

Wandlungen innerhalb *Lactobacillus*- und *Bifidobacterium*-Species

WALHEIDE MÜLLER-BEUTHOW, F.-K. GRÜTTE und H. HAENEL

Bei Laborratten mit einer eindeutig bifidobacteriumfreien Intestinalflora kam es nach Verabreichung lactosereichen Futters innerhalb von 3 Tagen zur Ausbildung einer dominierenden *Lactobacillus plantarum*-Flora. Von diesem Zeitpunkt an ließ sich erstmalig *Bifidobacterium* nachweisen, zunächst lediglich als *B. adolescentis* und *B. pseudolongum*, am 5.—10. Tag auch als *B. bifidum*, das schließlich gemeinsam mit *B. infantis* dominierte. Bei in vitro-Untersuchungen konnten durch systematische Modifizierung der Nährmedien erst nach längerer Kultivierung Übergänge zwischen für Säuglingsfaeces typischen *Bifidobacterium*-Species und Species, die in Erwachsenenfaeces anzutreffen sind, beobachtet werden.

Seit knapp 30 Jahren [2] ist bekannt, daß die *Bifidobacterium*-Flora im Enddarm des gestillten menschlichen Säuglings mit der des nichtgestillten Säuglings, des Kleinkindes und des Erwachsenen nicht identisch ist: Nur der gestillte Säugling beherbergt im sauren Milieu seines Dickdarms den sogenannten Typ DIV, der nachfolgend als Species *Bifidobacterium infantis* mit mehreren Subspecies bezeichnet wurde [7, 9]. Über seine Herkunft und seinen Verbleib nach dem Abstillen gibt es bis heute nur Rätselfragen. Er findet sich in keiner Biota des menschlichen oder tierischen Körpers.

Andererseits besteht zumindest anhand biochemischer Merkmale nach der Literatur und nach langjährigen eigenen Untersuchungen große Unsicherheit bezüglich einer stabilen Einordnung von *Bifidobacterium*-Stämmen in die derzeitige geltende Systematik der *Bifidobacterium*-Species und -Subspecies, von denen bisher ca. 50 definiert wurden [4, 6, 7, 9, 10]. Die Hinzuziehung weiterer phänotypischer und genotypischer taxonomischer Merkmale führte zu Widersprüchen hinsichtlich der Berechtigung der Existenz zahlreicher *Bifidobacterium*-Species. Insbesondere aus DNA-Hybridisations-Studien wurde die Forderung abgeleitet, verschiedene Species-Gruppen aufgrund ungenügender genotypischer Abweichungen zu jeweils einer Species zu verschmelzen, so daß für die *Bifidobacterium*-Species der Stuhlflora nur sechs von ca. fünfzig Species übrig bleiben würden [4, 5]. Außer Zweifel steht inzwischen auch, daß Bakterien-Species relativ leicht in ihren biochemischen Aktivitäten, z. B. durch Induktion und Suppression von Enzym-Aktivitäten in Abhängigkeit von Kulturbedingungen wie pH und Substratangebot [5] und in ihrem Genotypus verändert werden können [8, 11]. Letzteres kann durch Strahlen- bzw. Chemikalien-Mutation, durch Phagen- oder Plasmidwirkung oder durch genetische Austauschmechanismen bewirkt werden.

Die derzeitigen Unsicherheiten in der Bewertung taxonomischer Merkmale bergen schließlich auch die Gefahr in sich, daß eine Divergenz in phänotypischen taxonomischen Merkmalen die Existenz einer genotypischen Identität scheinbar verschiedener Species kaschieren kann. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob eine Wandlung zwischen bisher als Species definierten Stämmen infolge Änderung der Lebensbedingungen möglich ist.

Material und Methoden

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden an Wistarratten, Stamm Schönwalde (Bln: WIST), die mit standardisiertem Haltungsfutter bzw. mit agarverfestigtem Versuchsfutter auf der Basis lactosehaltiger Milchnahrungen für Säuglinge ernährt wurden, vorgenommen.

Für die in vitro-Versuche wurden *Lactobacillus*-, *Bifidobacterium*- und *E. coli*-Stämme aus der eigenen Stammsammlung eingesetzt. Sie waren aus Säuglings- und Rattenfaeces isoliert und über zahlreiche Passagen reingezüchtet worden. Die Systematisierung erfolgte auf Grund der Vergärungsspektren gegenüber 12 Kohlenhydraten nach einer früher veröffentlichten Methodik [3]. Die Stämme wurden in ein halbflüssiges modifiziertes Egg-Yolk-Medium mit dem pH-Wert 7,5 in Röhrchen eingepflegt. Zucker-Limitierung erfolgte durch Zusatz von 0,5 mmol Glucose zum zuckerfreien Medium. Ausreichende Zuckerverfügbarkeit entsprach einem Zusatz von 35 mmol Glucose. Die Inkubationszeit betrug 48 h bei 37 °C. Die Überimpfungen wurden 3 mal wöchentlich wiederholt. Mit Hilfe der Uhrglasmethode wurden die Ausstriche gleichzeitig aerob und anaerob bebrütet. Nach Kolonie- und Keimmorphologie, Vergärungsleistung und Sauerstoff-Toleranz auffällige Kolonien wurden überimpft und nach dem Vergärungsschema differenziert.

Ergebnisse

In tierexperimentellen Untersuchungen ließ sich nachweisen (Abb. 1), daß in den Faeces von Ratten, die unter lactosefreiem Zuchtfutter nie *Bifidobacterium* beherbergten, nach 3tägiger Fütterung eines lactosehaltigen Futters *Bifidobacterium* erstmalig identifizierbar wurde. Das waren zunächst *B. adolescentis* bzw. *B. pseudolongum*, nach weiteren 5—10 Tagen auch *B. bifidum* und nach insgesamt ca. 20 Tagen schließlich *B. infantis*. Mit dem erstmaligen Auftreten von *B. pseudolongum* ging ein deutlicher Anstieg der Species *Lactobacillus plantarum* einher. Dem anschließend erstmaligen Erscheinen von *B. bifidum* ging ein drastischer Abfall von *L. plantarum* und *B. pseudolongum* voraus. In einem Parallelversuch ließ sich dieses Prinzip mit dem Paar *L. acidophilus* und *B. infantis* bestätigen. Dabei erreichte *B. infantis* anschließend eine derartig stabile dominierende Flora, wie sie nur vom gestillten Säugling bekannt ist. Nach diesen Ergebnissen mußten nicht nur zwischen *Bifidobacterium*-Species, sondern auch zwischen den Genera *Lactobacillus* und *Bifidobacterium* Wechselbeziehungen angenommen werden.

Durch in vitro-Untersuchungen an einer Reihe von *Lactobacillus*- und *Bifidobacterium*-Species wurden die Aussagen der in vivo-Versuche erhärtet. Glucose-Begrenzung ohne und mit simultanem *E. coli*-Wachstum bzw. ausreichendes Glucose-Angebot bewirkte bei diesen Species im Zeitraum von 3—7 Wochen eine Wandlung in Stämme, die anderen Species oder sogar Genera zuzuordnen waren. In Abb. 2 sind die Hauptaussagen dieser Ergebnisse zusammengefaßt. Dabei ist der für die verschiedenen Species typische pH, der sich spontan

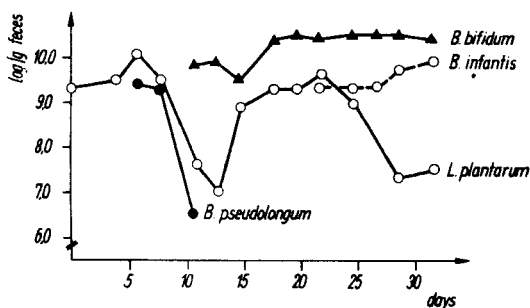


Fig. 1. Development of Bifidobacterium and Lactobacillus species in the feces of rats fed lactose containing food

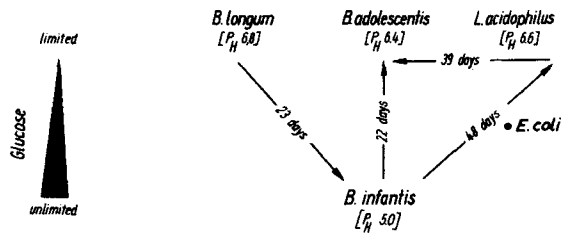


Fig. 2.
Species changes in dependence on glucose availability

und sehr stabil nach ca. 1 Woche einstellte, vermerkt. Veränderungen der Lebensbedingungen durch Verschiebung des Redoxpotentials infolge *E. coli*-Wachstum oder Zusatz von Thioglykolsäure bewirkte, gemessen an den Veränderungen der Zuckervergärungsleistungen bzw. des Verhaltens gegenüber Luftsauerstoff, weitere Wandlungen. So entstand aus *B. bifidum* ein *B. longum*, aus *B. infantis* ein *B. dentium* und aus *L. plantarum* ein *B. dentium*. Die Veränderungen im Kohlenhydrat-Vergärungsschema waren z. T. erheblich. So führte der Übergang von *B. infantis liberorum* in *B. dentium* zur Aktivierung von Enzym-Sätzen für die Verstoffwechslung von 6 weiteren Zuckern.

Diskussion und Schlußfolgerungen

Die Ergebnisse unterstreichen die derzeitige Skepsis gegenüber einer sicheren taxonomischen Bewertung von Bakterium-Genera und -Species. *Lactobacillus* und *Bifidobacterium* gehörten bis vor kurzem noch zum gleichen Genus. Aufgrund nur eines, allerdings nicht unwichtigen taxonomischen Merkmals, der (16 S-ribosomalen) Ribonukleinsäure-Struktur der Bakterien, wurde in der 8. Auflage von BERGEY'S Manual [1] eine Differenzierung vorgenommen. Wie berechtigt und stabil sie ist, ist unsicher. Die Ergebnisse bedürfen der Bestätigung durch Einbeziehung moderner taxonomischer Merkmale. Nach den vorliegenden Ergebnissen erscheint denkbar, daß die Erstbesiedlung lactosegefütterter Ratten mit *Bifidobacterium* durch Wandlung von *Lactobacillus* erfolgt und daß der als *B. infantis* bezeichnete Organismus in seinem charakteristischen Stoffwechsel-Verhalten nicht zu den das zunächst sterile Mekonium des Neugeborenen besiedelnden Keimen gehört. Er könnte aufgrund des ständigen Glucose- bzw. Lactose-Angebots und der pH-Bedingungen um pH 5 aus *Lactobacillus*-Species und/oder anderen *Bifidobacterium*-Species hervorgehen und infolge drastischer Veränderung seiner Lebensbedingungen beim Abstillen des Säuglings (Glucose-Limitierung, pH-Anstieg) einer erneuten Wandlung unterliegen. Entsprechende Untersuchungen an neugeborenen Säuglingen sind vorbereitet.

Summary

W. MÜLLER-BEUTHOW, F.-K. GRÜTTE and H. HAENEL: Changes within *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species

Laboratory rats with a gut flora unambiguous free from *Bifidobacterium* revealed three days after an application of a lactose-rich food a dominating *Lactobacillus plantarum* flora. Up from this date, *Bifidobacterium* could be detected for the first time. At the beginning, there was to be observed merely *B. adolescentis* and *B. pseudolongum*, at the 5th to the 10th day *B. bifidum* supervened. Finally this species together with *B. infantis*

was dominating. With in vitro experiments, by a systematic modifying of the medium changes from *Bifidobacterium* species typical to faeces from infants to such species only to meet in faeces from adults could be observed only after a long time of cultivation.

Резюме

Вальхайде Мюллер-Бойто, Ф.-К. Грютте и Х. Хенель: Превращения внутри видов лактобацилл и бифидобактерий

У лабораторных крыс с однозначно свободной от бифидобактерий кишечной флорой после кормления богатого лактозой корма наблюдалось образование доминирующей флоры *Lactobacillus plantarum* в течение трех дней. Начиная с этого срока впервые обнаруживалась *Bifidobacterium*, сначала в виде *B. adolescentis* и *B. pseudolongum*, с 5—10 дня и в виде *B. bifidum*, которая в конечном счете вместе с *B. infantis* доминировала.

При исследованиях in vitro только путем систематической модификации питательных сред после длительного культивирования наблюдались переходы между типичными для кала грудного ребенка видами бифидобактерий и видами, встречающимися в стуле взрослых.

Literatur

- [1] BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology 8th Edition. Williams and Wilkins Co., Baltimore 1974.
- [2] DEHNERT, J., Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **169**, 66—72 (1957).
- [3] HAENEL, H., W. MÜLLER-BEUTHOW und F.-K. GRÜTTE, Zbl. Bakt., I. Orig. **215**, 333—347 (1970).
- [4] LAUER, E., und O. KANDLER, Appl. Microbiol. **4**, 42—64 (1983).
- [5] LONDON, J., Ann. Rev. Microbiol. **30**, 279—301 (1976).
- [6] MITSUOKA, T., Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **210**, 52—64 (1969).
- [7] MITSUOKA, T., und C. KANEUCHI, Am. J. Clin. Nutrit. **30**, 1799—1810 (1977).
- [8] MIYAMOTO, T., N. S. REDDY und T. NAKAE, Agric. Biol. Chem. **47**, 2755—2759 (1983).
- [9] REUTER, G., Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **191**, 486—493 (1963).
- [10] SCARDOVI, V., und F. CROCIANI, Int. J. System. Bact. **24**, 6—20 (1974).
- [11] SMITH, H. O., Naturwiss. Rdsch. **36**, 47—51 (1983).

Dr. sc. F.-K. GRÜTTE, Zentralinstitut für Ernährung, Arthur-Scheunert-Allee 114—116, Bergholz-Rehbrücke, DDR-1505

Diskussion

LENZNER (Tartu, UdSSR): Sind Sie sicher, daß Kolonien aus einer Zelle einer Species vorlagen, also keine Selektion, sondern wirklich eine Wandlung erfolgt ist? Gab es erkennbare Proportionen zwischen den sich wandelnden Species? Welche taxonomischen Kriterien halten Sie für die Species-Differenzierung für am besten geeignet?

MÜLLER-BEUTHOW (Rehbrücke, DDR): Die Stämme wurden über Selektiv- und Blutnährboden bis zu 15 mal ausgestrichen, und es wurden Einzelkolonien entnommen. Wir haben bei den Wandlungsversuchen parallel bis zu 7 verschiedene Zucker-Konzentrationen in einem sonst sehr anspruchsvollen Medium eingesetzt, das alles enthält, was sowohl für *Lactobacillus*- als auch für *Bifidobacterium*-Wachstum erforderlich ist, also kein Selektivnährboden ist. In der langen Zeit der Bearbeitung von jeweils 3—5 Wochen mit mehrfachen Überimpfungen wäre für Nebenkeime als mögliche Ursache einer Selektierung genügend Gelegenheit zum Aufkeimen gewesen. Die Wandlung selbst lief nicht schlagartig ab. Über eine gewisse Zeit waren beide Stämme, der originäre und der gewandelte, nebeneinander nachweisbar. Welches die am besten geeigneten taxonomischen Kriterien sind, ist schwer zu sagen und auch seit einiger Zeit wieder sehr umstritten. Wir haben die phänotypischen Kriterien eingesetzt, die der international üblichen taxonomischen Einordnung der Species und Genera zugrundeliegen.

BERNHARDT (Greifswald, DDR): Ich stimme Ihnen völlig zu, daß bei der taxonomischen Einordnung von aus dem Darm isolierten Mikroorganismen Schwierigkeiten bestehen. Ich kann das besonders für die aus dem Magen isolierten Lactobacillen bestätigen, die z. T. nicht in die bestehenden Schemata passen. Wir sind z. Z. auch wohl auf der ganzen Welt nicht in der Lage, die GRAM-positiven Stäbchen exakt einzuordnen. Die Species *Eubacterium limosum* z. B. wurde zunächst immer als *Bifidobacterium* eingeordnet. Nach dem Manual von MOORE ist auch die Species *Bifidobacterium adolescentis* nicht exakt von den in der Nähe angeordneten Species zu differenzieren. Wir sind heute einfach nicht in der Lage eine saubere taxonomische Bestimmung durchzuführen. Man muß nach vielen Merkmalen suchen, um die bestmögliche Einordnung zu finden. Eine Wandlung von *Bifidobacterium* in *Lactobacillus* halte ich nicht für möglich, weil nach dem G/C-Quotienten eine deutliche Unterscheidung zwischen beiden Genera möglich ist. Man müßte deshalb wohl eine Klonierung durchführen und eine G/C-Bestimmung machen, um sicher zu sein, ob eine Wandlung stattgefunden hat.

GRÜTTE (Rehbrücke, DDR): Auch mit dem G/C-Quotienten zeigt sich eine starke Streuung für die Species beider Genera. Sie liegen für *Lactobacillus* etwa zwischen 30 und 55% und für *Bifidobacterium* zwischen 60 und 70%. Der Grenzbereich zwischen beiden Genera ist also deutlich geringer (5%) als der Streubereich innerhalb *Lactobacillus* (25%). Trotzdem sei noch einmal unterstrichen: Was wir bisher mit diesen Ergebnissen sagen wollen, ist vor allem, daß die nach phänotypischen Merkmalen in der Literatur vorgenommene Differenzierung der Species von *Lactobacillus* und *Bifidobacterium* nach gerade diesen Kriterien anzuzweifeln ist, daß u. U. zahlreiche Species statt dessen jeweils zu nur wenigen Species, die dann genotypisch differenzierbar sind, zusammengefaßt werden müssen, und daß u. U. auch Species der beiden genannten Genera gemeinsamen Species angehören, die sich lediglich in Abhängigkeit von den Lebensbedingungen in einzelnen phänotypischen Merkmalen verändern, z. B. nach der Zuckervergärung, nach der Fähigkeit, L(+)- oder D(-)-Lactat zu bilden, oder nach ihrer Empfindlichkeit gegenüber der Präsenz von Sauerstoff.

MÜLLER-BEUTHOW: Gerade der Übergang vom Wachstum unter aeroben zum Wachstum unter anaeroben Bedingungen scheint uns ein sehr deutlicher Beweis der Wandlung zu sein. Wir sind auch in der Lage, Präparate zu zeigen, an denen der Übergang zweier Species ineinander auch morphologisch deutlich erkennbar ist.

HAENEL (Rehbrücke, DDR): Ich schlage vor, daß Vertreter der verschiedenen Arbeitsgruppen sich das im Labor von Frau MÜLLER-BEUTHOW einmal ansehen.