eigenschaften in Bezug auf Ethanol- und Schwefeldioxid-Toleranz teilen und darüber hinaus an der Bildung von Ethylphenolen beteiligt sein können, ist es nicht verwunderlich, dass diese Mikroorganismen aus denselben Weinen isoliert werden konnten. Nur wenige Mikroorganismen sind an diese schwierigen Lebensbedingungen adaptiert. Die Fähigkeit einiger *Brettanomyces bruxellensis*-Stämme zur Ausbildung von Biofilmen (Joseph et al., 2007) könnte ein Grund für die Gesellschaftung mit anderen Mikroorganismen und deren

gleichzeitige Verbreitung sein. Darüber hinaus wurde bereits über das Vorkommen von *B. bruxellensis* und einigen *Pediococcus*-Arten in Biofilmen während der Bierherstellung berichtet (Timke et al., 2005). *B. bruxellensis* besitzt eine Hydroxyzimtsäure-Decarboxylase und ist daher nicht auf die Decarboxylierungsaktivität anderer Mikroorganismen bei der Synthese von Ethylphenolen angewiesen. Dennoch könnte die Hefe von der Decarboxylierungsaktivität anderer Mikroorganismen, wie *Pediococcus parvulus* profitieren.

4.8.4 Höhere Eukaryoten

Genomische Fingerprint-Analysen von Pflanzen und Tieren finden vor allem im Rahmen der Züchtung Verwendung, beispielsweise beim Nachweis von Mutationen oder eines gewünschten Züchtungsergebnisses. Bekannte Fingerprint-Methoden erfordern teilweise die Kenntnis bestimmter Ziel-DNA-Sequenzen oder liefern teilweise unspezifische und nicht reproduzierbare Ergebnisse. In zahlreichen Versuchen wurde bereits gezeigt, dass die nested SAPD-PCR zur Stammdifferenzierung von Bakterien, Hefen und Pilzen geeignet ist (Pfannebecker, 2005; Fröhlich & Pfannebecker, 2007; Hirschhäuser, 2007). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob durch die nested SAPD-PCR auch eine sichere und zuverlässige Verwandtschaftsanalyse höherer Eukaryoten durchgeführt werden kann.

Differenzierung der Weinreben (*Vitis* sp.)

Zur Weinherstellung wird die Edle Weinrebe *Vitis vinifera* subsp. *vinifera* kultiviert. Die Weinrebe gehört zu den ältesten Kulturpflanzen, die um 5000 v. Chr. schon den Ägyptern, den Babyloniern und den Indern bekannt war und kultiviert worden ist. Auch die alten Griechen und die Römer betrieben Weinbau. Von den Römern wurden die Reben nach Deutschland und nach Britannien gebracht (McGovern, 2003). Wegen der langen Geschichte der Kultivierung von Weinreben und dem nahezu weltweiten Anbau in den unterschiedlichsten Klimaten und Standorten entstand eine Vielzahl an verschiedenen Sorten. Diese wurden oft falsch identifiziert oder die gleiche Sorte wurde an verschiedenen Orten unterschiedlich bezeichnet. Dies führte dazu, dass die Abstammung vieler Kreuzungen bis heute unklar ist. Es ist bisher nur wenig über Unterschiede im Genom der verschiedenen Rebsorten bekannt. Zur Verwandtschaftsanalyse von Weinreben wurden verschiedene DNA Fingerprint-Methoden angewandt. Bowers et al. (1993) führten RFLP-Analysen an einigen vor allem in Kalifornien kultivierten Weinreben durch. Die Ergebnisse zeigten, dass bei zwei unterschiedlich bezeichneten Rebsorten „Zinfandel“ und

„Primitivo“ das gleiche DNA Fingerprint-Bandenmuster auftrat. Daraufhin wurde angenommen, dass es sich bei den beiden Rebsorten um ein und dieselbe Sorte handelte. Andererseits konnte durch die angewandte RFLP-Methode die Sorte Spätburgunder aber nicht von der genetisch nah verwandten Sorte Grauer Burgunder differenziert werden. Da diese beiden Sorten sich trotz der genetischen Verwandtschaft in der Ausprägung ihrer Gene stark unterscheiden, bedarf es geeigneter Methoden zur Differenzierung dieser Sorten. Die Analyse von kurzen, nicht kodierenden DNA-Sequenzwiderholungen (engl. simple sequence repeat; SSR) führte ebenfalls zu keiner Differenzierung zwischen den Burgundersorten (Bowers et al., 1996). Ye et al. (1998) führten eine RAPD PCR zur Aufklärung der Verwandtschaftsverhältnisse verschiedener Reben durch und konnten mit dieser Methode auch keine Unterschiede zwischen Spätburgunder und dem Grauen Burgunder auflösen. Darüber hinaus lieferte der Vergleich anderer, unterschiedlicher Rebsorten ein identisches Bandenmuster.

Die Untersuchung der Weinreben-Unterlagen SO4 und Binova durch nested SAPD-PCR zeigte, dass diese beiden Sorten anhand eines charakteristischen DNA Fingerprint-Bandenmusters differenziert werden konnten. Auch die Differenzierung der Spätburgunderklone, die sich in der Ausprägung ihrer Beerigkeit unterscheiden, wurde erfolgreich durchgeführt (Abb. 37-39). Weder die untersuchten Reben-Unterlagen noch die verschiedenen-beerigen Spätburgunderklone konnten bisher durch DNA Fingerprint-Verfahren differenziert werden (Dr. Tatjana Wolf, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus wurde durch weitere Versuche gezeigt, dass verschiedene Burgundersorten wie Grauer Burgunder, Weißburgunder, Frühburgunder und Spätburgunder durch nested SAPD-PCR differenziert werden konnten (Fröhlich & Pfannebecker, 2006). Die nested SAPD-PCR hat sich als eine geeignete Methode zur Differenzierung der Weinreben erwiesen, mit der selbst geringe Unterschiede zwischen verschiedenen Klonen einer Sorte detektiert werden konnten.

Cluster-Analyse mit Labormäusen (*Mus musculus*)

Die meisten Labormaus-Stämme sind ursprünglich aus Kreuzungen der Spezies *Mus musculus domesticus* mit *Mus musculus musculus* entstanden. Fast alle Labormaus-Stämme gehen aus Inzuchtlinien hervor und sind daher genetisch nahezu identisch. Mäuse sind für die Aufklärung von Genfunktionen ideale Modellorganismen, und das nicht nur, weil sie sich rasch vermehren, sondern auch, weil über ihre Gene vieles bekannt ist. Das Mausgenom mit seinen ca. 25.000 Genen ist vollständig sequenziert und ist mit dem menschlichen

Genom zu etwa 95 Prozent identisch (Mouse genome sequencing consortium, 2002).

Zur Differenzierung der Labormäuse wird am häufigsten die SSR-Analyse angewandt. Die als SSR oder Mikrosatelliten bezeichneten Sequenzwiederholungen von Dinukleotiden (TG oder CA) sind über das komplette Genom von Säugern verteilt. Die Mikrosatelliten unterscheiden sich nur in der Anzahl ihrer Wiederholungseinheiten. Das Mausgenom enthält etwa doppelt so viele Mikrosatelliten wie das menschliche Genom. Hinzu kommt, dass die Differenz zwischen den Allelen verschiedener Inzuchtstämme beträchtlich ist (Newton & Graham, 1994). Wade et al. (2002) untersuchten einzelne Punktmutationen (engl. single nucleotide polymorphisms; SNP) zur Untersuchung des Genoms verschiedener Labormäuse. Durch SNP-Analyse können Punktmutationen untersucht werden, die bei mindestens 1 % der jeweiligen Population vorkommen (Li et al., 1999). Die SNP-Analyse setzt voraus, dass die Wildtyp DNA-Sequenz und die Art der mutierten Form sehr genau bekannt ist. Die Verwendung spezifischer Oligonukleotide, die entweder gegen die Wildtyp-DNA oder die mutierte DNA gerichtet sind bedingt deren Amplifizierung. Durch die Analyse der Punktmutationen können die Angehörigen einer Population unterschieden und Verwandtschaftsverhältnisse aufgeklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden sieben Labormäuse (A, B, 2, 3, 5, 6, 8) der Firma MfD-Diagnostics, Wendelsheim untersucht. Davon waren die Mäuse A und B Wurfgeschwister. Von den restlichen Mäusen war nur Maus 2 näher mit den Mäusen A und B verwandt. Die nested SAPD-PCR erlaubte die Unterscheidung verschiedener Labormäuse auf einfache und gut reproduzierbare Weise ohne Kenntnis bestimmter Ziel-DNA-Sequenzen (Abb. 41). Durch nested SAPD-PCR und Cluster-Analyse konnte Maus 2 als nächster Verwandter zu dem Mäusepaar A und B bestätigt werden (Abb. 42). Die erfolgreiche Aufklärung der Verwandtschaftsverhältnisse der untersuchten Labormäuse durch nested SAPD-PCR unterstreicht die universelle Einsetzbarkeit und das hohe Auflösungsvermögen dieser Methode.

Cluster-Analyse menschlicher Individuen (*Homo sapiens sapiens*)

Die DNA-Analyse stellt die modernste Methode zur Bestimmung der Identität und der Verwandtschaft menschlicher Individuen dar. Die Genotypisierung menschlicher Individuen findet vor allem beim Abstammungsgutachten, in der Gerichtsmedizin, beispielsweise beim Nachweis einer Täterschaft, und in der klinischen Diagnostik Anwendung. Ein unanfechtbares Ergebnis ist eine Voraussetzung für die Beweiskraft der Ergebnisse. Bisherige Methoden, wie zum Beispiel die RAPD PCR liefern jedoch teilweise

unspezifische und nicht reproduzierbare Ergebnisse, die vor Gericht nicht anerkannt werden. Unter den Fingerprint-Analysen wurden seit 1985 so genannte variable number of tandem repeats (VNTR) zur Genotypisierung menschlicher Individuen untersucht. Etwa ab 1998 wurden die VNTR-Analyse fast vollständig durch die short tandem repeat (STR)-Technik (Edwards et al., 1991) verdrängt. Als STR wird eine Abfolge von zwei bis sechs Basenpaaren, die sich mehrere Male hintereinander wiederholt, bezeichnet. Dabei ist die gesamte Länge des STR kleiner als 100 bp. Die Analyse der STR-Regionen bietet sich vor allem in der Gerichtsmedizin an, da auch sehr niedrige DNA-Konzentrationen ausreichend sind (Ruitberg et al., 2001). Zur Aufklärung von Verwandtschaftsverhältnissen menschlicher Individuen wurde auch die SNP-Analyse durchgeführt. Die vorstehend genannten Analyseverfahren, wie die SNP-Methode sind ohne Kenntnis bestimmter Ziel-DNA-Sequenzen nicht durchführbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde die nested SAPD-PCR zur Analyse von DNA aus menschlichen Blutzellen angewandt (Abb. 43). Es wurde gezeigt, dass die Verwandtschaftsverhältnisse der untersuchten Familien durch nested SAPD-PCR und Cluster-Analyse zuverlässig bestätigt werden konnten (Abb. 44). Darüber hinaus waren alle Ergebnisse reproduzierbar. Trotz des zwischen den menschlichen Individuen sehr homogenen DNA Fingerprint-Bandenmusters, dass aufgrund des konservierten menschlichen Genoms auch zu erwarten war, konnten geringste Unterschiede durch nested SAPD-PCR detektiert werden.

4.9 Entwicklung Art-spezifischer SCAR-Marker

Durch die Anwendung der sequence characterized amplified region (SCAR)-Technik können RAPD-Marker in sequenzspezifische (SCAR)-Marker umgewandelt werden. Die erfolgreiche Konvertierung von RAPD-Markern in SCAR-Marker wurde zum ersten Mal bei Paran und Michelmore (1993) beschrieben. Dabei konnten mehrere Mehltau-Resistenzgene des Kopfsalats (*Lactuca sativa*) in SCAR-Marker umgewandelt werden. Neben RAPD-Markern eigneten sich auch AFLP-Marker zur Konvertierung in SCAR-Marker. Durch AFLP generierte Marker wurden beispielsweise zum Nachweis eines Gallmücken-Resistenzgens von Reis in SCAR-Marker umgewandelt (Sardesai et al., 2002). Weitere durch die Konvertierung von RAPD- bzw. AFLP-Markern entwickelte SCAR-Marker wurden zum Nachweis verschiedener Resistenzgene in Weizen (Dedryver et al.,

1996), Äpfeln (Xu et al., 2001), Broccoli (Giovannelli et al., 2002), Sojabohnen (Zheng et al., 2003) und anderen Pflanzen entwickelt. Eine weitere häufig genutzte Anwendung der SCAR-Methode ist die Entwicklung genetischer Marker zur Geschlechtsbestimmung von Pflanzen. Polley et al. (1997) generierten SCAR-Marker zur Bestimmung des Geschlechts beim Hopfen. Ähnliche Marker wurden für Feigen (Parrish et al., 2004), Papaya (Parasnis et al., 2000) und Spargel (Jiang & Sink, 1996; Reamon-Büttner & Jung, 2000) entwickelt. Außerdem wurde die SCAR-Methode auch zur Identifizierung bestimmter Pflanzen-Arten angewandt. So wurden beispielsweise spezifische Marker zur Identifizierung von Birnen (Lee et al., 2004), Bambus (Das et al., 2005) und einer indischen Stachelbeer-Art (*Phyllanthus emblica*) (Dnyaneshwar et al., 2006) entwickelt. Des Weiteren wurden SCAR-Marker zur Differenzierung bestimmter *Anopheles*-Mücken (Manguin et al., 2002) und zur Identifizierung von Nematoden (Zouhar et al., 2007) generiert. Gell et al. (2007) konnten SCAR-Marker zur Differenzierung von Pilzen der Gattung *Monilinia* entwickeln. Dagegen ist über die Generierung von SCAR-Markern zur Amplifizierung bakterieller Gene nur wenig bekannt. Tsygankova et al. (2008) führten eine diverged inverted repeats (DIR)-PCR zur Generierung von Markern durch, die spezifisch für bestimmte *Bacillus thuringiensis*-Stämme waren und konnten diese Marker in SCAR-Marker konvertieren. Isenegger et al. (2003) entwickelten SCAR-Marker zur Artidentifizierung von *Bacillus pumilus*. Tilsala-Timisjärvi und Alatosava (1998) generierten einen RAPD / SCAR-Marker zur gezielten Identifizierung eines *Lactobacillus rhamnosus*-Stammes.

Die sequenzspezifischen SCAR-Marker besitzen Vorteile gegenüber den RAPD-, AFLP- oder SAPD-Markern. Die SCAR-PCR ist einfacher durchführbar und weniger zeitaufwendig. So kann ein Art-spezifischer PCR-Nachweis mit SCAR-Primern in ca. zwei Stunden durchgeführt werden, während zum Nachweis durch SAPD-PCR mit einer Dauer von 12 Stunden gerechnet werden muss. Die Verwendung sequenzspezifischer Marker eignet sich daher besonders zur schnellen Untersuchung bestimmter Gene bei der Pflanzenzüchtung oder zur generellen Identifizierung von Arten. Auch für Routineanalysen zum Beispiel bei der Qualitätssicherung von Lebensmitteln wäre ein schnelles Untersuchungsergebnis vorteilhaft. Basierend auf der DNA Fingerprint-Analyse durch nested SAPD-PCR wurden artspezifische SCAR-Marker zur Identifizierung weinschädlicher Milchsäurebakterien generiert. Die nested SAPD-PCR hat sich als geeignete Methode erwiesen, um artspezifische Marker zu generieren. So musste die nested SAPD-PCR im Durchschnitt mit drei unterschiedlichen Primern für jede Spezies durchgeführt werden, bis ein Marker gefunden werden konnte, der bei jedem Stamm der untersuchten Milchsäurebakterien-Art vorhanden

war. Im Vergleich dazu mussten in vielen Arbeiten dutzende Primer zur RAPD PCR untersucht werden, um einzelne Primer zu finden, die eine Differenzierung bestimmter Spezies erlaubten. Manguin et al. (2002) benutzten 42 zufällig generierte RAPD-Primern aus einem kommerziell erhältlichen Primer-Kit (Operon, Köln) zur Differenzierung bestimmter *Anopheles*-Arten. Davon lieferten nur neun Primer überhaupt ein auswertbares und reproduzierbares DNA Fingerprint-Bandenmuster. Nur vier Primer führten schließlich zu einem differentiellen Bandenmuster durch RAPD PCR. Dnyaneshwar et al. (2006) konnten aus 80 Primern eines RAPD Primer-Kits (Operon) nur einen Primer finden, der geeignet war, um die Stachelbeer-Art *Phyllanthus emblica* von sechs weiteren Arten der Gattung *Phyllanthus* zu unterscheiden.

Für die sieben Milchsäurebakterien *P. parvulus*, *P. damnosus*, *P. pentosaceus*, *P. inopinatus*, *P. acidilactici*, *L. hilgardii* und *L. mesenteroides* konnten Primer generiert werden, die zu einem Art-spezifischen und schnell durchführbaren PCR-Nachweis geeignet waren. Falsch-positive Ergebnisse konnten durch die Überprüfung der SCAR-Primer durch BLAST-Suche und durch das Erstellen der Negativkontrollen mit verwandten Arten ausgeschlossen werden (Tab. 44). Die Verwendung der sieben Primerpaare in einer Multiplex PCR ermöglichte darüber hinaus die simultane Identifizierung aller sieben Arten in einer Reaktion (Abb. 59). Die entwickelte Multiplex PCR kann in Weinanalytik-Instituten zur schnellen und sicheren Art-Identifizierung weinschädlicher Milchsäurebakterien eingesetzt werden.

5. Ausblick

Mit der Entwicklung 23S rDNA-gerichteter Primer zur Denaturierenden Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) wurde die Untersuchung eines variablen Bereichs ermöglicht, der zur Differenzierung zahlreicher Milchsäurebakterien unterschiedlicher Gattungen geeignet ist. Die Primer können in zukünftigen Versuchen in Kombination mit der DGGE zur Verfolgung der Diversität Gram-positiver Organismen während der Lebensmittel-Fermentation verwendet werden. Neben den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Arten der Gattungen *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Oenococcus* und *Leuconostoc* können auch weitere Milchsäurebakterien mit diesen Primern nachgewiesen werden (vgl. Alignment Kap. 8.2).

Die nested specifically amplified polymorphic DNA (SAPD)-PCR überzeugte in dieser Arbeit durch ihre universelle Einsetzbarkeit, ihr hohes Auflösungsvermögen bis hin zu Stammniveau und ihre hohe Reproduzierbarkeit. Darüber hinaus war die Methode einfach durchführbar und kostengünstiger im Vergleich zu anderen molekularbiologischen Methoden. Aus diesen Gründen war die nested SAPD-PCR zur Identifizierung neu isolierter Mikroorganismen und zur Überprüfung der Identität bereits hinterlegter Mikroorganismen aus Kultursammlungen hervorragend geeignet. Die Erstellung einer Datenbank aus charakteristischen DNA Fingerprint-Bandenmustern bekannter Mikroorganismen könnte die Artidentifizierung noch vereinfachen.

Das zur Identifizierung weinschädlicher Milchsäurebakterien angewandte sequence characterized amplified region (SCAR)-PCR System kann noch erweitert werden. So könnten für weitere weinschädliche Milchsäurebakterien wie *Lactobacillus brevis* und *L. plantarum*, Essigsäurebakterien oder Hefen Art-spezifische Marker entwickelt werden, die in das bestehende Multiplex PCR Identifizierungssystem integriert werden können. Laut Herstellerangaben des verwendeten Multiplex PCR Kits können bis zu 25 Genbereiche in einem Reaktionsansatz amplifiziert werden. Außerdem wäre es denkbar, stammspezifische SAPD-Marker in SCAR-Marker zu konvertieren, die einen schnellen, zuverlässigen und gezielten Nachweis einzelner Stämme erlauben. So könnte beispielsweise die Identität bestimmter Produktionsstämme sichergestellt werden, die als Starterkulturen zur Lebensmittel-Fermentation eingesetzt werden.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die large subunit (LSU) rRNA-Gensequenzen von neun bisher beschriebenen *Pediococcus*-Arten sequenziert und analysiert. Mit den neuen LSU rDNA-Sequenzen und homologen Sequenzen verwandter Milchsäurebakterien wurde ein Alignment erstellt und eine phylogenetische Analyse durchgeführt. Basierend auf dem 23S rDNA-Alignment wurden Primerpaare zur Identifizierung der acht typischen *Pediococcus*-Arten, sowie der atypischen Art, *P. dextrinicus* generiert. Außerdem wurde ein Multiplex PCR System entwickelt, mit dem alle typischen *Pediococcus*-Arten simultan in einer Reaktion nachgewiesen werden konnten. Die Multiplex PCR Methode wurde zur Identifizierung zahlreicher *Pediococcus*-Stämme aus Kulturensammlungen und neu isolierter Stämme aus Weinproben und Starterkulturen verwendet. Die Untersuchung zeigte, dass einige Stämme der institutseigenen Kulturensammlung unter falschen Artnamen hinterlegt waren, und dass *P. parvulus* im Weinanbaugebiet Rheinhessen weit verbreitet war.

Auf Basis der 23S rDNA-Sequenzen der *Pediococcus*-Typstämme wurden rRNA-Sekundärstrukturen mit der neu entwickelten Software Structure Star generiert. Die Sekundärstrukturen waren zum Auffinden der Zielbereiche für fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden besonders geeignet. Da die Sequenzunterschiede zwischen den LSU rRNA-Genen der acht typischen *Pediococcus*-Arten gering waren, konnten keine artspezifischen Sonden zur Identifizierung durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) generiert werden. Die Unterschiede reichten jedoch aus, um zwei Gruppen durch FISH differenzieren zu können. Die Verwendung unmarkierter Helfersonden, die komplementär zu Bereichen in unmittelbarer Nähe der Zielregionen der FISH-Sonden waren, verbesserten die Zugänglichkeit Sonden an die rRNA. Dadurch wurde das Fluoreszenz-Signal verstärkt. Eine FISH-Sonde konnte zur Identifizierung der Arten *P. damnosus*, *P. parvulus* und *P. inopinatus* verwendet werden, die zweite Sonde war spezifisch für die Arten *P. acidilactici* und *P. pentosaceus*. Das Eindringen der Sonden wurde durch die Behandlung der Zellen mit Lysozym verstärkt. Dadurch konnten auch Exopolysaccharid-bildende Zellen erfolgreich hybridisiert werden.

Zur Denaturierenden Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) wurden Primer entwickelt, mit denen ein hochvariabler 23S rDNA-Bereich amplifiziert werden konnte. Die Auftrennung dieses Bereichs durch DGGE führte zur erfolgreichen Differenzierung weinrelevanter

Milchsäurebakterien der Gattungen *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Oenococcus* und *Leuconostoc*.

Die Untersuchung zweier Gene, die an der Exopolysaccharid-Synthese von Arten der Gattung *Pediococcus* beteiligt sind zeigte, dass der Nachweis dieser Gene alleine nicht ausreicht, um festzustellen, ob ein Stamm zur Exopolysaccharid-Synthese befähigt ist. Vielmehr war die Ausprägung der Gene stark von den Wachstumsbedingungen der Bakterien abhängig.

Die nested specifically amplified polymorphic DNA (SAPD)-PCR wurde in der vorliegenden Arbeit zur Art- und Stamm-Differenzierung pro- und eukaryotischer Organismen angewandt. Es wurden vor allem weinrelevante Milchsäurebakterien der Gattungen *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* und *Leuconostoc* und Hefen der Gattungen *Dekkera* / *Brettanomyces* und *Saccharomyces* untersucht. Die Cluster-Analyse der *Pediococcus*-Typstämme zeigte eine unterschiedliche Baum-Topologie im Vergleich zum phylogenetischen 23S rDNA-Stammbaum. Die Verwandtschaftsverhältnisse der untersuchten *Oenococcus oeni*-Stämme aus Starterkulturen konnten in Bezug auf eine frühere Cluster-Analyse reproduziert werden. Die nested SAPD-PCR war darüber hinaus geeignet, um Milchsäurebakterien weiterer Gattungen aus der institutseigenen Kulturensammlung und aus Starterkulturen zu differenzieren. Die Untersuchung der *Dekkera* / *Brettanomyces bruxellensis*-Stämme aus rheinhessischen Weinproben zeigte eine Gruppierung der Stämme gemäß ihrer Herkunft nach Nord und Süd. Beim Vergleich der Verwandtschaftsverhältnisse von Stämmen der Arten *P. parvulus* und *B. bruxellensis*, die aus denselben Weinproben isoliert wurden, konnte eine hohe Übereinstimmung der beiden Baum-Topologien beobachtet werden. Anhand der SAPD-PCR Untersuchung der Sektheffen aus Starterkulturen konnten alle Stämme der Art *Saccharomyces cerevisiae* zugeordnet werden. Die nested SAPD-PCR war geeignet, um höhere Eukaryoten wie Weinreben zu differenzieren und es konnten die Verwandtschaftsverhältnisse von Mäusen und menschlichen Individuen durch Cluster-Analyse nachvollzogen werden.

Mit Hilfe der sequence characterized amplified region (SCAR)-Technik wurden SAPD-Marker in SCAR-Marker konvertiert. Die neu generierten SCAR-Primer konnten zur simultanen Art-Identifizierung von sieben weinschädlichen Milchsäurebakterien in einer Multiplex PCR erfolgreich eingesetzt werden.

7. Literatur

- Albano, H., Todorov, S.D., Van Reenen, C.A., Hogg, T., Dicks, L.M.T., Teixeira, P., 2007. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from "Alheira", a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *International Journal of Food Microbiology* 116, 239-247.
- Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Sthal, D.A., 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1919-1925.
- Amann, R., Fuchs, B.M., Behrens, S., 2001. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization. *Current Opinion in Biotechnology* 12, 231-236.
- Andrews, J., Gilliland, R.B., 1952. Super-attenuation of beer: A study of three organisms capable of causing abnormal attenuations. *Journal of the Institute of Brewing* 58, 189-196.
- Arena, M.E., Manca de Nadra, M.C., 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology* 90, 158-162.
- Azumi, M., Goto-Yamamoto, N., 2001. AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of *Saccharomyces sensu stricto* and its application to phenetic clustering. *Yeast* 18, 1145-1154.
- Back, W., 1978 a. Elevation of *Pediococcus cerevisiae* subsp. *dextrinicus* Coster and White to species status *Pediococcus dextrinicus* (Coster and White) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 28, 523-527.
- Back, W., 1978 b. Zur Taxonomie der Gattung *Pediococcus*: Phänotypische und genotypische Abgrenzung der bisher bekannten Arten sowie Beschreibung einer neuen bierschädlichen Art: *Pediococcus inopinatus*. *Brauwissenschaft*, 31, 237-250, 312-320, 336-343.
- Back, W., 1999. *Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, Teil 2*. Verlag Hans Carl, Nürnberg, Germany.
- Back, W., Stackebrandt, E., 1978. DNS-DNS-Homologiestudien innerhalb der Gattung *Pediococcus*. *Archives of Microbiology* 118, 79-85.
- Bae, S., Fleet, G.H., Heard, G.M., 2006. Lactic acid bacteria associated with grapes from several Australian vineyards. *Journal of Applied Microbiology* 100, 712-727.
- Balcke, J. 1884. Über häufig vorkommende Fehler in der Bierbereitung. *Wochenschrift Brauerei*, Band 1, 181-184.
- Baleiras Couto, M.M., Eijnsma, B., Hofstra, H., Uis in't Velt, J.H., Van der Vossen, J.M.B.M., 1996. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 41-46.
- Barnett, J.A., Delaney, M.A., Jones, E., Magson, A.B., Winch, B., 1972. The numbers of yeasts associated with wine grapes of Bordeaux. *Archives of Microbiology* 83, 52-55.

- Barney, M., Volgyi, A., Navarro, A., Ryder, D., 2001. Riboprinting and 16S rRNA sequencing for identification of brewery *Pediococcus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 553-560.
- Barros, R.R., Carvalho, M.G.S., Peralta, J.M., Facklam, R.R., Teixeira, L.M., 2001. Phenotypic and genotypic characterization of *Pediococcus* strains isolated from human clinical sources. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 1241-1246.
- Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., 2004. The "buttery" attribute of winediacyetyl. Desirability, spoilage and beyond. Butter or no butter. In: *Proceedings of the XVIes Entretiens Scientifiques Lallemand*. Seite 11-17. Oporto, Portugal.
- Bates, E.E.M, Gilbert, H.J., 1989. Characterization of a cryptic plasmid from *Lactobacillus plantarum*. *Gene* 85, 253-258.
- Beneduce, L., Spano, G., Vernile, A., Tarantino, D., Massa, S., 2004. Molecular characterization of lactic acid populations associated with wine spoilage. *Journal of Basic Microbiology* 44, 10-16.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Wheeler, D.L., 2004. Genbank: update. *Nucleic Acids Research* 32 (Online), D 23-26.
- Berthier, F., Ehrlich, S.D., 1998. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiology Letters* 161, 97-106.
- Bhowmik, T., Marth, E.H., 1990. Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: A review. *Journal of Dairy Science* 73, 859-866.
- Björkroth, J., Holzapfel, W., 2006. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. Aus: Dworkin, M. (Chefeditor), *The Prokaryotes* 3. Edition, Band 4, Springer Verlag, New York.
- Blasco, L., Ferrer, S., Pardo, I., 2003. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for in situ identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 225, 115-23.
- Bouton, Y., Guyot, P., Beuvier, E., Tailliez, P., Grappin, R., 2002. Use of PCR-based methods and PFGE for typing and monitoring homofermentative lactobacilli during Comte cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology* 76, 27-38.
- Bover-Cid, S., Holzapfel, W.H., 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 53, 33-41.
- Bowers, J.E., Bandman, E.B., Meredith, C.P., 1993. DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture* 44, 266-274.
- Bowers, J.E., Dangl, G.S., Vignani, R., Meredith, C.P., 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* 39, 628-633.
- Bringel, F., Curk, M.C., Hubert, J.C., 1996. Characterization of lactobacilli by Southern-type hybridization with a *Lactobacillus plantarum pyrDFE* probe. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 588-594.
- Bujdoso, G., Egli, C.M., Henick-Kling, T., 2001. Characterization of *Hanseniaspora* (*Kloeckera*) strains isolated in Finger Lakes wineries using physiological and molecular techniques. *Food Technology and Biotechnology* 39, 83-91.

- Cai, J., Roberts, I.N., Collins, M.D., 1996. Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene-sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 542-549.
- Cannone, J.J., Subramanian, S., Schnare, M.N., Collett, J.R., D'Souza, L.M., Du, Y., Feng, B., Lin, N., Madabusi, L.V., Müller, K.M., Pande, N., Shang, Z., Yu, N., Gutell, R.R., 2002. The Comparative RNA Web (CRW) Site: An Online Database of Comparative Sequence and Structure Information for Ribosomal, Intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics* 3, 2.
- Cavin, J.F., Andioc, V., Etievant, P.X., Divies, C., 1993. Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids. *American Journal of Enology and Viticulture* 44, 76-80.
- Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N., Caskey, C.T., 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research* 16, 1114.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.N., Pons, M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60, 165-178.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.N., 1995. The influence of *Brettanomyces* / *Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 463-468.
- Chatonnet, P., Viala, C., Dubourdieu, D., 1997. Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture* 48, 443-448.
- Chen, H., Lim, C.K., Lee, Y.K., Chan, Y.N., 2000. Comparative analysis of the genes encoding 23S-5S rRNA intergenic spacer regions of *Lactobacillus casei*-related strains. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2, 471-478.
- Cibik, R., Lepage, E., Talliez, P., 2000. Molecular diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* isolated from traditional French cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragment amplification. *Systematic and Applied Microbiology* 23, 267-278.
- Claussen, N.H., 1903. Études sur les bactéries dites sarcines et sur les maladies qu'elles provoquent dans la bière. *Compte Rendu des Travaux du Laboratoire de Carlsberg* 6, 64-83.
- Cocolin, L., Bisson, L.F., Mills, D.A., 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters* 189, 81-7.
- Collins, M.D., Rodrigues, U., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J.A.E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B.A., Williams, A.M., Wallbanks, S., 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiology Letters* 77, 5-12.
- Costello, P.J., Morrison, G.J., Lee, T.H., Fleet, G.H., 1983. Numbers and species of lactic acid bacteria in wines during vinification. *Food Technology in Australia* 35, 14-18.
- Coster, E., White, H.R., 1964. Further studies of the genus *Pediococcus*. *Journal of General Microbiology* 37, 15-31.

- Coton, E., Rollan, G., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A., 1998. Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency, and distribution. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 199-204.
- Curtin, C.D., Bellon, J., Henschke, P.A., Godden, P.W., De Barros Lopes, M.A., 2007. Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries. *FEMS Yeast Research* 7, 471-481.
- Daniel, P., De-Waele, E., Hallet, J.N., 1993. Optimisation of transverse alternating field electrophoresis for strain identification of *Leuconostoc oenos*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38, 638-641.
- Das, M., Bhattacharya, S., Pal, A., 2005. Generation and characterization of SCARs by cloning and sequencing of RAPD products: A strategy for species-specific marker development in bamboo. *Annals of Botany* 95, 835-841.
- Davenport, R.R., 1974. Microecology of yeasts and yeast-like organisms associated with an English vineyard. *Vitis* 13, 123-130.
- Davis, C.R., Wibowo, D.J., Fleet, G.H., Lee, T.H., 1988. Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. *American Journal of Enology and Viticulture* 39, 137-142.
- Davis, C.R., Wibowo, D.J., Lee, T.H., Fleet, G.H., 1986. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentations of wines at different pH. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 539-545.
- De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E., 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 23, 130-135.
- Deak, T., 1995. Methods for the detection and identification of yeasts in foods. *Trends in Food Science and Technology* 6, 287-292.
- Dedryver, F., Jubier, M.F., Thouvenin, J., Goyeau, H., 1996. Molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr24* in different wheat cultivars. *Genome* 39, 830-835.
- Delaherche, A., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2004. Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology* 97, 910-915.
- Delfini, C., 1989. Ability of wine malolactic bacteria to produce histamine. *Sciences des Aliments* 9, 413-416.
- Dellaglio, F., Torriani, S., 1986. DNA-DNA homology, physiological characteristics and distribution of lactic acid bacteria isolated from maize silage. *Journal of Applied Bacteriology* 60, 83-92.
- Dellaglio, F., Trovatelli, L.G., Sarra, P.G., 1981. DNA-DNA homology among representative strains of the genus *Pediococcus*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Reihe C, Band 2, 2*, 140-150.
- DeParasis, J., Roth, D.A., 1990. Nucleic acid probes for identification of phyto-bacteria: identification of genus-specific 16S rRNA sequences. *Phytopathology* 80, 618-621.
- Descheemaeker, P., Lammens, C., Pot, B., Vandamme, P., Goossens, H., 1997. Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA

- fragments for identification of enterococci important in human medicine. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 555-561.
- Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2003. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiology* 20, 377-384.
- Dittrich H.H., 1984. Essigstich - Noch immer Weinfehler Nr. 1. Ursachen und Zusammenhänge. *Der Deutsche Weinbau* 39, 1154-1163.
- Dittrich, H.H., Großmann, M., 2005. *Mikrobiologie des Weines*. 3. Auflage. Ulmer, Stuttgart.
- Dnyaneshwar, W., Preeti, C., Kalpana, J., Bhushan, P., 2006. Development and application of RAPD-SCAR marker for identification of *Phyllanthus emblica* Linn. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 29, 2313-2316.
- Dobson, C.M., Deneer, H., Lee, S., Hemmingsen, S., Glaze, S., Ziola, B., 2002. Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *Pediococcus claussenii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from beer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 2003-2010.
- Dols-Lafargue, M., Lee, H.Y., Le Marrec, C., Heyraud, A., Chambat, G., Lonvaud-Funel, A., 2008. Characterization of *gtf*, a glycosyltransferase gene in the genomes of *Pediococcus parvulus* and *Oenococcus oeni*, two bacterial species commonly found in wine. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 4079-4090.
- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., Mattick, J.S., 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* 19, 4008.
- Donhauser, S., 1993. *Mikrobiologie des Bieres*, Aus: Dittrich, H.H. (Editor) *Mikrobiologie der Lebensmittel: Getränke*. Behr's Verlag, Hamburg. Seite 109-182.
- Du Toit, M., Pretorius, I.S., 2000. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal-a review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 21, 74-96.
- Dueñas-Chasco, M.T., Rodríguez-Carvajal, M.A., Mateo, P.T., Franco-Rodríguez, G., Espartero, J.L., Irastorza-Iribas, A., Gil-Serrano, A.M., 1997. Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. *Carbohydrate Research* 303, 453-458.
- Dutka-Malen, M.S., Evers, S., Courvalin, P., 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 24-27.
- Edlund, C., Barkholt, L., 1997. Effect of Vancomycin on intestinal flora of patients who previously received antimicrobial therapy. *Clinical Infectious Diseases* 25, 729-32.
- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H.A., Caskey, C.T., 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics*, 49, 746-756.
- Edwards, C.G., Jensen, K.A., 1992. Occurrence and characterization of lactic acid bacteria from Washington State wines: *Pediococcus* spp. *American Journal of Enology and Viticulture* 43, 233-238.
- Edwards, M.C., Gibbs, R.A., 1994. Multiplex PCR: advantages, development and applications. *PCR Methods and Applications* 4, 65-75.

- Egli, C.M., Henick-Kling, T., 2001. Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer region. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 241-247.
- Eliseeva, G.S., Nagornaia, S.S., Zhrebilo, O.E., Podgorskii, V.S., Ignatova, E.A., 2001. Biological deacidification of wines using lactic-acid bacteria and yeasts [russisch] *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia* 37, Seite 487-493.
- Ercolini, D., 2004. PCR-DGGE fingerprinting: Novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 56, 297-314.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum-likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17, 368-376.
- Felsenstein, J., 1989. PHYLIP - phylogeny interference package (Version 3.2). *Cladistics* 5, 164-166.
- Fernandez-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., Barrio, E., 2000. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 78, 87-97.
- Fleet, G. H. 1998. The microbiology of alcoholic beverages. Aus: Wood, B.J. (Editor), *Microbiology of Fermented Foods* (2. Auflage). Seite 217-262. Blackie Academic & Professional, New York.
- Fleet, G.H., 1999. Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 50, 101-117.
- Fleet, G.H., Lafon-Lafourcade, S., Ribereau-Gayon, P., 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Applied and Environmental Microbiology* 48, 1034-1038.
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, P., 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 166-170.
- Franz, C.M.A.P., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., De Wachter, M., Cleenwerck, I., Hoste, B., Schillinger, U., Holzappel, W.H., Swings, J., 2006. *Pediococcus stilesii* sp. nov., isolated from maize grains. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 329-333.
- Fröhlich, J., König, H., 2002. Gensonden zum Nachweis von Spezies der Gattung *Oenococcus*. Patentanmeldung DE10204858.4.
- Fröhlich, J., König, H., Bandenburg, B., Hirschhäuser, S., 2003. Gene probes for the detection of the *Oenococcus* species. Patent application WO 03/066894 A2.
- Fröhlich, J., Pfannebecker, J., 2006. Spezies-unabhängiges Nachweisverfahren für biologisches Material. Patentanmeldung DE 10 2006 022 569 A1.
- Fröhlich, J., Pfannebecker, J., 2007. Species-independent DNA fingerprint analysis with primers derived from the *NoI* identification sequence. Patent application WO/2007/131776.

- Fuchs, B.M., Glöckner, F.O., Wulf, J., Amann, R., 2000. Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3603-3607.
- Fugelsang, K.C., Edwards, C.G., 2007. *Wine microbiology. Practical applications and procedures.* Springer Verlag, New York.
- Gafan, G.P., Spratt, D.A., 2005. Denaturing gradient gel electrophoresis gel expansion (DGGE) – An attempt to resolve the limitations of co-migration in the DGGE of complex polymicrobial communities. *FEMS Microbiology Letters* 253, 303-307.
- Ganley, A.R.D., Hayashi, K., Horiuchi, T., Kobayashi, T., 2005. Identifying gene-independent noncoding functional elements in the yeast ribosomal DNA by phylogenetic footprinting. *PNAS* 102, 11787-11792.
- Garvie, E.I., 1983. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (Knudsen and Sørensen) comb. nov. and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (Beijernick) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33, 118-119.
- Garvie, E.I., 1986 a. Genus *Leuconostoc* van Tieghem 1878, 198AL emended mut. char. Hucker and Pederson 1930, 66AL. Aus: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.S., Holt, J.G. (Editoren), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Band 2. Williams and Wilkins. Baltimore, MD, Seite 1071-1075.
- Garvie, E.I., 1986 b. Genus *Pediococcus*. Aus: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Editoren), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Band 2. Williams & Wilkins, Baltimore, Seite 1075-1079.
- Gell, I., Cubero, J., Melgarejo, P., 2007. Two different PCR approaches for universal diagnosis of brown rot and identification of *Monilinia* spp. in stone fruit trees. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2629-2637.
- Gindreau, E., Walling, E., Lonvaud-Funel, A., 2001. Direct polymerase chain reaction of ropy *Pediococcus damnosus* strains in wine. *Journal of Applied Microbiology* 90, 535-542.
- Giovannelli, J.L., Farnham, M.W., Wang, M., 2002. Development of sequence characterized amplified region markers linked to downy mildew resistance in broccoli. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127, 597-601.
- Giraffa, G., De Vecchi, P., Rossetti, L., 1998. Note: Identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. *Journal of Applied Microbiology* 85, 918-924.
- Granchi, L., Bosco, M., Messini, A., Vincenzini, M., 1999. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Journal of Applied Microbiology* 87, 949-956.
- Grbin, P.R., Henschke, P.A., 2000. Mousy off-flavour production in grape juice and wine by *Dekkera* and *Brettanomyces*. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6, 255-262.
- Günther, H. L., White, H.R., 1961. The cultural and physiological characters of the pediococci. *Journal of General Microbiology* 26, 185-197.
- Guerrini, S., Bastianini, A., Blaiotta, G., Granchi, L., Moschetti, G., Coppola, S., Romano, P., Vincenzini, M., 2003. Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from Italian wines. *International Journal of Food Microbiology* 83, 1-14.

- Guillamon, J.M., Sabate, J., Barrio, E., Cano, J., Querol A., 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology* 169, 387-92.
- Gutell, R.R., Gray, M.W., Schnare, M.N., 1993. A compilation of large subunit (23S and 23S-like) ribosomal RNA structures. *Nucleic Acids Research* 21, 3055-3074.
- Hanselle, T., Otte, M., Schnibbe, T., Smythe, E., Krieg-Schneider, F., 2003. Isolation of genomic DNA from buccal swabs for forensic analysis, using fully automated silica-membrane purification technology. *Legal Medicine* 5, 145-149.
- Hansen, J., Kiehlbrandt, M.C., 1994. *Saccharomyces carlsbergensis* contains two functional *MET2* alleles similar to homologues from *S. cerevisiae* and *S. monacensis*. *Gene* 140, 33-40.
- Harrison, A.P., Hansen, P.A., 1950. The bacterial flora of the cecal feces of healthy turkeys. *Journal of Bacteriology* 59, 197-210.
- Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D., De Vos, W.M., 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 114-123.
- Hennequin, C., Thierry, A., Richard, G.F., Lecointre, G., Nguyen, H.V., Gaillardin, C., Dujon, B., 2001. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 551-9.
- Hierro, N., Gonzalez, A., Mas, A., Guillamon, J.M., 2004. New PCR-based methods for yeast identification. *Journal of Applied Microbiology* 97, 792-801.
- Hirschhäuser, S., 2007. Dissertationsarbeit: Entwicklung molekularbiologischer Methoden zum Nachweis verschiedener Sclerotiniaceae. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Hirschhäuser, S., Fröhlich, J., Gneipel, A., Schönig, I., König, H., 2005. Fast protocols for the 5S rDNA and ITS-2 based identification of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiology Letters* 244, 165-171.
- Hoeben, P., Clark-Walter, G.D., 1986. An approach to yeast classification by mapping mitochondrial DNA from *Dekkera* / *Brettanomyces* and *Eeniella* genera. *Current Genetics* 10, 371-379.
- Holzappel, W.H., Franz, C.M.A.P., Ludwig, W., Back, W., Dicks, L.M.T., 2006. The genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*. Aus: Dworkin, M. (Chefredakteur). *The Prokaryotes*, 3. Auflage, Band 4, Springer Verlag.
- Ibeas, J.I., Lozano, I., Perdignes, F., Jimenez, J., 1996. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR Method. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 998-1003.
- Isenegger, D.A., Taylor, P.W.J., Mullins, K., McGregor, G.R., Barlass, M., Hutchinson, J.F., 2003. Molecular detection of a bacterial contaminant *Bacillus pumilus* in symptomless potato plant tissue cultures. *Plant Cell Reports* 21, 814-820.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L., 1985 a. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314, 67-73.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L., 1985 b. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 316, 76-79.

- Jiang, C., Sink, K.C., 1996. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus M in *Asparagus*. *Euphytica* 94, 329-333.
- Josepa, S., Guillamon, J.M., Cano, J., 2000. PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus/Saccharomyces pastorianus* using specific primers. *FEMS Microbiology Letters* 193, 255-259.
- Joseph, C.M.L., Kumar, G., Su, E., Bisson, L.F., 2007. Adhesion and biofilm production by wine isolates of *Brettanomyces bruxellensis*. *American Journal of Enology and Viticulture* 58, 373-378.
- Josson, K., Soetaert, P., Michiels, F., Joos, H., Mahillon, J., 1990. *Lactobacillus hilgardii* Plasmid pLAB1000 Consists Functional Cassettes Commonly Found in Other Gram-Positive Organisms. *Journal of Bacteriology* 172, 3089-3099.
- Jukes, T. H., Cantor, C. R., 1969. Evolution of protein molecules. Aus: Munro, H.N. (Editor) *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York, 21-132.
- Juven, B.J., Meinersmann, R.J., Stern N.J., 1991. Antagonistic effects of lactobacilli and pediococci to control intestinal colonization by human entero-pathogens in live poultry. *Journal of Applied Bacteriology* 70, 95-103.
- Kang, D.H., Fung, D.Y.C., 1999. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 by stimulated *Pediococcus acidilactici*. *Letters in Applied Microbiology* 29, 206-210.
- Kelly, W.J., Huang, C.M., Asmundson, R.V., 1993. Comparison of *Leuconostoc oenos* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3969-3972.
- Kielland-Brandt, M., Nilsson-Tillgren, T., Gjermansen, C., Holmberg, S., Pedersen, M.B., 1995. Genetics of brewing yeasts. Aus: The Yeast Band 6, Editoren: Rose, A.H., Wheals, A.E., Harrison, J.S., Seite 223-254. Academic Press, London.
- Koeleman, J.G., Parlevliet, G.A., Dijkshoorn, L., Savelkoul, P.H., Vandenbroucke-Grauls, C.M., 1997. Nosocomial outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* on a surgical ward: epidemiology and risk factors for acquisition. *Journal of Hospital Infection* 37, 113-123
- Kurzak, P., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F., 1998. Diversity of lactic acid bacteria associated with ducks. *Systematic and Applied Microbiology* 21, 588-592.
- Lafon-Lafourcade, S., Carre, E., Ribéreau-Gayon, P., 1983. Occurrence of lactic acid bacteria during different stages of the vinification and conservation of wines. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 874-880.
- Lamoureux, M., Prévost, H., Cavin, J.F., Diviès, C., 1993. Recognition of *Oenococcus oeni* strains by the use of DNA restriction profiles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39, 547-552.
- Landete, J.M., Ferrer, S., Pardo, I., 2005. Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? *Journal of Applied Microbiology* 99, 580-586.
- Langston, C.W., Bouma, C., 1960. A study of the microorganisms from grass silage I: The cocci. *Applied and Environmental Microbiology* 8, 212-222.
- Larisika, M., Claus, H., König, H., 2008. Pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of *Oenococcus oeni* isolates from different wine-growing regions in Germany. *International Journal of Food Microbiology* 123, 171-176.

- Le Jeune, C., Lonvaud-Funel, A., 1997. Sequence of DNA 16S/23S spacer region of *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*): Application of strain differentiation. *Research in Microbiology* 148, 79-86.
- Lee, G.P., Lee, C.H., Kim, C.S., 2004. Molecular markers derived from RAPD, SCAR, and the conserved 18S rDNA sequences for classification and identification in *Pyrus oyrifolia* and *P. communis*. *Theoretical and Applied Genetics* 108, 1487-1491.
- Lehtonen, P., 2002. Biogenic amines in wine. *Journal of Food Science and Technology COST 917 Biogenically active amines in food, VI*, 165-170.
- Leitch, A.R., Schwarzacher, T., Jackson, D., Leitch I.J., 1994. *In situ-Hybridisierung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Li, J., Butler, J.M., Tan, Y., Lin, H., Royer, S., Ohler, L., Shaler, T.A., Hunter, J.M., Pollart, D.J., Monforte, J.A., Becker, C.H., 1999. Single nucleotide polymorphism determination using primer extension and time-of-flight mass spectrometry. *Electrophoresis* 20, 1258-1265.
- Lindner, P. 1887. Über ein neues in Malzmaischen vorkommendes, milchsäurebildendes Ferment. *Wochenschrift für Brauerei* 4, 437-440.
- Liu, L., Zhang, B., Tong, H., Dong, X., 2006. *Pediococcus ethanolidurans* sp. nov., isolated from the walls of a distilled-spirit-fermenting cellar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 2405-2408.
- Liu, S.Q., 2002. Malolactic fermentation in wine - beyond deacidification. *Journal of Applied Microbiology* 92, 589-601.
- Llaubères, R.M., Richard, B., Lonvaud, A., Dubourdieu, D., 1990. Structure of an exocellular β -D-glucan from *Pediococcus* sp., a wine lactic bacteria. *Carbohydrate Research* 203, 103-107
- Lonvaud-Funel, A. 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 317-331.
- Lonvaud-Funel, A. 2001. Biogenic amines in wine: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 199, 9-13.
- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A., 1988. Une altération bactérienne des vins: la "maladie des vins filants". *Sciences des aliments* 8, 33-49.
- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A., 1994. Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Bacteriology* 77, 401-407.
- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A., Ledoux, O., 1991. Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isotopic DNA probes. *Journal of Applied Bacteriology* 71, 501-508.
- Lonvaud-Funel, A., Guilloux, O., Joyeux, A., 1993. Isolation of a DNA probe for identification of glucan-producing *Pediococcus damnosus* in wines. *Journal of Applied Bacteriology* 74, 41-47.
- Lopandic, K., Gangl, H., Wallner, E., Tschek, G., Leitner, G., Querol, A., Borth, N., Breitenbach, M., Prillinger, H., Tiefenbrunner, W., 2007. Genetically different wine yeasts isolated from Austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *FEMS Yeast Research* 7, 953-965.

- Lopez, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L., Orr, E., Phister, T., Marshall, M., VanderGheynst, J., Mills, D.A., 2003. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6801-6807.
- Luchansky, J.B., Glass, K.A., Harsono, K.D., Degnan, A.J., Faith, N.G., Cauvin B., Baccus-Taylor, G., Arihara, K., Bater, B., Maurer, A.J., Cassens, R.B., 1992. Genomic analysis of *Pediococcus* starter cultures used to control *Listeria monocytogenes* in turkey summer sausage. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3053-3059.
- Ludwig, W., Neumaier, J., Klugbauer, N., Brockmann, E., Roller, C., Jilg, S., Reetz, K., Schachtner, I., Ludvigsen, A., Wallner, G., Bachleitner, M., Fischer, U., Schleifer, K.H., 1993. Phylogenetic relationships of bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATP-synthase β -subunit genes. *Antonie van Leeuwenhoek* 64, 285-304.
- Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 15, 155-173.
- Mahony, J.B., 1996. Multiplex polymerase chain reaction for the diagnosis of sexually transmitted diseases. *Clinical Laboratory Medicine* 1, 61-71.
- Manca de Nadra, M.C., Strasser de Saad, A.M., 1995. Polysaccharide production by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *International Journal of Food Microbiology* 27, 101-106.
- Manguin, S., Kengne, P., Sonnier, L., Harbach, R.E., Baimai, V., Trung, H.D., Coosemans, M., 2002. SCAR markers and multiplex PCR-based identification of isomorphic species in the *Anopheles dirus* complex in Southeast Asia. *Medical and Veterinary Entomology* 16, 46-54.
- Mannazzu, I., Simonetti, E., Marinangeli, P., Guerra, E., Budroni, M., Thangavelu, M., Clementi, F., 2002. SED1 gene length and sequence polymorphisms in feral strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5437-5444.
- Marinangeli, P., Angelozzi, D., Ciani, M., Clementi, F., Mannazzu, I., 2004. Minisatellites in *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding cell wall proteins: A new way towards wine strain characterisation. *FEMS Yeast Research* 4, 427-435.
- Martineau, B., Acree, T., Henick-Kling, T., 1995. Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl. *Food Research International* 28, 139-143.
- Martorell, P., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Fernández-Espinar, M.T., Loureiro, V., Querol, A., 2005. Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *International Journal of Food Microbiology* 106, 79-84.
- Masneuf, I., Aigle, M., Dubourdieu, D., 1996. Development of PCR/RFLP method for *S. cerevisiae* and *S. bayanus* identification in enology. *FEMS Microbiology Letters* 138, 239-244.
- McGovern, P.E., 2003. *Ancient Wine: The Search for the Origins of Viniculture*. Princeton University Press, New Jersey.
- Mees, R.H., 1934. *Dissertationsarbeit: Onderzoekingen over de Biersarcina*. Technical University of Delft, Delft, Nederlanden.
- Miot-Sertier, C., Lonvaud-Funel, A., 2007. Development of a molecular method for the typing of *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) at the strain level. *Journal of Applied Microbiology* 102, 555-562.

- Mitrakul, C.M., Henick-Kling, T., Egli, C.M., 1999. Discrimination of *Brettanomyces* / *Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. *Food Microbiology* 16, 3-14.
- Molina, F.I., Jong, S.C., Huffman, J., 1993 a. PCR amplification of the 3' external transcribed and intergenic spacers of the ribosomal DNA repeat unit in three species of *Saccharomyces*. *FEMS Microbiology Letters* 108, 259-264.
- Molina, F.I., Shen, P., Jong, S.C., 1993 b. Validation of the species concept in the genus *Dekkera* by restriction analysis of genes coding for rRNA. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43, 32-35.
- Montersino, S., Prieto, A., Munoz, R., De Las Rivas, B., 2008. Evaluation of exopolysaccharide production by *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from wine. *Journal of Food Science* 73, 196-199.
- Montrocher, R., Verner, M.C., Briolay, J., Gautier, C., Marmeisse, R. 1998. Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 295-303.
- Moore, K.J., Johnson, M.G., Morris, J.R., 1988. Indigenous yeast microflora on Arkansas white riesling (*Vitis vinifera*) grapes and in model must systems. *Journal of Food Science* 53, 1725-28.
- Mora, D., Fortina M.G., Parini C., Daffonchio D., Manachini P.L., 2000. Genomic subpopulations within the species *Pediococcus acidilactici* detected by multilocus typing analysis: Relationships between pediocin AcH/PA-1 producing and non-producing strains. *Microbiology* 146, 2027-2038.
- Moreno-Arribas, V., Torlois, S., Joyeux, A., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A, 2000. Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *Journal of Applied Microbiology* 88, 584-593.
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., Jorganes, F., Munoz, R., 2003. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology* 84, 117-123.
- Mortimer, R., Polsinelli, M., 1999. On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology* 150, 199-204.
- Moschetti, G., Blaiotta, G., Aponte, M., Mauriello, G., Villani, F., Coppola, S., 1997. Genotyping of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and determination of the number and forms of *rrn* operons in *L. delbrueckii* and its subspecies. *Research in Microbiology* 148, 501-510.
- Moter, A., Göbel, U.B., 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 41, 85-112.
- Mouse genome sequencing consortium, 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520-562.
- Mundt, J.O., Beattie, W.G., Wieland, F.R., 1969. *Pediococci* residing on plants. *Journal of Bacteriology* 98, 938-942.
- Musters, W., Boon, K., Van der Sande, C.A., Van Heerikhuizen, H., Planta, R.J., 1990. Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA. *EMBO Journal* 9, 3989-3996.

- Muyzer, G., Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 127-141.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitierlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.
- Newton und Graham, 1994. PCR (Labor im Fokus), 2. Auflage, Seite 145. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B. Jr., 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Beim Autor erhältlich.
- Nigatu, A., Ahrne, S., Gashe, B.A., Molin, G., 1998. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for discrimination of *Pediococcus pentosaceus* and *Ped. acidilactici* and rapid grouping of *Pediococcus* isolates. *Letters in Applied Microbiology* 26, 412-416.
- Osborne, J.P., Edwards, C.G., 2005. Bacteria in winemaking. *Advances in Food and Nutrition Research* 50, 139-177.
- Page, R.D.M., 1996. Tree view: an application to display Phylogenetic trees on personal computers. *Computation and Applied Biosciences* 12, 357-358.
- Paran, I., Michelmore, R.W., 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85, 985-993.
- Parasnis, A.S., Gupta, V.S., Tamhankar, S.A., Ranjekar, P.K., 2000. A highly reliable sex diagnostic PCR assay for mass screening of papaya seedlings. *Molecular Breeding* 6, 337-344.
- Parrish, T.L., Koelewijn, H.P., Van Dijk, P.J., 2004. Identification of a male-specific AFLP marker in a functionally dioecious fig, *Ficus fulva* Reinw. ex Bl. (*Moraceae*). *Sexual Plant Reproduction* 17, 17-22.
- Patel, R., Piper, K.E., Rouse, M.S., Steckelberg, J.M., Uhl, J.R., Kohner, P., Hopkins, M.K., Cockerill, F.R., Kline, B.C., 1998. Determination of 16S rRNA sequences of enterococci and application to species identification of nonmotile *Enterococcus gallinarum* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 3399-3407.
- Peynaud, E., Domerco, S., 1959. A review of microbiological problems in winemaking in France. *American Journal of Enology and Viticulture* 10, 69-77.
- Peynaud, E., Domercq, S., 1967. Etude de quelques coques homolactiques isolés de vins. *Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires* 22, 133-140.
- Pfannebecker, J., 2005. Diplomarbeit: Entwicklung einer PCR-Methode zur Stammanalyse von pro- und eukaryotischen Mikroorganismen aus Wein. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Pfannebecker, J., Fröhlich, J., 2008. Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of pediococci. *International Journal of Food Microbiology* 128, 288-296.
- Planta, R.J., Raué, H.A., 1988. Control of ribosome biogenesis in yeast. *Trends in Genetics* 4, 64-68.

- Poblet, M., Rozes, N., Guillamon, J.M., Mas, A., 2000. Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. *Letters in Applied Microbiology* 31, 63-7.
- Polley, A., Seigner, E., Ganai, M.W., 1997. Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers. *Genome* 40, 357-361.
- Pretorius, I.S., Van der Westhuizen T.J., Augustyn, O.P.H., 1999. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. a review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 20, 61-74.
- Quednau, M., Ahrne, S., Petersson, A.C., Molin, G., 1998. Identification of clinically important species of *Enterococcus* within 1 day with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Current Microbiology* 36, 332-336.
- Quere, F., Deschamps, A., Urdaci, M.C., 1997. DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology* 82, 783-790.
- Raccach, M., 1987. Pediococci and biotechnology. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 14, 291-309.
- Ramos, A., Lolkema, J.S., Konings, W.N., Santos, H., 1995. Enzyme basis for pH regulation of citrate and pyruvate metabolism by *Leuconostoc oenos*. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1303-1310.
- Rankine, B.C., Fornachon, J.C.M., Bridson, D.A., 1969. Diacetyl in Australian dry red wines and its significance in wine quality. *Vitis* 8, 129-134.
- Reamon-Büttner, S.M., Jung, C., 2000. AFLP-derived STS markers for the identification of sex in *Asparagus officinalis* L. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 432-438.
- Renouf, V., Claisse, O., Miot-Sertier, C., Lonvaud-Funel, A., 2006 a. Lactic acid bacteria evolution during winemaking: use of *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis. *Food Microbiology* 23, 136-145.
- Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M.C., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2006 b. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *Journal of Applied Microbiology* 100, 1208-1219.
- Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2006 c. *rpoB* gene: a target for identification of LAB cocci by PCR-DGGE and melting curves analyses in real time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 67, 162-170.
- Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 149-164.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche, B., Lonvaud, A., 2006. *Handbook of Enology. Volume 1. The Microbiology of Wine and Vinifications. 2. Auflage.* John Wiley & Sons, New York.
- Riebel, W.J., Washington, J.A., 1990. Clinical and microbiologic characteristics of pediococci. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 1348-1355.
- Röder, C., 2007. *Dissertationsarbeit: Entwicklung von molekularen Sonden für die sichere Identifizierung von Hefen der Gattungen Brettanomyces/Dekkera.* Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

- Röder, C., König, H., Fröhlich, J., 2007. Species-specific identification of *Dekkera/ Brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S rRNA. *FEMS Yeast Research* 7, 1013-1026.
- Rodas, A.M., Ferrer S., Pardo, I., 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology* 26, 412-422.
- Romano, A., Perello, M.C., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2008. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1577-1585.
- Rosini, G., Federici, F., Martini, A., 1982. Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbial Ecology* 8, 83-89.
- Roy, D., Sirois, S., Vincent, D., 2001. Molecular discrimination of lactobacilli used as starter and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Current Microbiology* 42, 282-289.
- Ruitberg, C.M., Reeder, D.J., Butler, J.M., 2001. STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Research* 29, 320-322.
- Ruoff, K.L., Kuritzkes, D.R., Wolfson, J.S., Ferraro, M.J., 1988. Vancomycin-resistant Gram-positive bacteria isolated from human sources. *Journal of Clinical Microbiology* 26, 2064-2068.
- Ryu, S.L., Mikata, K., Murooka, Y., Kancko, Y., 1998. A simple PCR method for distinguishing *Saccharomyces cerevisiae* from its sibling species by amplification of the *RPL2* region. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86, 249-252.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
- Sakamoto, K., Konings, W.N., 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology* 89, 105-124.
- Sanger, F., Niclen, S., Coulen, A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.
- Sardesai, N., Kumar, A., Rajyashri, K., Nair, S., Mohan, M., 2002. Identification and mapping of an AFLP marker linked to *Gm7*, a gall midge resistance gene and its conversion to a SCAR marker for its utility in marker aided selection in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 105, 691-698.
- Sato, H., Yanagida, F., Shinohara, T., Suzuki, M., Suzuki, K., Yokotsuka, K., 2001. Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* isolated during winemaking in Japan. *FEMS Microbiology Letters* 202, 109-114.
- Sato, H., Yanagida, F., Shinohara, T., Yokotsuka, K., 2000. Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes in lactic acid bacteria isolated from red wine. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90, 335-337.
- Satokari, R., Mattila-Sandholm, T., Suihko, M.L., 2000. Identification of pediococci by ribotyping. *Journal of Applied Microbiology* 88, 260-265.
- Shimwell, J.L., 1948. A study of ropiness in beer. Part II: Ropiness due to tetrad-forming cocci. *Journal of the Institute of Brewing* 54, 237-244.

- Sieiro, C., Cansado, J., Agrelo, D., Velázquez, J.B., Villa, T.G., 1990. Isolation and enological characterization of malolactic bacteria from the vineyards of northwestern Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 2936-2938.
- Simpson, W.J., Taguchi, H., 1995. The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. Aus: Wood, B.J.B. und Holzapfel, W.H., (Editoren) *The genera of lactic acid bacteria*, Seite 125-172. Blackie Academic & Professional, London.
- Simpson, P.J., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., 2002. Genomic diversity within the genus *Pediococcus* as revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 765-771.
- Silla Santos, M.H. 1996. Biogenic amines: their importance in food. *International Journal of Food Microbiology* 29, 213-231.
- Sims, W., 1986. The isolation of pediococci from human saliva. *Archives of Oral Biology* 11, 967-972.
- Snowdon, E.M., Bowyer, M.C., Grbin, P.R., Bowyer, P.K., 2006. Mousy off-flavor: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 6465-6474.
- Sponholz, W.R. 1993. Wine spoilage by microorganisms. Aus: *Wine Microbiology and Biotechnology*. Fleet, G.H. (Editor), Kapitel 14, 395-420. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Sponholz, W.R., Dittrich, H.H., Barth, A., 1982. Über die Zusammensetzung essigstichiger Weine. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 78, 423-428.
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M., 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 846-849.
- Stender, H., Kurtzman, C., Hyldig-Nielsen, J.J., Sørensen, D., Broomer, A., Oliveira, K., Perry-O'Keefe, H., Sage, A., Young, B., Coull, J., 2001. Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 938-941.
- Stiles, M.E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 331-345.
- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36, 1-29.
- Stratton, J.E., Hutkins, R.W., Taylor, S.L, 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of Food Protection* 54, 460-470.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A., Calderón, F., 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry* 102, 10-21.
- Tamai, Y., Momma, T., Kaneko, Y., 1998. Co-existence of two types of chromosome in the bottom fermenting yeast, *S. pastorianus*. *Yeast* 14, 923-933.
- Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Munro, J., Alatossava, T., 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4264-4267.

- Tenreiro, R., Santos M.A., Brito, L., Paveia, H., Vieira, G., 1994. Inter-strain relationships among wine leuconostocs and their divergence from other *Leuconostoc* species, as revealed by low frequency restriction fragment analysis of genomic DNA. *Journal of Applied Bacteriology* 77, 271-280.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24, 4876-4882.
- Tilsala-Timisjärvi, A., Alatosava, T., 1997. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Microbiology* 35, 49-56.
- Tilsala-Timisjärvi, A., Alatosava, T., 1998. Strain-specific identification of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* with randomly amplified polymorphic DNA-derived PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4816-4819.
- Timke, M., Wang-Lieu, N.Q., Altendorf, K., Lipski, A., 2005. Fatty acid analysis and spoilage potential of biofilms from two breweries. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1108-1122.
- Torriani, S., Zapparoli, G., Malacrinò, P., Suzzi, G., Dellaglio, F., 2004. Rapid identification and differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and their hybrids by multiplex PCR. *Letters in Applied Microbiology* 38, 239-244.
- Torriani, S., Zapparoli, G., Suzzi, G., 1999. Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 75, 207-15.
- Tsygankova, S.V., Boulygina, E.S., Ignatov, A.N., Kuznetsov, B.B., Korotkov, E.V., 2008. Use of DIR-PCR for elaboration of molecular markers of intraspecies bacterial groups as exemplified by *Bacillus thuringiensis* [russisch]. *Mikrobiologiya* 77, 40-45.
- Tyrrell, G.J., Bethune, R.N., Willey, B., Low, D.E., 1997. Species identification of enterococci via intergenic ribosomal PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 1054-1060.
- Van der Walt, J.P., 1964. *Dekkera*, a new genus of the *Saccharomycetaceae*. *Antonie Leeuwenhoek* 30, 273-280.
- Van Vuuren, H.J., Dicks, L.M.T., 1993. *Leuconostoc oenos*: A review. *American Journal of Enology and Viticulture* 44, 99-112.
- Vaughan Martini, A., Martini, A., 1987. Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie van Leeuwenhoek* 53, 77-84.
- Velasco, S.E., Yebra, M.J., Monedero, V., Ibarburu, I., Dueñas, M.T., Irastorza, A., 2007. Influence of the carbohydrate source on beta-glucan production and enzyme activities involved in sugar metabolism in *Pediococcus parvulus* 2.6. *International Journal of Food Microbiology* 115, 325-334.
- Ventura, M., Casas, I.A., Morelli, L., Callegari, M.L., 2000. Rapid amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) identification of *Lactobacillus* spp. isolated from fecal and vaginal samples. *Systematic and Applied Microbiology* 23, 504-509.
- Viti, C., Giovannetti, L., Granchi, L., Ventura, S., 1996. Species attribution and strain typing of *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) with restriction endonuclease fingerprints. *Research in Microbiology* 147, 651-660.

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van der Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23, 4407-4414.
- Wade, C.M., Kulbokas, E.J., Kirby, A.W., Zody, M.C., Mullikin, J.C., Lander, E.S., Lindblad-Toh, K., Daly, M.J., 2002. The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome. *Nature* 420, 574-578.
- Walling, E., Gindreau, E., Lonvaud-Funel, A., 2005. A putative glucan synthase gene *dps* detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* strains isolated from wine and cider. *International Journal of Food Microbiology* 98, 53-62.
- Walter, J., Hertel, C., Tannock, G.W., Lis, C.M., Munro, K., Hammes, W.P., 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2578-2585.
- Weiller, H.G., Radler, F., 1970. Milchsäurebakterien aus Wein und von Rebenblättern. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene II* 124, 707-732.
- Weiller, H.G., Radler, F., 1976. Über den Aminosäurestoffwechsel von Milchsäurebakterien aus Wein. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 161, 259-266.
- Welsh, J., McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18, 7213-7218.
- Werning, M.L., Ibarburu, I., Duenas, M.T., Irastorza, A., Navas, J., Lopez, P., 2006. *Pediococcus parvulus* gtf gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for specific PCR detection of β -D-glucan-producing bacteria in foods and beverages. *Journal of Food Protection* 69, 161-169.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Seite: 315-322. Academic Press.
- Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C.R., Fleet, G.H., Lee, T.H., 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine - a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 36, 302-313.
- Williams, A.M., Rodrigues, U.M., Collins, M.D., 1991. Intrageneric relationships of enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA. *Research in Microbiology* 142, 67-74.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531-6535.
- Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51, 221-271.
- Xu, M., Huaracha, E., Korban, S.S., 2001. Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the *Vf* gene in apple. *Genome* 44, 63-70.
- Xufre, A., Albergaria, H., Inacio, J., Spencer-Martins, I., Girio, F., 2006. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108, 376-84.

- Yamada, Y., Matsuda, M., Maeda, K., Mikata, K., 1994. The phylogenetic relationships of species of the genus *Dekkera* van der Walt based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs (*Saccharomycetaceae*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 58, 1803-1808.
- Ye, G.N., Soylemezoglu, G., Weeden, N.F., Lamboy, W., Pool, R.M., Reisch, B.I., 1998. Analysis of the relationship between grapevine cultivars and clones via DNA fingerprinting. *Vitis* 37, 33-38.
- Zabeau, M., Vos, P., 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. Patent application: W09306239.
- Zapparoli, G., Reguant, C., Bordons, A., Torriani, S., Dellaglio, F., 2000. Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Current Microbiology* 40, 351-355.
- Zavaleta, A.I., Martinez-Murcia, A.J., Rodriguez-Valera, F., 1997 a. 16-23S rDNA intergenic sequences indicate that *Leuconostoc oenos* is phylogenetically homogenous. *Microbiology* 142, 2105-2114.
- Zavaleta, A.I., Martinez-Murcia, A.J., Rodriguez-Valera, F., 1997 b. Intraspecific genetic diversity of *Oenococcus oeni* as derived from DNA fingerprinting and sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1261-1267.
- Zè-Zè, L., Tenreiro, R., Paveia, H., 2000. The *Oenococcus oeni* genome: physical and genetic mapping of strain GM and comparison with the genome of a “divergent” strain, PSU-1. *Microbiology* 146, 3195-3204.
- Zhang, B., Tong, H., Dong, X., 2005. *Pediococcus cellicola* sp. nov., a novel lactic acid coccus isolated from a distilled-spirit-fermenting cellar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 2167-2170.
- Zheng, C., Chang, R., Qiu, L., Chen, P., Wu, X., Chen, S., 2003. Identification of a RAPD/SCAR marker linked to a resistance gene for soybean mosaic virus in soybean. *Euphytica* 132, 199-210.
- Zouhar, M., Marek, M., Douda, O., Mazáková, J., Rysánek, P., 2007. Conversion of sequence-characterized amplified region (SCAR) bands into high-throughput DNA markers based on RAPD technique for detection of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* in crucial plant hosts. *Plant Soil and Environment* 53, 97-104.
- Zuker, M., Methews, D.H., Turner, D.H., 1999. Algorithms and thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide, NATO ASI Series, Kluwer, Dordrecht.

8. Anhang

8.1 Ribosomale Gensequenzen

8.1.1 16S rDNA-Sequenzen (Milchsäurebakterien)

Pediococcus damnosus B7 (878 bp)

GTCGGACGCACCTTCGTTGATTGAATTAGAGATGCTTGCATCGAAGATGATTTCAACTATAAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAA
CACGTGGGTAACCTGCCAGAAAGTGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAATAAAATGAACCGCATGGTTTATT
TTTTAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGATAAAGGCTCACCAAGGCTGTGA
TACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTAGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAAG
TGTGTGAGAGTAACCTGCTCATGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGA
AGAAGTGCATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGA
AGAACCACAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCT
GGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCC
TGGGGAGTACGACCGCAA

Pediococcus damnosus B9 (953 bp)

AGTCGGACGCACCTTCGTTGATTGAATTAGAGATGCTTGCATCGAAGATGATTTCAACTATAAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTA
ACACGTGGGTAACCTGCCAGAAAGTGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAATAAAATGAACCGCATGGTTTAT
TTTTAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGATAAAGGCTCACCAAGGCTGTG
ATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT
TCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTAGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGA
GTGTGTGAGAGTAACCTGCTCATGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
GGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCG
AAGAAGTGCATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGG
AAGAACCACAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGC
CTGGGAGTACGACCGCAAAGTTGAAACTCAAAAGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCT
ACCGGAA

Pediococcus parvulus B13 (712 bp)

CAAGTCGAACGCACCTTCGTTGATTGAATTAGAGGTGCTTGCACCGAAGATGATTTAGCTATAAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAG
TAACACGTGGGTAACCTGCCAGAAAGTGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAAGTAAACCGCATGGTTT
ACTTTTAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGATAAAGGCTCACCAAGGCAG
TGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTAGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGA
ACGTGTGTGAGAGTAACCTGCTCATGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAC
CGAAGAAGTGCATTGAAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAT
GGAAGAACCACAGTGGCGAAGGCG

Lactobacillus hilgardii B17 (861 bp)

GCAAGTCGAACCGCTTGGTCAATGAAGTTGAGTGTGCTTGCATTTAACTGATTTGACATTAAGACAGTGGCGAACCTGGTGAGTAA
CACGTGGGTAACCTGCCCGAAGCGGGGATAACATTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAACAAAACCACATGGTTTTTG
TTTTAAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTTCGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAATGA
TACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGA
GGTGTGAGAGTAACCTGATCGTGCAGGATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GTGGCAAGCGTTTCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAGGTCGTATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCG
AGAAGTGCATCGGAAACCGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGA
AGAACCACAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCT
GGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGTGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCC
T

Leuconostoc mesenteroides B30 (786 bp)

AGTCGAACGCACAGCGAAAGTGGTGCACCTTCAAGTGTGGCGAACGGGTGAGTAAACCGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTG
GGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGAATAAAAACCTTAGTGTGCGATGACACAAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTACCTA
GAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGG
CCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCA

ACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGA
CGGTACCATAACAGAAAGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATGGG
CGTAAAGCGAGCCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTG
AGTGCAGTAGAGGTAAGTGAACCTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACT
GGACTGCAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACAC
TAGGTGTTAGGA

***Lactobacillus buchneri* B30 (825 bp)**

GCAAGTCGAACGCGTCTCCGTTGATGATTTTAGGTGCTTGCACCTTGAAAGATTTAACATTGAGACGAGTGGCGAAGTGGTGAGTAA
CACGTGGGTAACTGCCCCTTGAAGTAGGGGATAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACCAAACACCTGGTTTTG
GTTTTAAAGACGGCTTCCGGCTGTCACTTTAGGATGGACCCGCGCGTATAGCTTGTGGTAAGGTAACGGCCTACCAAGGCGATG
ATACGTAGCCGACCTGAGAGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT
TCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTAGTGTGAAAGGTTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTGGAGAAGAAC
AGGTGTCAGAGTAACTGTTGACATCTTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
GGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGCGTAAAGCGAGCCGAGCGGTTTTTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACCG
GAGAAGTGCATCGGAAACCGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGG
AAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACC
TGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGTTTTCCGCC

***Leuconostoc pseudomesenteroides* B116 (783 bp)**

GCAGTCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTTGGACAACCTGCCTCAAGGC
TGGGGATAACATTTGGAACAGATGCTAATACCGAATAAACTCAGTGTGCGATGACACAAAGTTAAAGGCGCTTTGGCGTCACC
TAGAGATGGATCCGCGGTGATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGCCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATC
GGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAG
CAACGCCGCTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGGAATGATTTTAGTTT
GACCGTACCATAACAGAAAGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTG
GGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTAATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAGTGGTTAACT
TGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGAACCTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCACAGTGGCGAAGGCGGCTTA
CTGGACTGTAACGTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAAC
ACTAGGTGTTA

***Pediococcus pentosaceus* B1230 (878 bp)**

AATGCAAGTCGAACGAACCTCCGTTAATTGATTATGACGTACTTGTACTGATTGAGATTTTAAACAGAAAGTGTGGCGAACGGGT
GAGTAACACGTTGGGTAACCTGCCCAGAAGTAGGGGATAACACTGGAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAACCGCATGG
TTTTCTTTTAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCTCACCAAGGC
AGTATACGTAGCCGACTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTAGTGAAGAAGGTTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAA
GAACGTGGGTAAGAGTAACGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGCTTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCA
ACCGAAGAAGTGCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAAGAACCACAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTAAT
CCGCTGGGAGTACGACC

***Pediococcus parvulus* B140 (914 bp)**

GTCGAACGCACCTTCGTTGAATGAATTAGAGGTGCTTGCACCGAAGATGATTTTAGCTATAAAGTGTGGCGAACGGGTGAGTAA
CACGTGGGTAACCTGCCCAGAAGTAGGGGATAACACTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAAGTAAACCGCATGGTTTTACT
TTTTAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCTCACCAAGGCAGTGA
TACGTAGCCGACTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTAGTGTGAAAGGCTTTAGGGTTCGTAACACTCTGTTGTTGGAGAAGAACG
TGTGTGAGAGTAACGTCTCATGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGCTTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACCGA
AGAAGTGCATTGGAACCTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGA
AGAACCAGAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACGTGACCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCGCGC
TGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGAATTGACGGGGGCCCGCACAGC

***Lactobacillus paralimentarius* B168 (875 bp)**

GTCGAACGAACCATCTGATGATTGAAGCTTGTTCATGATTTCAGATCTTGGTGTAGTGGCGGACGGGTGAGTAAACGTTGGGTAAC
CTGCCCAGAAGTGGGGATAACATTTGGAACAAAGTGTCTAATACCGCATAACAACCTTAGATCACATGATCTTTGTTTAAAGATGG
TTTTGCTATCTCTTCTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGGGTAATAGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGACC
TGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGA
AAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGTAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTGAAGAAGACATATGTGAGAGTAA
CTGTTACGTTACTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG
TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAAATGTAGGCGGTTTTAATTAAGTTTGAAGTGAAGCCCTCGGCTCAACCGAGGAGTGTCTCGA
AACTGGTAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCACAGTGG
CGAAGCGGCTTTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGATTCGAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCC
GTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGAT
CGCAAGATTGAAACT

TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCG
GCTTAACCGAAGAAGTGCATTGGAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGAACCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGTCTGTGGTCTGTAAGTGCAGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTA
GCATTCCGC

***Pediococcus parvulus* B428 (848 bp)**

TCGAACGCACCTTCGTTGAATGAATTAGAGGTGCTTGACCCGAAGATGATTTTAGCTATAAAGTGAAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC
ACGTGGGTAACCTGCCAGAAGTGGGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCCGATAACAAAGTAAACCGCATGGTTTACTT
TTAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGTATTAGCTAGTTGGTGAGATAAAGGCTCACCAAGGCAGTGTAT
ACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
CACAATGGACGAAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGTGAAGCTTTAGGGTCGTAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAAGCT
GTGTGAGAGTAAGTGTCTATGCAGTGCAGGTATCCAACGAGAAAGCCAGGCTAAGTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGTAGG
TGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAA
GAAGTGCATTGGAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGAAGTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAA
GAACACCAGTGGCGAAGGCGGTGTCTGGTCTGTAAGTGCAGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTA

***Pediococcus acidilactici* Stamm B702; B704; Isolat 5.1; -5.4; -5.6 (860 bp)**

CGAATTCGGTTAATTGATTATGACGTGCTTGCACTGAATGAGATTTTAAACACGAAGTGAAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG
GCAACCTGCCGAGAAGCAGGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCTGGTTTCTTTTAAAA
GATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAGTGTATGCGTAGC
CGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCACAATG
GACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTCCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAAGCTGGGTGAG
AGTAAGTGTTCACCCAGTGCAGGTATTTAACGAGAAAGCCAGGCTAAGTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGTAGGTGGCAAG
CGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGAGGCGGTCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGC
ATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGAAGTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACC
AGTGGCGAAGGCGGTGTCTGGTCTGTAAGTGCAGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ATGCCGTAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGTAAATCCGCTGGGAGT

***Enterococcus faecium* Stamm Pr. „groß“; 3857-1; 3858-2; Isolat 5.2; -5.3; -6.1; -6.2 (894 bp)**

CAAGTCGTACGTTCTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAACCTG
CCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAAACAATCGAAACCGCATGGTTTGGATTTGAAAGGCGCTTT
CGGGTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCAGATGCATAGCCGACCTG
AGAGGGTGTATCGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAA
GTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTCCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACT
GTTTATCCCTTGACGGTATCTAACGAGAAAGCCAGGCTAAGTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC
CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA
ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCG
AAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTGCAGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGAGTGTAAAGTGTGGAGGTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGACCG
CAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC

***Pediococcus pentosaceus* B703 (759 bp)**

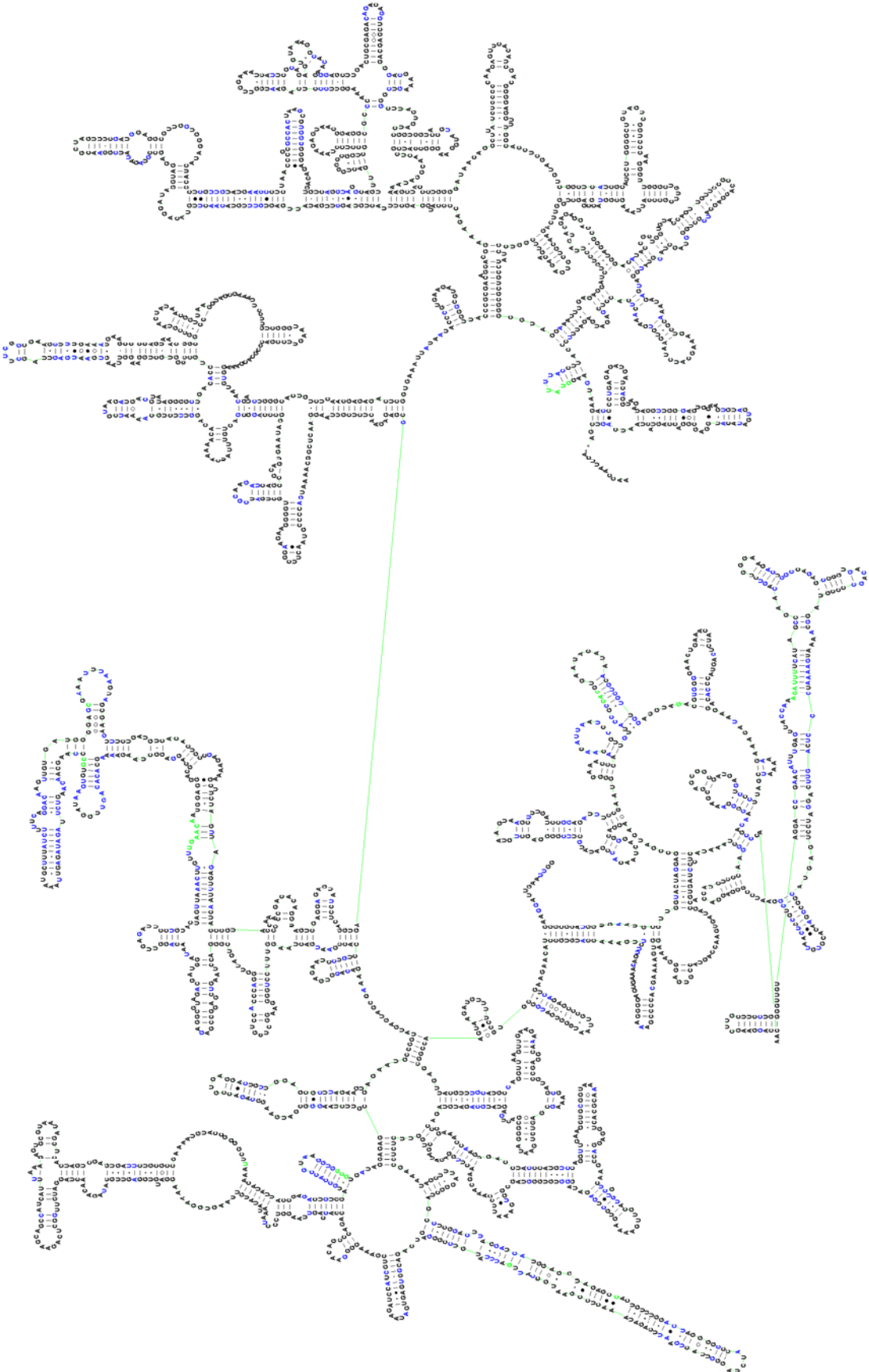
GTCGAACGAACCTCCGTTAATTGATTATGACGTACTTGTACTGATTGAGATTTTAAACGAAGTGAAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC
ACGTGGGTAACCTGCCAGAAGTAGGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTCTT
TTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGGCAGTGTATA
CGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
ACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTCCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAAGCTG
GGTAAGAGTAAGTGTTTACCCAGTGCAGGTATTTAACGAGAAAGCCAGGCTAAGTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGTAGGT
GGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAG
AAGTGCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGAAGTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAAG
AACACCAGTGGCGAAGGCGGTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAG

8.1.2 ITS-Sequenzen (Hefen)

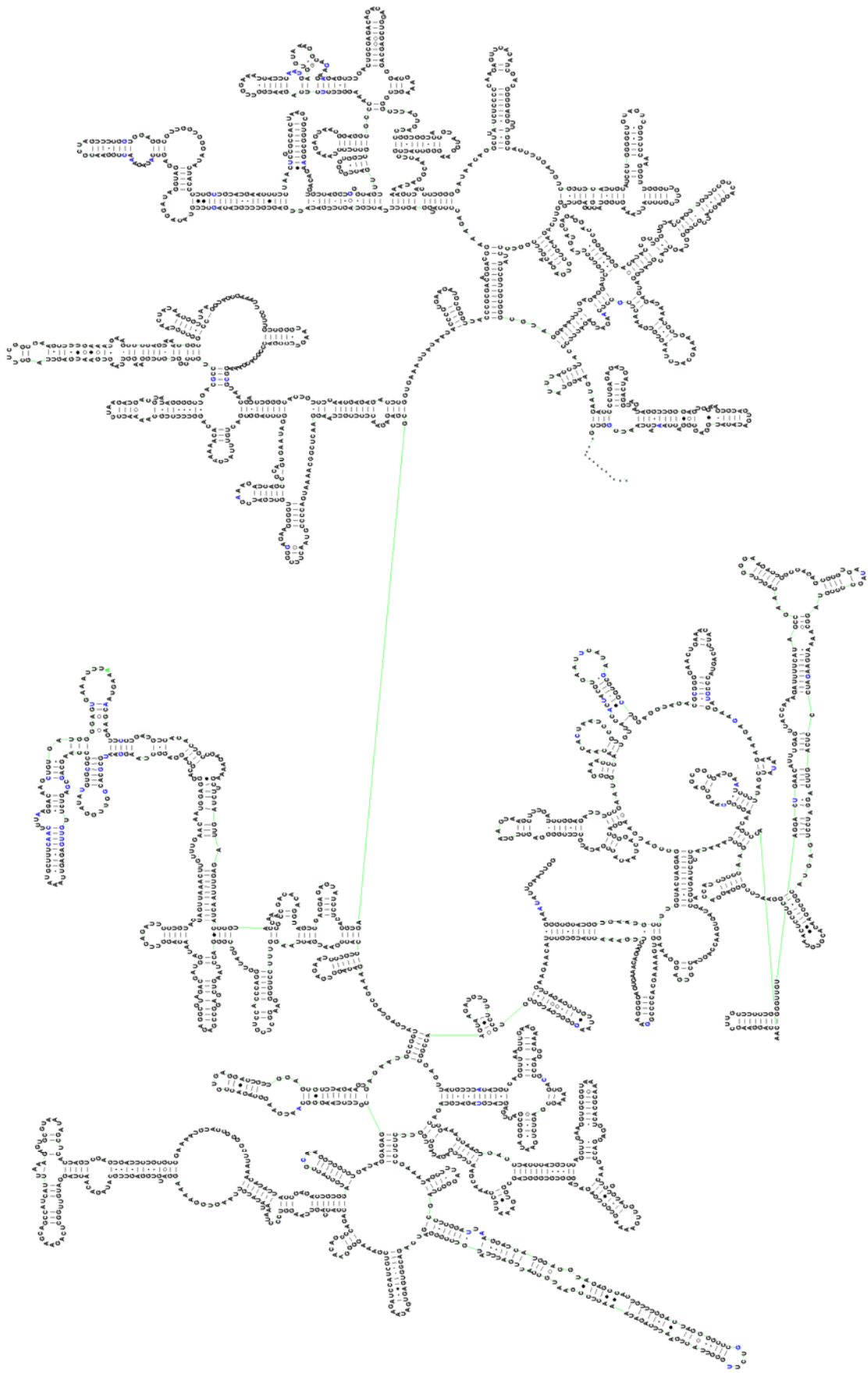
***Saccharomyces cerevisiae* Stamm KOH1; KOH2; KOH3; KOH4 (761 bp)**

GGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAA
GTGCGGGTCTTGCTAGGCCTTGAAGTTCTTTCTTCTGCTATTCCAAACGGTGAAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTA
AAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCAATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCAATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTA
ACAAACACAAACAATTTATCTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAAGTGAATTTTAAATATTAATAACT
TTCAACAACGGATCTCTTGGTCTCGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTCGAGAATTCCTGTAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGGAGCGTATTTCTTCTCAACATTTCTGTT
TGGTAGTGAAGTACTCTTTGGAGTAACTTGAATTTGCTGGCCTTTTCAATTGGATGTTTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCT

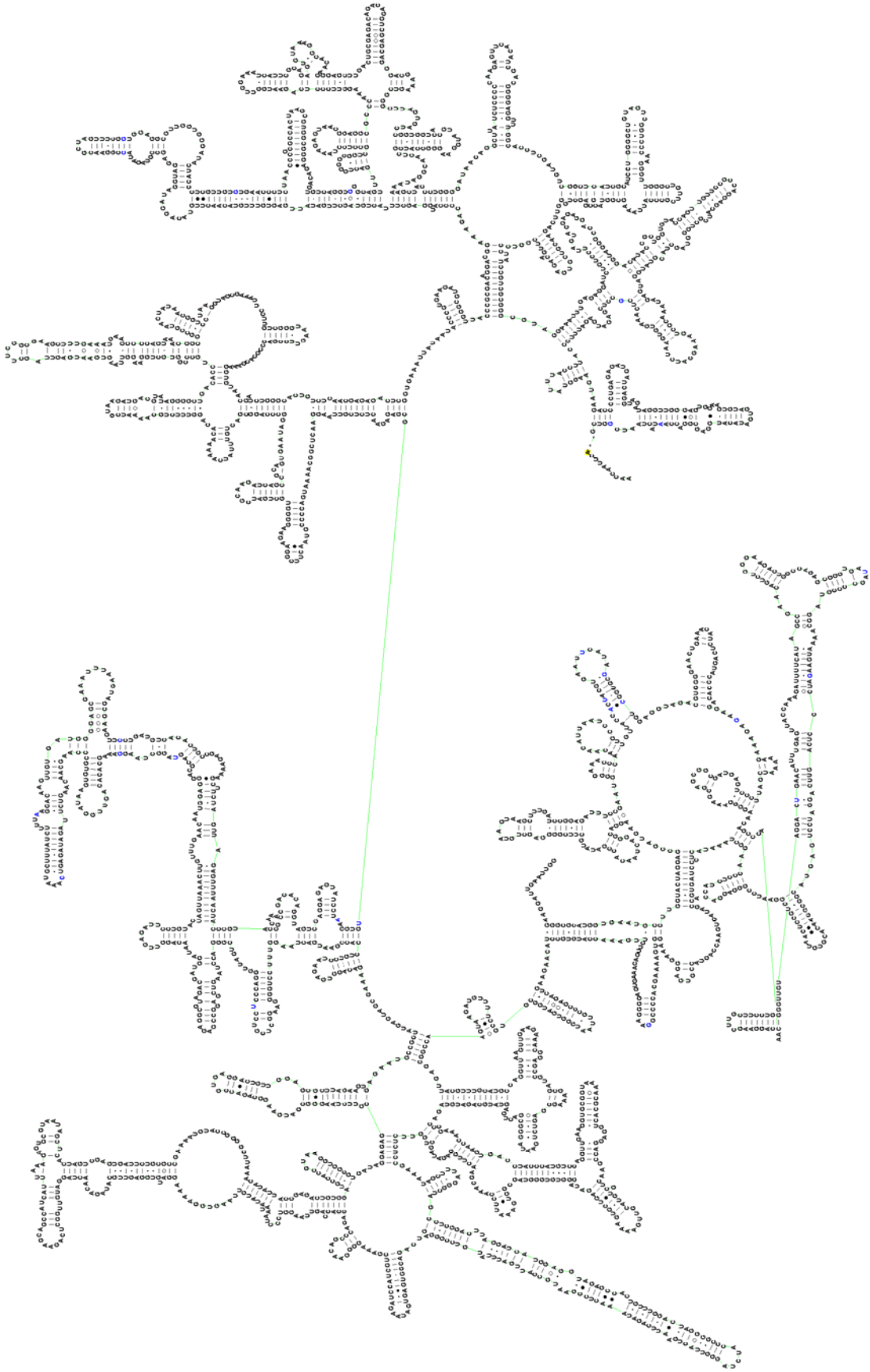
<i>P. acidilactici</i>	TTAG-CGTAAG---CGAAGCTTTGAACTGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTATAA
<i>P. claussenii</i>	TTAG-CGTAAG---CGAAGCTTTGAACTGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTATAA
<i>P. cellicola</i>	TTAG-CTTCGG---CGAAGCTTTGAAATGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTATAA
<i>P. parvulus</i>	TTAG-CTTCGG---CGAAGCTTTGAAATGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTATAA
<i>P. damnosus</i>	TTAG-CTTCGG---CGAAGCTTTGAAATGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTATAA
<i>P. inopinatus</i>	TTAG-CTTCGG---CGAAGCTTTGAAATGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTATAA
<i>L. plantarum</i>	TTAG-CTTCGG---CGAAGCTCAGAATTGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTATAA
<i>L. reuteri</i>	TTAG-CTTCGG---CGAAGCTCAGAATTGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTATAA
<i>W. confusa</i>	TTAG-CTTCGG---CGAAGGTACGAATTGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTATAA
<i>W. paramesenteroides</i>	TTAG-CTTCGG---CGAAGGTACGAATTGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTATAA
<i>L. mesenteroides</i>	TTAG-CTTCGG---CGAAGGTACGAATTGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTATAA
<i>L. carnosum</i>	TTAG-CTTCGG---CGAAGGTACGAATTGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTATAA
<i>O. oeni</i>	TTAG-CTTCGG---CGAAGGTCTTAATTGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTATAA
<i>O. kitaharae</i>	TTAG-CTTCGG---CGAAGGTCTGAATTGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACTATAA
	**** * * ** * * *****
	11110111101000111111100111
<i>L. amylolyticus</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCTGCACGAAAGGTGTAAT
<i>L. acidophilus</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCTGCACGAAAGGTGTAAT
<i>L. delbrueckii</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCTGCACGAAAGGTGTAAT
<i>S. pyogenes</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAT
<i>S. thermophilus</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAT
<i>S. mutans</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAT
<i>L. lactis</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAT
<i>E. faecium</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAC
<i>E. durans</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCTGCACGAAAGGCGTAAC
<i>E. faecalis</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAC
<i>T. halophilus</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAC
<i>E. solitarius</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAC
<i>S. aureus</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAC
<i>L. carnosum</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAC
<i>L. sakei</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAT
<i>P. dextrinicus</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAT
<i>P. pentosaceus</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAC
<i>P. stilesii</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAC
<i>P. acidilactici</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAC
<i>P. claussenii</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAC
<i>P. cellicola</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAC
<i>P. parvulus</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAC
<i>P. damnosus</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGTGTAAC
<i>P. inopinatus</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGTGTAAC
<i>L. plantarum</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAC
<i>L. reuteri</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAC
<i>W. confusa</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAC
<i>W. paramesenteroides</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAC
<i>L. mesenteroides</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAC
<i>L. carnosum</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCACGAAAGGCGTAAC
<i>O. oeni</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCATGAAAGGTGTAAT
<i>O. kitaharae</i>	CGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCGACCCGCATGAAAGGTGTAAT
	***** ** * * *
	11
<i>L. amylolyticus</i>	GATTTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATTATAATACCCGTGAAGATGCGGG
<i>L. acidophilus</i>	GATTTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATTATAATACCCGTGAAGATGCGGG
<i>L. delbrueckii</i>	GATTTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATTATAATACCCGTGAAGATGCGGG
<i>S. pyogenes</i>	GATTTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATTTAGTACCTGTGAAGATGCAGG
<i>S. thermophilus</i>	GATTTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATTTAGTACCTGTGAAGATGCAGG
<i>S. mutans</i>	GATTTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATTTAGTACCTGTGAAGATGCAGG
<i>L. lactis</i>	GATTTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATTTAGTACCTGTGAAGATGCAGG
<i>E. faecium</i>	GATTTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATTTAGTACCTGTGAAGATGCAGG
<i>E. durans</i>	GATTTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATTTAGTACCTGTGAAGATGCAGG
<i>E. faecalis</i>	GATTTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATTTAGTACCTGTGAAGATGCAGG
<i>T. halophilus</i>	GATTTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATTTAGTACCTGTGAAATGCAGG
<i>E. solitarius</i>	GATTTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATTTAGTACCTGTGAAGATGCAGG
<i>S. aureus</i>	GATTTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATCATAGTACCTGTGAAGATGCAGG
<i>L. carnosum</i>	GATTTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATCATAGTACCTGTGAAGATGCAGG
<i>L. sakei</i>	GATTTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATTATAATACCCGTGAAGATGCGGG
<i>P. dextrinicus</i>	GATTTGGGCACTGTCTCAACGATAGACTCGGTGAAATTATAATACCCGTGAAGATGCGGG
<i>P. pentosaceus</i>	GATCTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATTATAATACCCGTGAAGATGCGGG
<i>P. stilesii</i>	GATCTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATTATAATACCCGTGAAGATGCGGG
<i>P. acidilactici</i>	GATCTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATTATAATACCCGTGAAGATGCGGG
<i>P. claussenii</i>	GATTTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATTATAATACCCGTGAAGATGCGGG
<i>P. cellicola</i>	GATCTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATTATAATACCCGTGAAGATGCGGG
<i>P. parvulus</i>	GATCTGGGCACTGTCTCAACGAGAGACTCGGTGAAATTATAATACCCGTGAAGATGCGGG



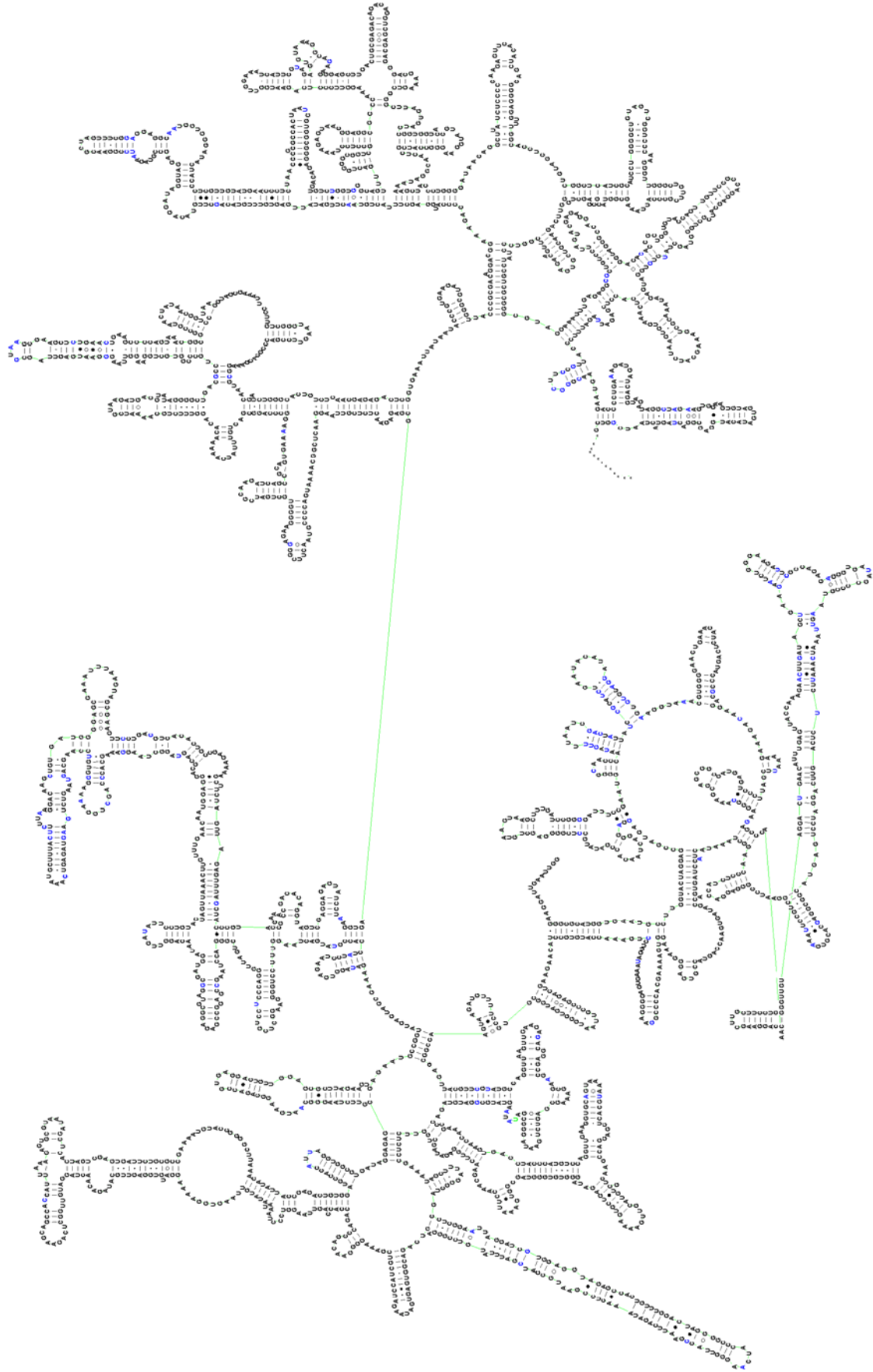
LSU (23S) ribosomale RNA von *P. dammosus* Stamm DSM 20331^T (Acc. EF116574) vs. *Lactococcus lactis* (Acc. X68434)



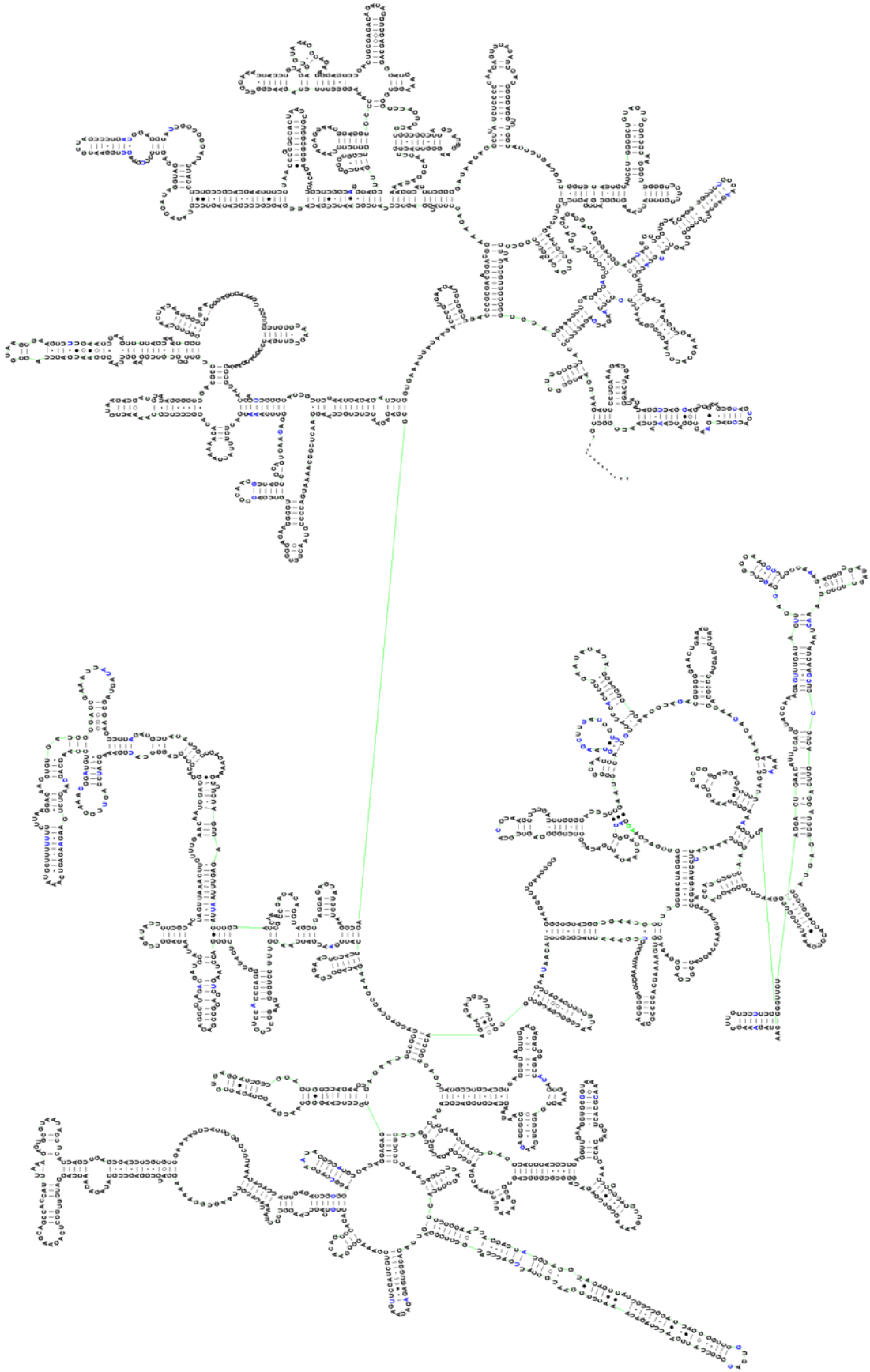
LSU (23S) ribosomale RNA von *P. parvulus* Stamm DSM 20332^T (Acc. EF116573) vs. *P. damnosus* (Acc. EF116574)



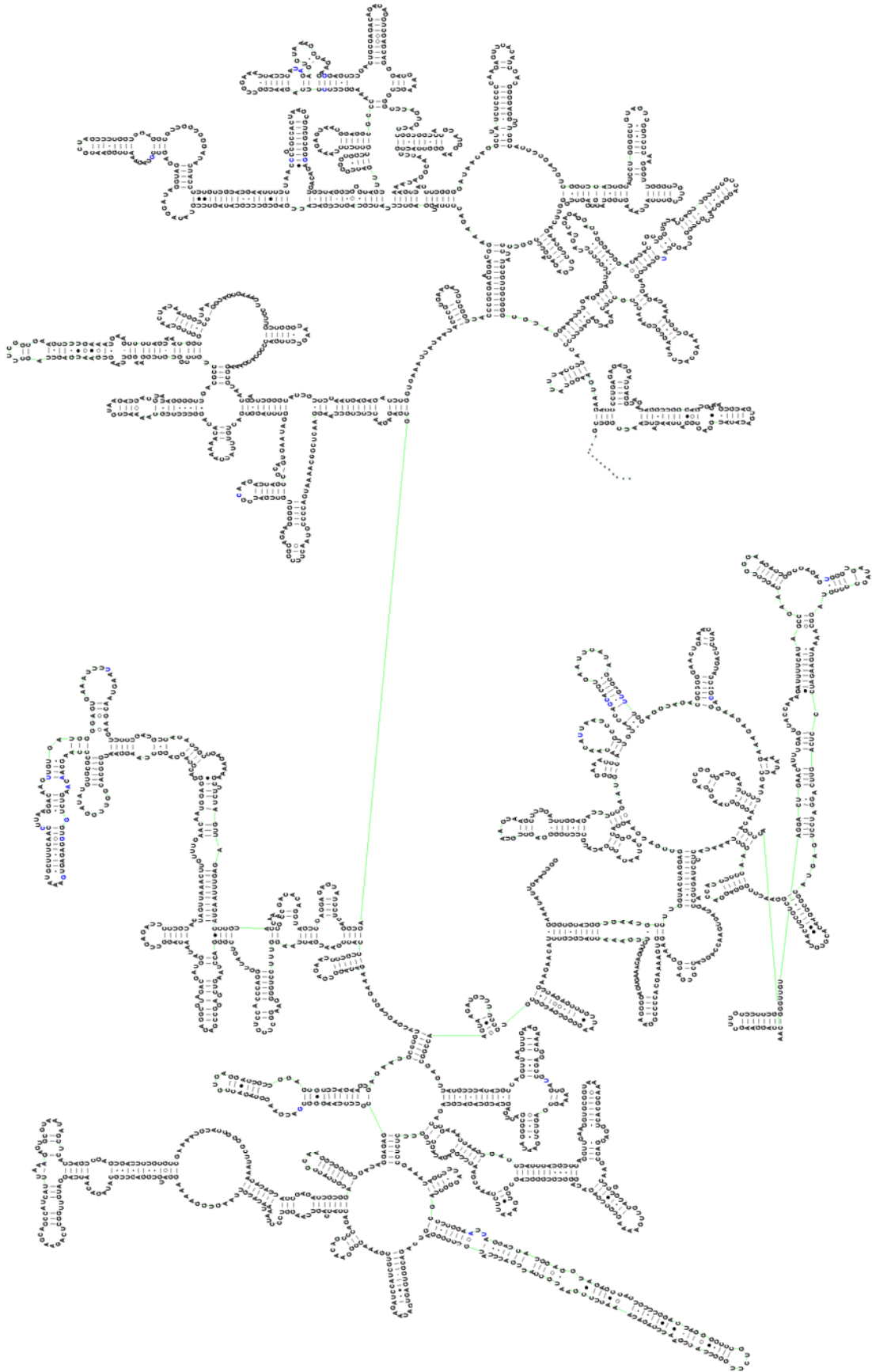
LSU (23S) ribosomale RNA von *P. inopinatus* Stamm DSM 20285^T (Acc. EF116576) vs. *P. damnosus* (Acc. EF116574)



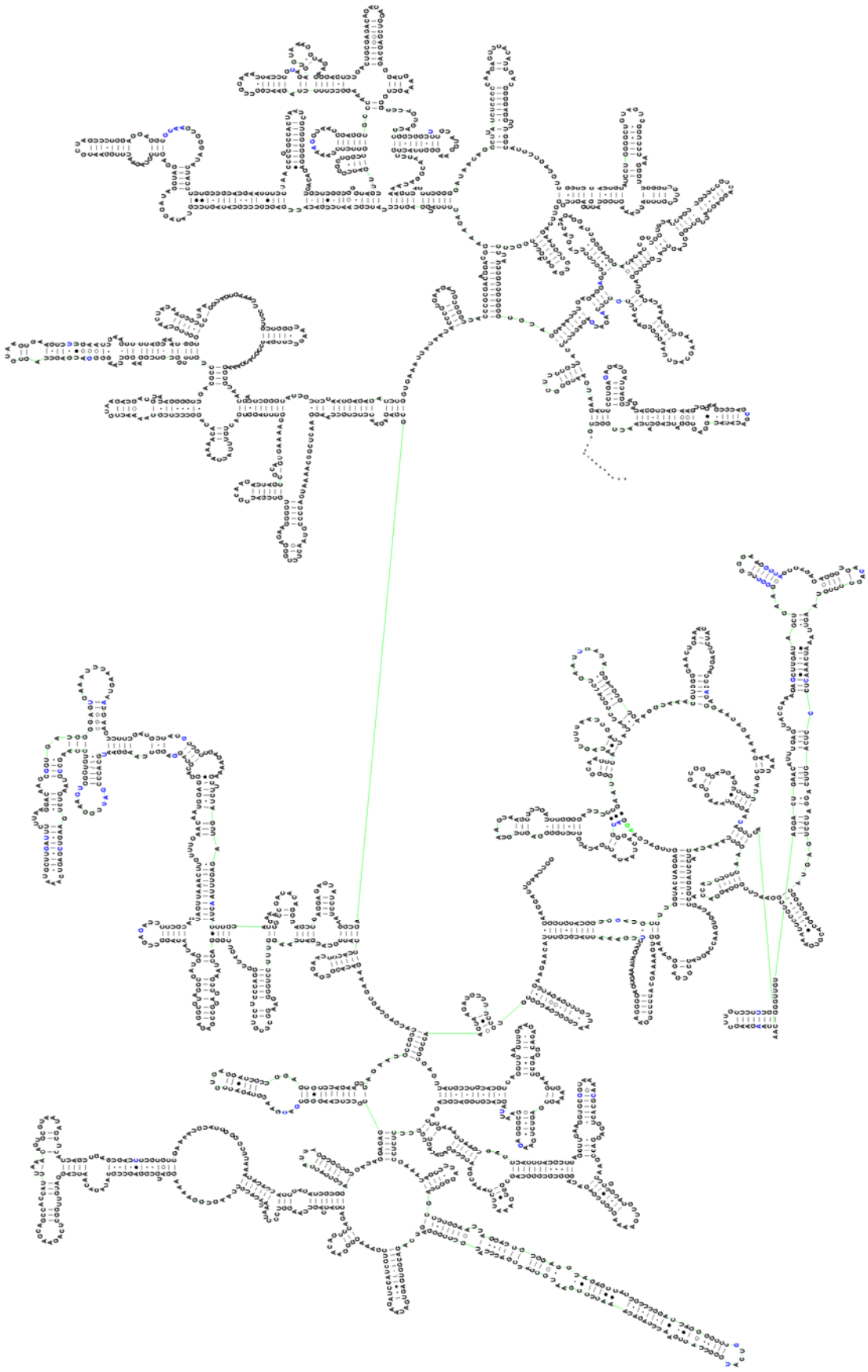
LSU (23S) ribosomale RNA von *P. pentosaceus* Stamm DSM 20336^T (Acc. EF116577) vs. *P. damnosus* (Acc. EF116574)



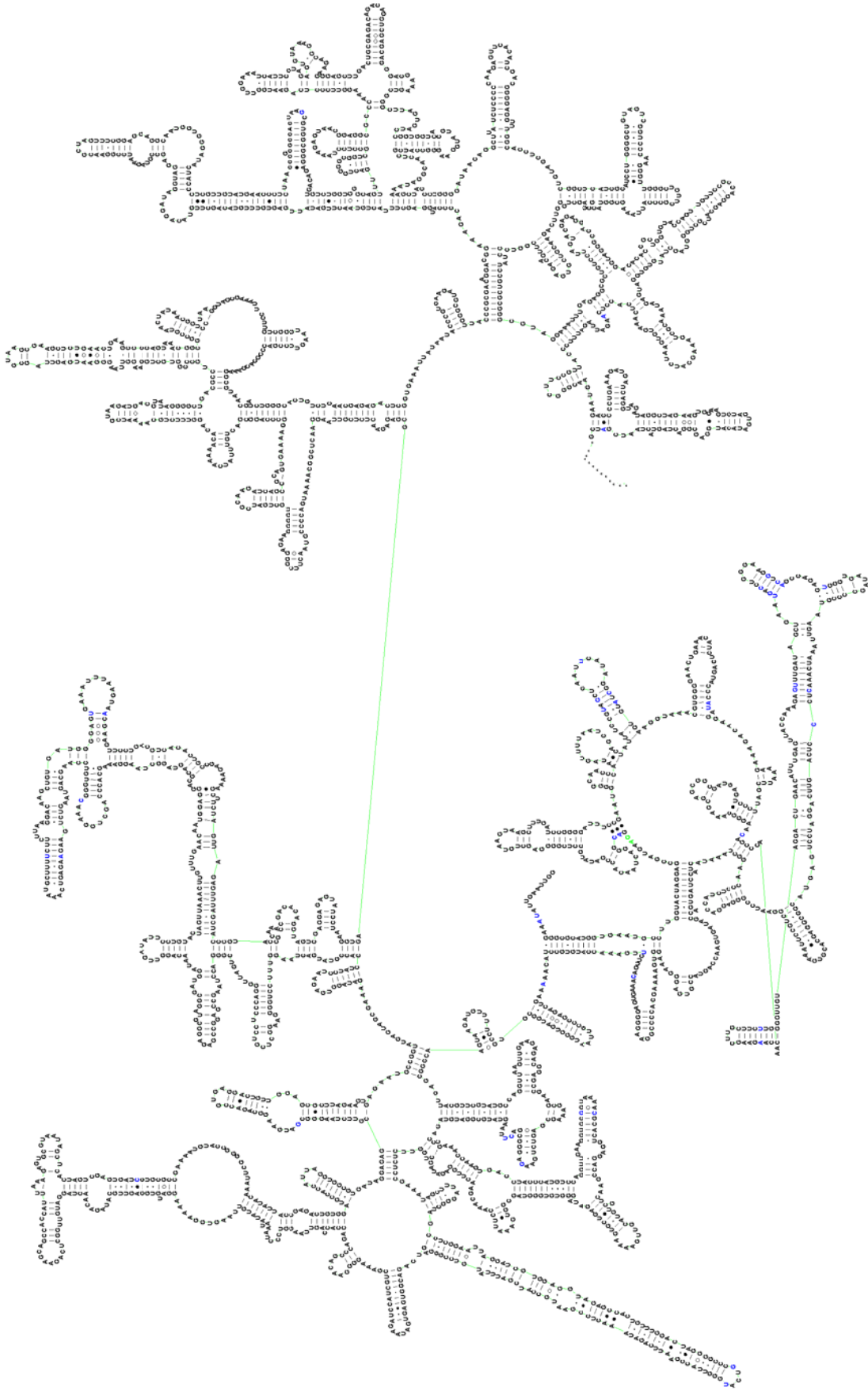
LSU (23S) ribosomale RNA von *P. clausenii* Stamm DSM 14800^T (Acc. EF116578) vs. *P. pentosaceus* (Acc. EF116577)



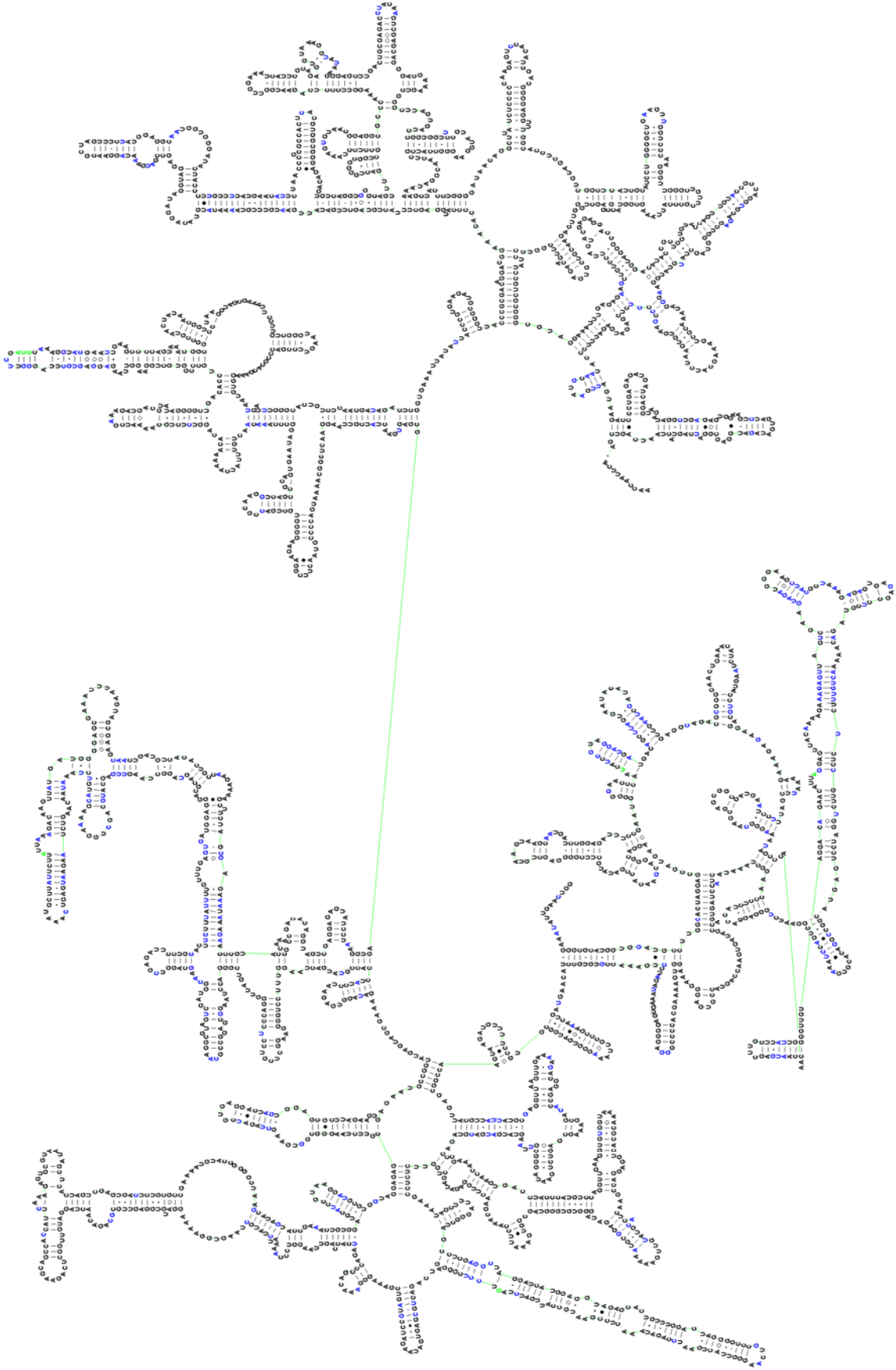
LSU (23S) ribosomale RNA von *P. cellicola* Stamm DSM 17757^T (Acc. EF397603) vs. *P. parvulus* (Acc. EF116573)



LSU (23S) ribosomale RNA von *P. acidilactici* Stamm DSM 20284^T (Acc. EF116575) vs. *P. pentosaceus* (Acc. EF116577)



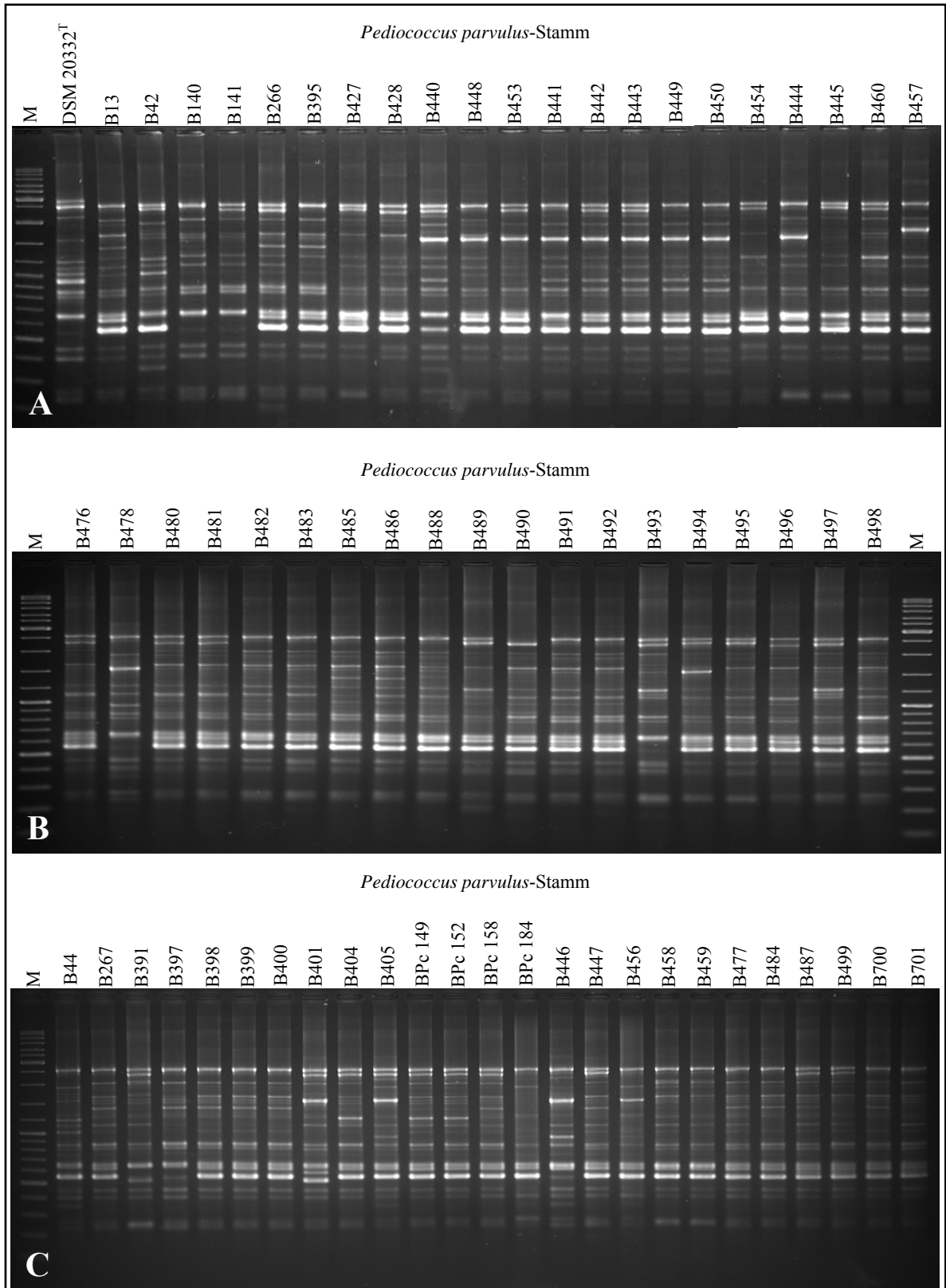
LSU (23S) ribosomale RNA von *P. stilesii* Stamm DSM 18001^T (Acc. EF397604) vs. *P. pentosaceus* (Acc. EF116577)

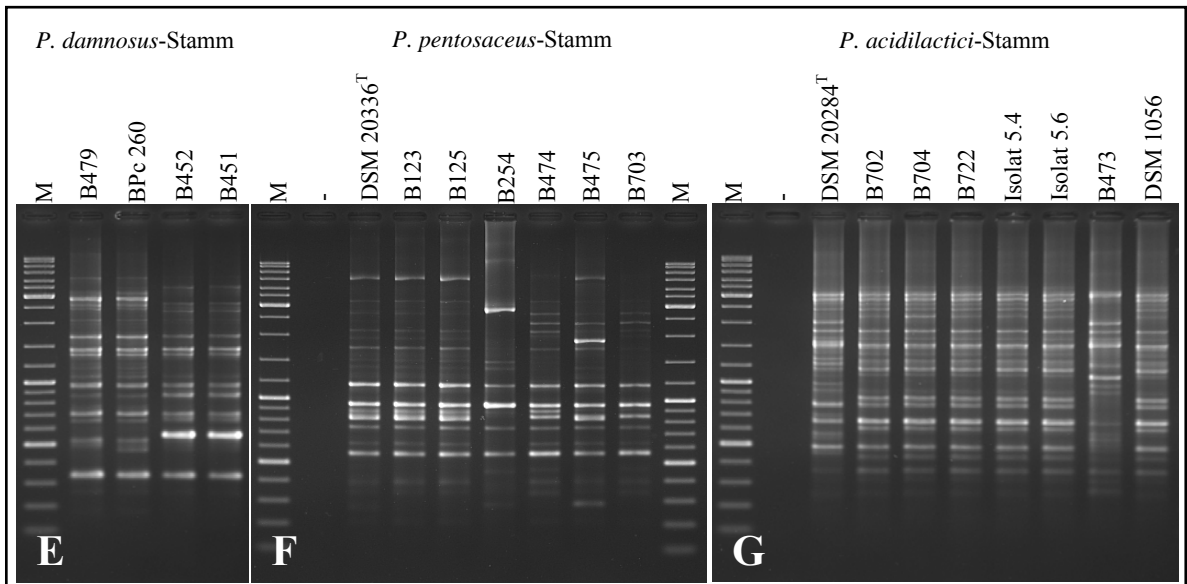
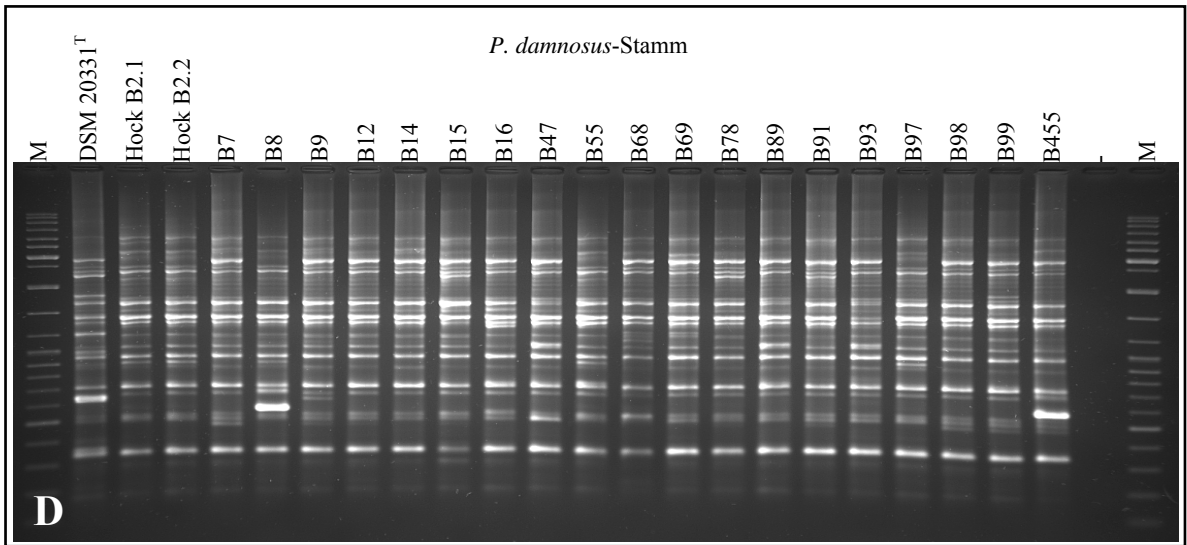


LSU (23S) ribosomale RNA von *P. dextrinicus* Stamm DSM 20335^T (Acc. EF116579) vs. *P. damnosus* (Acc. EF116574)

8.4 DNA Fingerprint-Bandenmuster der Pediokokken

Alle SAPD-PCR Ansätze wurden mit Primer G-Not (Tab. 7) durchgeführt (vgl. Kap. 3.8.1).





8.5 Datenmatrizen zur Cluster-Analyse

8.5.1 *Pediococcus*-Typstämme

Datenmatrix zur Cluster-Analyse der *Pediococcus*-Typstämme (Abb. 17).

Gelbild Stamm	A-Not (Abb. 14 A)	C-Not (Abb. 14 B)
DSM 20331 ^T	0000010001110100001010010111000101001001001010000000100	00000001011000
DSM 20285 ^T	0000001001010100100011110101011000110000100010001001010	00000000111000
DSM 20332 ^T	00000100100101100110011011010101011001011001000010000000	00100010101010
DSM 17757 ^T	0000011101000110010100101011001111101100110100100000000	00001001000101
DSM 14800 ^T	10000010000111000011001101110110011100100101010100000000	00110010111011
DSM 18001 ^T	0010000010100001011001010101010100110001100001001101000	10000011101101
DSM 20284 ^T	0001000000010111000100100011110100000101010010001010000	00001010100111
DSM 20336 ^T	0010100000010001001011010011111001010101000111010100000	01000000111000
DSM 20335 ^T	0001001001000101001000010110110110111101001111010000001	00010000001011

Gelbild Stamm	C-Not (Abb. 14 B)	G-Not (Abb. 15 A)
DSM 20331 ^T	001011101010011011011001011010001001000100000011101011011001000111000	
DSM 20285 ^T	000011110110101011011100100010000010001000010000101000101010101000100	
DSM 20332 ^T	010101101011010111101111010100000010000000010011101011101011011010111	
DSM 17757 ^T	11000110100011101110111101010100100000000000010001001001110101101010	
DSM 14800 ^T	101010101010110110001010010010010100000000001110011010101000011101	
DSM 18001 ^T	011001110001111010100110000101001000100000000101000101010101010011010	
DSM 20284 ^T	01101101010011010110101010000010010101000000110100101111010111010101	
DSM 20336 ^T	101101001010010110101001010100100000001010001001001001011001010101011	
DSM 20335 ^T	001101001011011000011110010010010000100000110100010101100000101010111	

Gelbild Stamm	G-Not (Abb. 15 A)	T-Not (Abb. 15 B)
DSM 20331 ^T	1010011010010000010001001110010110100111011010100101100011011000	
DSM 20285 ^T	1001000000010000010001000100110010011011010011101001001010001000	
DSM 20332 ^T	011010011001011000010000100101011000101110101110010000011101010	
DSM 17757 ^T	11000010001010000001001101000111010110111001011100010001010000	
DSM 14800 ^T	1100010001010000011101001100001101010100100101100100010100010001	
DSM 18001 ^T	1110100100010100001011000100101111010100110100010100100100100000	
DSM 20284 ^T	01101101001010100000000010011000100110011011010101001001011100000	
DSM 20336 ^T	101001010101010010000000000001000101010001101010100100000100	
DSM 20335 ^T	1011100110101001000000001001000100101101110111010101010000010010	

8.5.2 *Oenococcus oeni*-Stämme aus Starterkulturen

Datenmatrix zur Cluster-Analyse der *Oenococcus oeni*-Stämme (Abb. 22).

Gelbild Stamm	C-Not-A (Abb. 20)	C-Not-C (Abb. 21 A)	C-Not-T (Abb. 21 B)
SK1	010000010110010100001101001000100011000101101100100110100000110011100		
SK2	01000000011001001000110100100010001100011000101100100100110100000110011100		
SK3	1100000001100100100010010010001000100101100101100100100100100100110010100		
B70	000100101110010010001101010110001011101101001010010100100100110011101		
B325	0110000001100100100101010001001000110011001101100100100110101000110011100		
B350	01000000011001001001010100100010001110110110110100100110101000110010100		
B352	01000000010010001001100100100010001100011100101101100100010100000010010100		
B354	01110001011010010001110100100010001100011001101101100100110100100110010100		
B358	011100110100100100100010001000110011100101101011111011010110010010100		
B359	011100110110110100100010001000110011101101100111110010100110010010100		
B367	0111000001100101001000100011001100111011011001011010110100010010100		
B377	011100010110110100100010001000110010101101101011111010110010110010100		
B378	01110001011011010010010100100010001010010100101101100100100010010100		
VB111 (A)	010100000110110010011101001000100011000110011011011001001000000010010100		
VB111 (B)	01010001011010001001101000100010001100011001011101100100100100000010010100		
VB222	01010000011010001001100100100010001100110011011011001001001000100100100		
VB666	11110010011011001001110101100010001100110011001100100100101000000010010100		
VBStamm7	011000000110100010011001001101100011001101100100100110100000010010100		
Tegaferm	01010001011001010001100100100010001100011100101101100100110100000010010100		

Gelbild Stamm	C-Not-T (Abb. 21 B)
SK1	10100110110010000101100
SK2	10100110110010000101100
SK3	10100110110010101001100
B70	11110010100011100101100
B325	10100111110010000101100
B350	11100110110010000101100
B352	10100110110010100101100
B354	10100110110010000101100
B358	11110010110111000101100
B359	11110010110011000101100
B367	11110010110010100101000
B377	11110010110010001001101
B378	11110010110011001001100
VB111 (A)	10101010110010001001100
VB111 (B)	10101010110010001001100
VB222	10110010110010001001100
VB666	10110010110010001001000
VBStamm7	10110010110010001001100
Tegaferm	10100110110010001001100

8.5.3 Dekkera / Brettanomyces bruxellensis-Stämme

Datenmatrix zur Cluster-Analyse der *Brettanomyces bruxellensis*-Stämme (Abb. 27).

Gelbild Stamm	A-Not-C (Abb. 26 A)	A-Not-G (Abb. 26 B)	A-Not-T (Abb. 26 C)
St. 9A	001101001001001001100101001001000	10100110011011011010100	1001101101101101
St. 9B	001011001001010001100101001001000	1010101010101111110100	1001101101101101
St. 30A	001011001001011000100111001010100	10101100101011011010100	1001011011101101
St. 30B	001011001001010110100101001010100	10101010101011010110100	1001011011100
St. 34A	001010101011011001100101001010100	10100110101011010110100	1001011011010
St. 34B	001101001011010101100101000111000	10100110011011011010100	1001010111010
St. 35A	001011001011010101100101000100100	10100101011011010110100	1001011011011
St. 35B	001101001010101101100101000100100	10010101011011010110100	1001011011010
St. 75A	001011011100101011011010011100100	10010011011011011110100	1001011011000
St. 75B	001001001110101001111001010101100	10110011010111110110101	1000011111010
St. 76	001011000111101010110110010101000	1011001111111010010110	1001000111011
St. 115	001010100100010101110010010101100	10010101011011011010100	1001000000111
St. 128	001010100100100010110010010101100	10010101011011110110100	1001011011001
St. 179B	001011100101101101010100010110000	10010011011011010110100	1001101011001
St. 183A	001011001011011010101000101100000	10010011011011011010100	1001101001001
St. 183B	001011000101101001110010010100000	10100101011011011010100	1001101011001
St. 190A	001010100101100101010010010110100	10100110010011010110100	1001101011001
St. 190B	001010100100100011010011001010000	10100110011111011010100	1001101011101
St. 198	001010100100101010110010010101100	10100110011011011110100	1001101011001
St. 199	0010101001001011010010010101000	10100110010011010110010	1001101011001
St. 200	001011101000101011010011000100001	11110110010001001011010	1001101101101
St. 230	001011101001001101010100010100000	11110110011001010011010	1001101101001
St. 238A	001011001011010101100100010110000	11110110011001011011010	1001101101101
St. 238B	001011001001010101100101000110000	11110110011001011001010	1001101011101
St. 243	001011001011000101100101001110100	1111011001001100001010	1001101011100
St. 244A	001011001001010001100101001100100	11110101010111000111010	1001101001010
St. 244B	001011001011010001100101000110100	11110101010001000111010	1001011011010
St. 259A	001011001011010101100100010110100	11110011010000100011001	1001011011011
St. 259B	001011001001010001010100010101100	11110011010100100111001	1001011001010
St. 260A	001011001001001101010010010101010	11110011001001100111010	1000111011010
St. 260B	001011001000100100110010010111000	11110011001100100111010	1000111011010
St. 282	001011000100100110110010010111010	1111001101000100101010	1001011011010
St. 283	001011000100100110110010010101000	11110011010110100111010	1001011011010
St. 295	001011000100100111010010011101010	11110101010101000111010	1001010101010
St. 296	001011000100100110110010010101010	11110101010011001011010	1001011001010
St. 299	001011000100101011010100011101010	11110101010101001011011	1001001001010
St. 153A	001011001001001011010010010100000	11110101010101000111010	1001011011010
St. 253	001011001100101001111010001101000	11010101010001010111101	1001011011000
St. 256	001011001100101001111010001101100	11010101010001010111010	1001011011000
DSM 70001 ^T	001011001010100100110010000100000	01110101010011000011010	1001101001100

Gelbild Stamm	A-Not-T (Abb. 26 C)
St. 9A	00110111011011000010
St. 9B	00110111101101000010
St. 30A	00001111101001000100
St. 30B	10010111101001000100
St. 34A	00101111011001000100
St. 34B	10110110101001000010
St. 35A	00010111101011000100
St. 35B	10001111011001000010
St. 75A	11101111011010110011
St. 75B	11011011001010010010
St. 76	00101011011011000010
St. 115	00010111011111000100
St. 128	00101111011011000010
St. 179B	00010111101011000000
St. 183A	00110111001011000100
St. 183B	01001011001001100100
St. 190A	00110111101011000100
St. 190B	00110101001011000010
St. 198	00110111101001000100
St. 199	00010111101011001000
St. 200	01010111011001000000
St. 230	01010111001010100001
St. 238A	01010110101011000001
St. 238B	01010111011011000010

St.243	10010111011010100010
St.244A	11010111000110100010
St.244B	11001111001010110010
St.259A	00001111001111010010
St.259B	11001110110110100010
St.260A	01001111010111000010
St.260B	01001110110111000010
St.282	10101110101111000010
St.283	11101111011011000010
St.295	00101111010110100010
St.296	00101111001011000010
St.299	01000111000110100010
St.153A	01010111010111000010
St.253	11001111011011000010
St.256	11000111000100100100
DSM 70001 ^T	01010111010100100010

8.5.4 Hefe-Stämme unterschiedlicher Gattungen

Datenmatrix zur Cluster-Analyse von Hefen unterschiedlicher Gattungen (Abb. 31).

Gelbild Stamm	A-Not (Abb. 29)	G-Not (Abb. 30 A)
KOH1	00001011000110001001010010010101111011010010001100000	0000111001110110
KOH2	000010111000110001001010010010101111011010010010100000	0000111001110110
KOH3	00001011000110001001010001001101111011010010010100000	0000111001110110
KOH4	00001001000110000001010001001101011011010010010100000	0000111001100110
DSM 70449 ^T	00001010110110011001010001001101101011010000010000000	0000111011101010
DSM 70412 ^T	001000011101100010101100010110101101001010010001000	1010011111110000
DSM 6580 ^T	10000000011101000010101100010101111010100100010000000	0011010011101000
Hefix 2000	00001001100011000100101001001001010011001001001000000	0000111001001010
1272	00001000100011000100110001001101010010101000001000000	0000111001011011
Oenoferm	00001001100011000100101001001101110110110010001100000	0000111000111011
Anaferm	00001001100011000100101001101001110110101000001100000	0000111001010111
Primusvin	00001001100011000000101001001001110110101010001100000	0000111001011011
IOC	00001001100011000100101001010001010110101000101000000	0000111011001011
1543	00000000100100010100010100010111011001101100000010000	0000000000110000
1615	000000001001000101000101000101011001101100100010000	0000000000110000
1635	0000000010010001010001010001011101001110101010010000	0000000000110000
DSM70001 ^T	000001000010101011011101011011010100100001000100010	0000001100101010
St.30A	00000111001001101101101011100111010010110001001100010	0000011001001100
St.34A	00000111001001101101101011010111010010100001001100001	0000011001010101

Gelbild Stamm	G-Not (Abb. 30 A)	T-Not (Abb. 30 B)
KOH1	011011000100010000110110101000	001001000101001010111011011010110110111
KOH2	011011000100100010010110101000	010001000101001010111011011010110110111
KOH3	101101000100100010010111001000	010001000101001010111011011010110110101
KOH4	001101000100100100010110100000	010001000101001010111011011010110110101
DSM 70449 ^T	111011010100101010011011000010	01001011010110101011101101100110110011
DSM 70412 ^T	111011010100101011011010000010	01000001011101010111111011010110010110
DSM 6580 ^T	011011100001010101101011000000	010000100110110001011101011000110010010
Hefix 2000	1101101000100100100101110001000	010010000100101001111110111010101110111
1272	010110100010010000010110101000	010010000101001001111110111010101010111
Oenoferm	010110100010010011010111000000	010010000100101001111110111010101010111
Anaferm	010110100010010010110111000000	010010000100101010110110111010101110011
Primusvin	010110100010010001010011000000	100010001101001010111010101010101110011
IOC	000110100100001000110110000000	1000100001001010101110101010101011010011
1543	0110010100101001000100101000	0000000001101000100110001011001010101011
1615	011001001011001001001010001000	000000000110100100011000100011000101000111
1635	011001010011001001001011001000	000000000110100100101100101100101000111
DSM70001 ^T	10010001101100101010101010010	011000011100101100001101011101100001001
St.30A	1001000110100010011010010001000	001000011100101101001110001101010001101
St.34A	0001000110100010101001010000	010000011100101100001101001101100001101

Gelbild Stamm	T-Not (Abb. 30 B)
KOH1	100011101
KOH2	100011101
KOH3	100100101
KOH4	100011101
DSM 70449 ^T	100011101
DSM 70412 ^T	010010100
DSM 6580 ^T	010100010
Hefix 2000 1272	100010101
Oenoferm	100011101
Anaferm	100010101
Primusvin	100100110
IOC	100100110
1543	010010011
1615	011010011
1635	011010101
DSM70001 ^T	010000101
St.30A	010000010
St.34A	010000100

8.5.5 *Brettanomyces bruxellensis*- und *Pediococcus parvulus*-Stämme aus denselben Weinproben

Datenmatrix zur Cluster-Analyse mit *Pediococcus parvulus* (Abb. 36)

Gelbild Stamm	A-Not-C (Abb. 32 B)	A-Not-G (Abb. 33 A)	A-Not-T (Abb. 33 B)
B440 (9)	001010101001110110111101010100000	110111010011011111001000	1101110011011111001000
B441 (30)	00101110100111011111001010100101	110011011011011111001000	110111011011011111001000
B442 (34)	001011101001110110111010100101101	11110011011011011111001000	1101110011011111001000
B443 (35)	001010101001110110111010100101101	111110011011011111001000	11011110011011111001000
B444 (115)	0110101010011101111010101001000	111111011011011111001000	111111011011111001000
B445 (128)	0110011010011101111010101001000	111111011011011111001000	111111011011111001000
B447 (153)	101001010101010110111100010100100	00011110011011111001001	11011110011011111001001
B482 (260)	01010001110101011011111010100100	1111110101010001111001101111001000	111110011011111001000
B701 (299)	0101010110110101101111010100101	110011110011011111001001	11011110011011111001001

Datenmatrix zur Cluster-Analyse mit *Brettanomyces bruxellensis* (Abb. 36)

Gelbild Stamm	A-Not-C (Abb. 34 B)	A-Not-G (Abb. 35 A)	A-Not-T (Abb. 35 B)
St.9A	001101001001001001100101001001000	10100110011011011010100	1001101101101101
St.30A	001011001001011000100111001010100	10101100101011011010100	10010101101101101
St.34A	001010101011011001100101001010100	101001101010110110100	100101101101010
St.35A	001011001011010101100101000100100	10100101011011010110100	1001011011011011
St.115	001010100100010101110010010101100	10010101011011011010100	1001000000111
St.128	001010100100100010110010010101100	10010101011011110110100	1001011011001
St.153A	001011001001001011010010010100000	1111010101010100011101010010101001011011010	10101001011011010
St.260A	001011001001001101010010010101010	111100110010011001110101000111011010	1000111011010
St.299	001011000100101011010100011101010	111101010101010010110111001001001010	11001001001010

Gelbild Stamm	A-Not-T (Abb. 35 B)
St.9A	00110111011011000010
St.30A	00001111101001000100
St.34A	00101111011001000100
St.35A	00010111101011000100
St.115	00010111011111000100
St.128	00101111011011000010
St.153A	01010111010111000010
St.260A	01001111010111000010
St.299	01000111000110100010

8.5.6 Mäuse

Datenmatrix zur Cluster-Analyse der Labormäuse (Abb. 42).

Gelbild Stamm	C-Not-A (Abb. 41 A)	C-Not-C (Abb. 41 A)
A	110000100111100000100000110000000000000110000100000100000	100110100000
B	110000000111100000100000110000000000000110100100000100000	100100100000
2	110000000111000000000100110000100000000110100100000100000	100100000000
3	110000000111100100000110110100000000000110100000000100000	100100100100
5	1100000001111001000001101100000000000011000010000000000	100100000100
6	11000000011100000000000110000100000000110000100100100100	000100000000
7	110000100111100000110000110000000100100110000100100100100	000100000000
8	11010000011110010000011011000000000011011000000000000000	100100100100

Gelbild Stamm	C-Not-C (Abb. 41 A)	C-Not-G (Abb. 41 B)
A	11010011011000000011110000010000000000010000000001001000001101101111	
B	1101001101100000001111000001000000000001000000000001000001101101111	
2	110100110110000000111100000000000000001000000000001000001101101111	
3	11111011011000000011110010000100001000001000000000000000000000000110001101111	
5	111110110110000000111100100000100000000000000000000000000000000001001101111	
6	1101001001101000001111000000000010000010000001001001000001101101111	
7	10010010011000010011110000010000000000100001000001001000001101101111	
8	111110110110100000111100000000000000000000000000000100000001101101101111	

Gelbild Stamm	C-Not-G (Abb. 41 B)	C-Not-T (Abb. 41 B)
A	10000000000001100001001001001001111100001001000001111100001001001001	
B	10000000000001100001001001001001111100001000000001111100001001001001	
2	0000000000000110000100100001001111000001001000001111100001001001000	
3	10000100000100100100000100000100111110000100100000111101000001001001	
5	100001001001001001000001000001001111101001001001001111100001000001001	
6	1010000000000110000100100000100111100100100000001111101000001001000	
7	10100000000001100001001000000001111000001001000001111001000001000001	
8	1000010000010010010000010000010011111000010000000111110110000001001	

8.5.7 Menschliche Individuen

Datenmatrix zur Cluster-Analyse mit menschlichen Individuen (Abb. 44).

Gelbild Stamm	A-Not-A (Abb. 43 C)	A-Not-G (Abb. 43 D)
EI♀	00010000000000011100011011110010010000000010010011011000000000100100	
K2I♀	0001000000000001110001101101001001000000000010011011000000000100100	
K1I♂	00011000010000011100011011010010010010000000010011011000000000100100	
EI♂	0001100001000001111001101111001001000000000010011011000000000100100	
EII♀	000110100100000111100110110000100100100000000100100000100000000100100	
K1II♀	00010000000000011100011011000010010000010000010011011000000100100100	
K2II♀	0001000001000001110001101100001001000000000010011000000000100100100	
EII♂	00010010000010011111011011000010010000000000100100110000000100100100	
Z1♀	00011000000000011100011011000010010000000000100000100000000100100100	
Z2♀	00011000000001001110001101100001001000000000010000010000000000100100	
A3♀	10011000000000011100011011000010010000000000100000110000100000100100	
A1♂	0000000000001001110001101100001001000000000010000011000000000100100	
A2♂	00000000000000011100011011000010010000000000100000110000100000100100	

Gelbild Stamm	A-Not-G (Abb. 43 D)	C-Not-G (Abb. 43 E)
EI♀	111110000100000100000110000100111100100100100000000000000110000000110	
K2I♀	111110000100000100000110000100111110100110100000000000000110000000100	
K1I♂	111110000100000100000110000100111100110100100000000000000110000000110	
EI♂	111110000100000100000110000100111110110110100000000000000110000000100	
EII♀	1111101001000000010010000100111100110110110000100000000110000000100	
K1II♀	1111100000010000010011000010011111010010010010000000000110000000100	
K2II♀	11111000000010000010011000010011110011011010000100000100110000000100	
EII♂	1111100001001000001001101001001111101001101100000000000110000000100	
Z1♀	1111100000001000001001100001001111101001101100000000000110000100110	
Z2♀	1111100000001000001001100001001111101001101100000000000110000100110	

A3♀	100110000100000001001100001001111101101101100000000000011000000110
A1♂	111110000110000001001100001001111000000011000000100000110000100110
A2♂	111110000100000001001101001001111101101001000000000000110100100000

Gelbild	C-Not-G (Abb. 43 E)	C-Not-A (Abb. 43 F)
Stamm		
EI♀	0001000000011011011000000110000100100	100100000100100100111000100100
K2I♀	0000000000010011011000000110000100100	100100000100100100111000100100
K1I♂	0001000000010011011000000110000100100	100100000100100100111000100110
EI♂	0001000000010011011000000110000100100	100100000100100100111000100110
EII♀	0001000000010011011000000110000100100	100100000100100100111100000110
K1II♀	0000000000011011011000000110000100100	100100000100100100111100000110
K2II♀	0000000000011011011000000110000100100	100100000100100100111100000110
EII♂	0000000000011011011000000110100100100	100100000100100100111100000110
Z1♀	000000100100110110110000100110110100100	100100000100100100111000100110
Z2♀	000000110100110110110000100110110100100	100100000100100100111000100110
A3♀	10000000000100110110110000110000100100	100100000100100100111000100110
A1♂	10000000000110110110100000110100100100	100100000100100100111100000110
A2♂	00011000000110110110100000110000100100	10010010010000000111100000110

Gelbild	C-Not-A (Abb. 43 F)
Stamm	
EI♀	110110000000111000110110000100100100100100100000
K2I♀	110110000100111100100110000000100100100100100100
K1I♂	110110000000111100100110100100100100110110000000
EI♂	1101101000000111100100110100100100100100100100000
EII♀	110110000000111100100100100100100100100100100100
K1II♀	110110000000111100100100100100100100100100100000
K2II♀	1101101000000111000100100100100100100100100100100
EII♂	110110000000111100100110100100100100100100100100
Z1♀	1101101000000111100100100100100100100100100100100
Z2♀	1101101000000111100100100100100100100100100000000
A3♀	1110001001001001001001001001001001000000100100000000
A1♂	111000100110100100100100100100100100110110100100
A2♂	111000100110100100100100100100100100000110110000100

8.6 Gensequenzen zum Generieren der Primer für die SCAR-PCR.

Die zu den (nested) SAPD-PCR-Primer komplementären Bereiche wurden grau hinterlegt.

Die Bindungspositionen der SCAR-PCR Primer wurden rot dargestellt.

Sequenz von *Pediococcus parvulus* (Klon PPA2) (394 bp)

AGCGGCCGCGT**CGATGAATCACTTTTCGCTC**AAATGCGGGCGTGCGGATCCAAGAAAAGTGGTTCACCAGTTGCCACAACCTCAGCAGCTGTATTTTCGGCCAAGTGTGCAACGTTTTCTGTCCGTTCACGGTAATTTCAACATTTCAATTTTACATTGGCATGTGAAATGCCGCGATGTACGAAAAATACCTTGAGCTAAAGTTGTAGTGCCTTAATTGTTTCGACCATGCTTCCCAATTAGCATGCCCTCTGC TCAGTTCTGAGCTCTATTGAAACGTCACGATGATGAAATTTACTTGTGAAGTAGCTTCAATTCC**CAACTGGGTCACAATCTTTG**C
CAAATATTCCTGCATTTGAGAAACAATTTCTTCATTCAA**ACGCGGCCGCT**

Sequenz von *P. pentosaceus* (Klon PPE7) (527 bp)

AGCGGCCGCGCAATTCGCCCTTAGCGGCCGCGCTGCGACGGGTTCTGCAGTGAATCTCTCACATTGGGTGGCTCATACCACCAGCCCTGCAATTGCTAATCACGTGAT**GGGAACGGTTTTAGTTTTATACG**GAGTTTCAGTAGCTTTTTTGACCATGCTTTTATCGCGTCATTTGGATTGGGCTCGTTTTGCCCCGCAACATTTTATTTGTACCGTTAGTTATCTCGTCCAATGGTTCACCCCTTTTGGAGTGA TACTTTAAAAATCAGCCAGTTGCAAGCTAATTTTCAACATCCTTGGCAGCTTTTAACTTCTGTTATTCTGGATATATTGGTTTAT TGGGCGTGGCTGTAGCTGTTTCACTCTATCAACGGGCAAAATTTGATTATGCATCCCAACGATGATCTTTCCTACATTTCTACGTTTT AGATATCTTCACGGTTTAGCTCAGTTTCAAAATGGGCTAGTTATGTCCACCA**CTTATCATCACCGCTCTTAG**CTGCTTTGCTAA CCGCGGCCGCT

Sequenz von *P. damnosus* (Klon PDA11) (712 bp)

AGCGGCCGCCGCAACAGGCCACCCATTAGCGATTTTAGCAACGGGCGCTTATGGGTATTCAATGGCTTCAAATTTATAATCGCAAT CCAAGACCAGCAGTGGTATTTGTGCGAAAATGGGCA**GTCTAACTGGTGGTTAAACG**GGAAAGTTACGAGGATTTAGTTTCGTCTGGA TCAAGATTTTATTTAGATACTTGAATGCCATATAATGTAAGAAGAGAAAAATGTTTTAAAGTTGGCTTAATTAACAAAACCTTAAAG TAGAAAAGCAACGAAATTTGAAGGTAGGCTCAAGATATGGCAAAATTAGATGCACGCGAAATTTGATTTTATTAGTAATTTCTA AAAAGAAAACAGCAGTTAAAGTATATTTGAAAGGTGATTTAGCCAACTTGATTTCTCTGCTAGTATTGAGAAATTTGTAGAAAACA

AAAGCTGGAACCATTTTTGGTGATTGGGCAGATGTTAAGCCATTTCTTGAGGCCAAACAAGGCCGTGATTGATGATTACGTGGTTGA
AAACGATGGTCGCAATACCGCCATGCCATTTGGTGGATACTAAGAACGTGAATGCCCGCATTGGAACAGGTTGGCATCATTTCGTGATC
AGGTGGTCATTGGCGATAATGCCGTTATATGATGGGTGCTTTAATTAACATTGGTGTGAAATTGGCGAAGATAACAATGATTGAT
ATGGCGGTTGTCATGGCGGCCGC

Sequenz von *P. inopinatus* (Klon PIN8) (668 bp)

GGCGCCGCTATCTACAAAATACCGATAGCTATCCTTACAATGTGCATCGGCTAGATCAACAAACAAGCGGTGCTATTCTGGTAGT
TAAGAACCCTGTTTAAATTCCTATCTATAATCGTTTTATTAAAACAAAGGTTGTGCATCGAACCTATCTGCCCCTGTACAAGGTA
AATTTGACGACGACACGGCATTATTTCACTGCCTATTGGTGAAACCTTGGCTGACAAGCGCAAACGTGGTGAACGGCACACAG
GCCGCATGGCTGTGACAGAAATTAAGGTTCTCAAAGAACTGACCATCAGTCGTTAGTAGAAGTTCAATTACAACCCGGCGCAC
CCACCAAATTCGTGTGCACTTGCGAGCTTAGGACACCCAATATTGGCGATCCGTTGTATAATCCTAAGTATCACTCTGGTGAAC
GATTGGCTTTACTCTTTGAAAATCGAATTTCCACTTCTTTTTCAAACGAACTAAATGCGTAACCGCTCCGATTCTGTATTAT
TTCCAGTTTGAAAATAGTTTTATAGAAAGAAGATTCTGACTTTGAAAATAACAAAACCTTACATTTACTGACGCACCAACCGATC
CATTCCGCATTTTAAAACCAAGCCTTATCTGCAGACGTTATTCACACTTTATTAGAGCGGCCGC

Sequenz von *L. hilgardii* (Klon LBH9) (815 bp)

AGCGGCCGCTCACCGTCGAAGTATTTGTTTCGGTATTCTTTTCATTTAAGTCGTCCCCTTCTTGGTAATGTGCTTGTAAATTGAATA
TATGTTTATGGTAAACCTAATCAGATGATCGTGTACCTGGATATGGGATGGACTGGGATCTTTTTTGGGACATGGTTAAATGA
CCGAACCTTAAAAGGATATGGGGAGAAAAGTTCATGCTTTACTAAAAATAGTTGGATTATAGCCTTGAAATAAGTTATTATAATA
GATATAAACGAATATATGTAACAAACACAATAATTATTCGCATTTAGGAGGATGAATTCGATGCATTGGCTGGCAGATTTTCTC
GCCGCAATTGGTGTGGTGTAAACGGCATTCTCAGGGAATATGGCGATGACTTTGGGATTTGCGGTTTTTCCCAACATTTTC
GTTTGTTTTTGCTTCAGCAGTTAACGGAGCGTTCGGCTCTGTGCGACCCATTTCTGTTCAAGCGGAGTCTTTGGCATTACGGGAA
ATTTGGGTGAGACAACCCGTGAACGTACCTCGATTATCTTTGGCGGATCATTGATATATGGCGGTTATTGGGGTAAACCGGTACCTTA
ACAAAATCGTGGACGTACTTGGGAACAGTATTATGGCTGGGATGATGGCAGGTGTGGTATCATGTTGGCTAAGATCGCTGTTAA
TATGGCTCGAAAGAACGGATCGCTGGATTGTCTGTCATTGGCATTGGCATTTTGACTTATTTGTTCACTAAAGATTGGTCTGGA
CAATTGCCCTCTCGGTGATTGGGTCAAGTTTAGCGGCCGCT

Sequenz von *Pediococcus acidilactici* (Klon PAC2) (914 bp)

AGCGGCCGCGTATGATGGACAGACTCCCTGGGACCGGACGGCATTGCAACACGAGCTAAGAAGAAAGGTCGACCGGTTATACTTGG
TGATTCGCCATAATGACCAGTTGATGGGCTTTATTTGGGCTTCATTTAACGACCGGGCGAAGAATGCCACATTACCAACGTGGCC
ATTTCCCGAATACAAAATCAAGGGATTGGTTCGTTTTTAAATGAAGCAATTTGCGGAAGGCCAGTTTATTGAGTATAAGAA
GGTTACCTTAGAGGTGCGGAAGAGTAATATTAATGCCAGCGTTATATTTGAAGATTGGTTTTGAAAACGTGCGTTTTGAAAAGG
GCTATTACTTTGGTGACCATGAGGACGCCATCGATATGCAACTAGATTTATCGAAATGGCGGGGAGGATATCGTGAACAAGATAG
TTTAAATATTAGCAATCGAATCCAGCTGCGATGAACTAGCGTAGCGGTTATTTAAAATGGTGACACTATTTTATCAACATCAATTG
CCACCAAATGACAGTCACCAACGGTTTTGGCGGGGTGGTTCAGAAGTGGCTAGCAGACACCACATTTGAACAAATCACCCGTGTC
ATTGACCAAGCAATGAAACAGCACAAAGTCCAGCAACGGCACTAAGTGCAGTGGCGGTTACTTACGGACCTGGACTAGTGGGTGC
CCTCTTAGTAGGGGTTTTCTGCGGCGAAGGCCTTTGCGTTTTGCAAATCATTTGCCATTGATTCGGGTTAACCATATGATGGGACATA
TCTACGACGCTCGTTTCGTCAAACCAATTAATTTCCCTGCTTTAGCGTTGCTAGTTTCCGGAGGACATACCGAACAGTATATATG
GCAGCGGAAAATGAATTTAAGATTATTGGCGAAACACGTGACGACGCGGCCGCT

Teilsequenz von *L. mesenteroides* (Klon LEU30B) (1834 bp)

AGCGGCCGCAAACTGATACAGAGTTCTTAGCGATCTCTGGTGTGGGTGAAAAGAAGTTTGAATTTATCATAATGATTTTGCAAAG
GTTATTAATGATTTTATTGTAGTTTAAATCATAAACGATTTGACAAATATTCATAATATCTTAAGGTATTATTAGGATATTTAAAT
CGTTGAAGCGAAGAGTAGATAACGAGCGGAAATTAAGCGAGTCAGGATAGTGAAGCTGACATGAAGCAGTTTATTGAAGATGAA
CGTGGATGATATCGTGAGATTTAAGTTGTTAAGTTTCGCGGTCGGTTAGCGCCGTTACAGTATGAGAGCATGATTATGCTAAATC
TGGGTGGTACCACGTTTTTTACGTCCCTGTTAATCTGTATGATTAACAGGGATTTTTTGTACTTCTTACGATTTTTATAACCTACT
AGAAAGCCATTAATAAGATGACCGAGGAACTGAAAATGACAAACAATCATTTAGTGTACAAACAGATTTTGGATTACAGGATGGT
GCGGTAAGCTCCATGAGAGGTGTGCTTACAATGTTGCCGATAACATTTGCTGTAGTATTAAACATGGTATCACGCCATTTAA
TATCTTTGAAGGTCGTTTTCGCTTGTTCAACTTTTACTATTGGCAACCGGGCACAGTTTTTGTATCTGTTGTCGACCCCTGGGG
TTGGCTCAAAACGTTTGTGAGTAATTTGCCAAGACGACAGCTGGCCACTATATTGTGACACCAGATAACGGCAGTTTATCGCATCTA
TTATCTAATGATTTAATCAAAAGTGTACGTGTGATTGATGAAACAACACAACGCCCTTCCCGTTTCCAGAAAATCATCAACATTTCA
TGGCGGTGATATTTATGCTTATAATGGGGCTAAATTAGCTAGTGGACAGTAGTATTTGAAGACTACACA...GTGGTCATGGGTC
TTAGCTGATGGTGTGTTTGGACTATTACTTGGTTTGGTAAAGATTTCTTGGACCTCGAGGGCGGGGATCTTTCAACAAAAAGTT
AGTTCAAGTTTAAAGTTTGGCAAATAATTGCTAACGTTATTGCTAGTTGATTTGTTGCGCCAAATCGGCGATATATTAATATACAAAC
AGCCAGCTAGTAAGGTATTTCTTACAGGGCGCAGCGGCAACAAATTTGTTAATTTTTGCTGTGCTATTTATGGCTTATTTTACTA
GTGGCTATGTCAAGTCACGTCTAAGAAGAGCTCATTGCGTAGTGAATAAGTAGCCACGGGTTACGTACATAGGGGAAAACATGG
TAGAACCATTTATGATTTCAACATGTGACATTTAAATATCACGCGCAATCTGAACCGACGTTACATGATGTGAGTTTTCAAAAT
TATCCTGGTGAAGAAAGTTTAAATAGCCGGTGCATCTGGTTCGGGTAAAACAACATTTACTGCGTTTACTGAATGGTTAAATCCGCA
AGCCTATCAAGGGGATATTCTGGTGAACATGACAAATTAATGGTAAAAGATATCCATAATCAGTCGTTGTTGACCTATCTTTGCAAG
CTGGTACTGTTCTTACAGGATTTCTGATGCGCAATTTGTTGGGATGACGGTCGCCGAAAGATATAGCTTTTTCTTTGAAAATGATAAT
CAGCCGATAAAAATGTCAGAGAAAAGTTCGCTAAATGGGCAATCGATTTGGGTTAGGAAAACGTTTACGTTGGCACCGCAATC
ATTGCTGGTGGCAAAAACAACGACTGCTATGCGAGGTGTTTTGGTTGATGAAGGGGATCTATTGTTATTTGACGAAACCATTTGG
CTAGTCTTATCCAGCTGCTGGTGGCGGCCGC