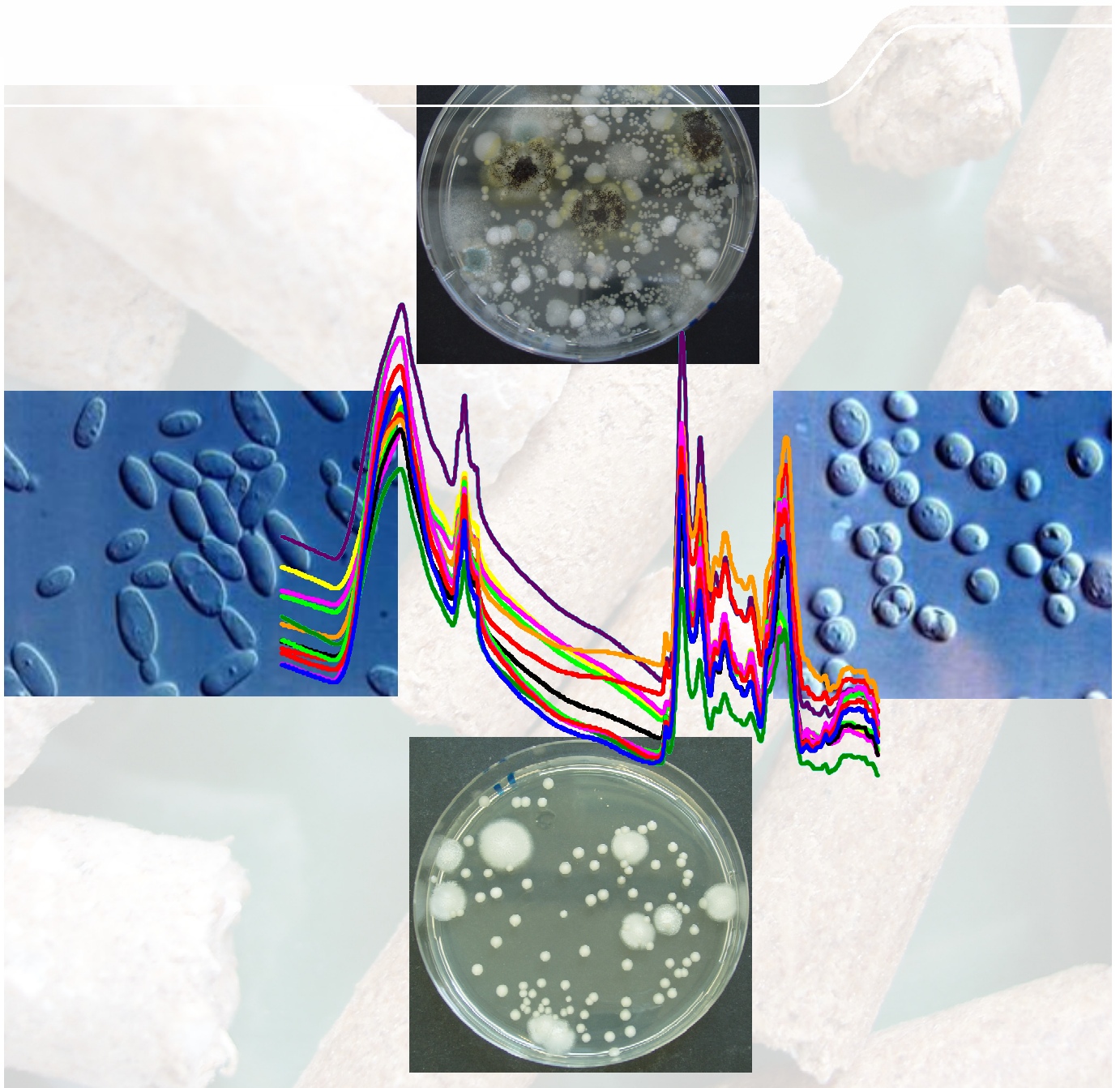


Hefendifferenzierung aus Futtermitteln

Schriftenreihe, Heft 31/2011



Differenzierung von probiotischen und ubiquitären Hefen aus Futtermitteln – Anwendung der Fourier-Transform-Infrarot (FT-IR)-Spektroskopie in der Futtermittelmikrobiologie

Dr. Nicole R. Büchl, Dr. Mareike Wenning, Prof. Dr. Siegfried Scherer
Dr. Henriette Mietke-Hofmann

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Problemstellung und Zielsetzung	6
1.2	Grundzüge der FT-IR-Spektroskopie	7
1.3	Einsatz künstlicher neuronaler Netze (KNN).....	9
1.4	Molekularbiologische Referenzmethoden	10
2	Methodik	12
2.1	Methoden zur Artidentifizierung und Stammdifferenzierung	12
2.1.1	FT-IR-Spektroskopie	12
2.1.2	Training der künstlichen neuronalen Netze.....	13
2.1.3	Anwendung des API 20C AUX Systems	14
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	14
2.2.1	Partielle Sequenzierung der 26S rDNS zur Artidentifizierung	14
2.2.2	Denaturierende HPLC zur Stammtypisierung	15
2.2.3	δ -PCR zur Stammdifferenzierung	15
3	Ergebnisse und Diskussion	16
3.1	Differenzierung von Hefearten der Gattungen <i>Issatchenkia</i> und <i>Pichia</i>	16
3.1.1	Identifizierung der Referenzstämme	16
3.1.2	Etablierung des künstlichen neuronalen Netzes	19
3.2	Differenzierung von probiotischen und ubiquitären <i>S. cerevisiae</i>	23
3.2.1	Stammtypisierung der Referenzisolate	23
3.2.2	Etablierung des künstlichen neuronalen Netzes	28
4	Zusammenfassung	31
	Literaturverzeichnis	32

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	FT-IR-Spektren der nah verwandten Hefearten <i>P. galeiformis</i> (schwarz) und <i>P. fermentans</i> (grün).....	7
Abbildung 2:	FT-IR-Spektren und deren zweite Ableitungen der nah verwandten Hefearten <i>P. galeiformis</i> (schwarz) und <i>P. fermentans</i> (grün).....	8
Abbildung 3:	Vereinfachte Darstellung des Funktionsprinzips eines künstlichen neuronalen Netzes	9
Abbildung 4:	Vollständig verbundenes dreischichtiges neuronales Netz, bestehend aus zwei Klassifizierungsebenen	10
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der ribosomalen Genstruktur von Hefen	11
Abbildung 6:	Arbeitsschritte der Probenaufbereitung und FT-IR-Messung.....	12
Abbildung 7:	Phylogenetischer Baum nah verwandter <i>Issatchenkia</i> - und <i>Pichia</i> -Arten basierend auf 26S rDNS Sequenzen	18
Abbildung 8:	Dendrogramm der Hierarchischen Clusteranalyse der FT-IR-Spektren von 25 <i>Issatchenkia</i> Stämmen offizieller Stammsammlungen.....	19
Abbildung 9:	Hierarchische Struktur des KNN zur Differenzierung nah verwandter <i>Issatchenkia</i> und <i>Pichia</i> Arten	21
Abbildung 10:	Hierarchische Clusteranalyse von drei ubiquitären und 25 probiotischen <i>S. cerevisiae</i> -Isolaten der Futtermittelzusatzstoffe CNCM I-1077, CNCM I-1079, NCYC Sc47, NCYC 1026 und MUCL 39885.....	24
Abbildung 11:	Ausschnitt der 2. Ableitung von Isolaten der probiotischen Stämme MUCL 39885 (orange) und CNCM I-1077 (schwarz)	24
Abbildung 12:	Ausschnitt der API-Teststreifen der NCYC-Stämme Sc47 und 1026 nach 48 h Bebrütung	25
Abbildung 13:	DHPLC Peakprofile von probiotischen und ubiquitären <i>S. cerevisiae</i> -Isolaten.....	27
Abbildung 14:	Fragmentmuster der δ -PCR-Analyse der fünf zugelassenen Probiotika (Bahn 1-10) und von neun ubiquitären <i>S. cerevisiae</i> -Isolaten (Bahn 11-19).....	28
Abbildung 15:	Hierarchische Struktur des KNN zur Differenzierung probiotischer und ubiquitärer <i>S. cerevisiae</i> -Stämme	29
Abbildung 16:	Ergebnisse der internen und externen Validierung der ersten Ebene des KNN zur Differenzierung zwischen ubiquitären und probiotischen <i>S. cerevisiae</i>	30
Abbildung 17:	Ergebnisse der externen Validierung der zweiten Ebene des KNN zur Differenzierung zwischen probiotischen <i>S. cerevisiae</i>	30

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Absorption von Zellbestandteilen in spezifischen Bereichen des FTIR-Spektrums.....	8
Tabelle 2:	Datensätze für das Training des KNN.....	13
Tabelle 3:	Übersicht der gewählten Parameter zur Datenvorbehandlung.....	14
Tabelle 4:	Stammübersicht der mittels 26S rDNS Sequenzierung identifizierten Stämme	16
Tabelle 5:	Stammübersicht zur Etablierung und Validierung des KNN	20
Tabelle 6:	Ergebnisse der internen Validierung des KNN.....	22
Tabelle 7:	Ergebnisse der externen Validierung des KNN.....	23
Tabelle 8:	Stammübersicht zur molekularbiologischen Stammtypisierung	26
Tabelle 9:	Stammübersicht zur Etablierung und Validierung des KNN	28

1 Einleitung

1.1 Problemstellung und Zielsetzung

Seit 2001 ist die Technik der Infrarot-Spektroskopie zur Differenzierung und Identifizierung von Mikroorganismen im Geschäftsbereich 6 der Staatlichen Betriebsgesellschaft für Umwelt und Landwirtschaft (BfUL) etabliert. Ein erstes Forschungsvorhaben seinerzeit stellte sich der Aufgabe, probiotische *Bacillus cereus*-Stämme in Futtermitteln voneinander sowie von vorhandenen Wildstämmen sicher zu trennen. Diese Fragestellung entspringt der Forderung der amtlichen Futtermittelkontrolle, bei der alle aeroben Sporenbildner als verderbanzeigende Mikroorganismen gewertet werden, probiotische Stämme allerdings von der Erfassung ausgeschlossen werden sollen. Der erfolgreiche Abschluss dieses Projektes mit der Erstellung einer robusten Datenbank von über 800 Stämmen verdeutlichte, dass die Infrarotspektroskopie prinzipiell in der Lage ist, Mikroorganismen auf Stammesebene voneinander zu trennen (SCHLEIF & MIETKE 2003, MIETKE et al. 2010). Gleiches gelang WENNING et al. (2011) bei der Differenzierung probiotischer Milchsäurebakterien sowie probiotischer *B. subtilis* und *B. licheniformis*-Stämme.

Die exakte Differenzierung von Hefen in Futtermitteln birgt die gleiche Problematik, weil alle Hefen prinzipielle Verderberreger sind. Als probiotisch gelten nach einer ersten Definition von FULLER (1989) lebende Mikroorganismen, die einem Futtermittel zugesetzt werden, um die natürliche Darmflora des Tieres positiv zu unterstützen. Als besonders förderlich ist der Einsatz von Hefen beschrieben, die durch einen hohen Vitamin B Gehalt das Wachstum gesundheitsfördernder Darmbakterien stimulieren (SIMON et al. 2001). Derzeit sind fünf *S. cerevisiae*-Stämme (CNCM I-1079, CNCM I-1077, NCYC 1026, NCYC Sc47, MUCL 39885) als probiotische Futtermittelzusätze zugelassen (European Commission on Health and Consumer Protection, 2007). Der Einsatz dieser probiotischen Futtermittelzusätze kann allerdings Probleme bei der Qualitätsbeurteilung von Futtermitteln verursachen, weil hierfür alleinig der quantitativ ermittelte Gehalt aller Hefen das entscheidende Kriterium zur Beurteilung des Futtermittels darstellt. Neben dieser beurteilungsbedingten Forderung nach Differenzierung zwischen probiotischen und ubiquitären *S. cerevisiae*, sollte nach den TECHNISCHEN RICHTLINIEN DER EFSA (2008) eine Differenzierung auf Stammebene auch erzielt werden, um Verträglichkeitsstudien am Tier bzw. Qualitätsstudien der Probiotika erfolgreich durchführen zu können. Darüber hinaus könnte die problematische Beurteilung von Produkten, die Verschleppungen verschiedener Probiotika beinhalten, bzw. die Beurteilung von nicht ausreichend deklarierten Produkten durch ein System zur Unterscheidung auf Stammebene erleichtert werden. Probiotische *S. cerevisiae* sind allerdings mit herkömmlichen biochemischen Methoden nicht voneinander zu trennen und können auch bisher nicht von ubiquitär im Futtermittel auftretenden *S. cerevisiae* unterschieden werden.

Im Fokus dieses Projektes stand daher die Etablierung eines zuverlässigen Systems zur Identifizierung von Hefen aus Futtermitteln, welches zugleich zur Differenzierung von probiotischen und ubiquitären *S. cerevisiae*-Stämmen genutzt werden kann. Eine bereits erfolgreich angewandte Methode zur Identifizierung von Mikroorganismen stellt die FT-IR-Spektroskopie dar, deren Einsatz bislang vorwiegend im klinischen Bereich (MAQUELIN et al. 2003, SANDT et al. 2003, TOUBAS et al. 2007) und Lebensmittelbereich (AMIEL et al. 2000, OBERREUTER et al. 2002, WENNING et al. 2002, WENNING et al. 2008) lag. Für den Einsatz in der Futtermittelmikrobiologie wurde eine für den Lebensmittelbereich existierende Referenzdatenbank zur Identifizierung von Hefen (KÜMMERLE et al. 1998) mit Stämmen aus Futtermitteln ergänzt und somit die FT-IR-Technologie für diesen Anwendungsbereich erschlossen.

Mit der Etablierung dieser Hefedatenbank im BfUL wurden zahlreiche Untersuchungen in Futtermitteln zur Erfassung der vorhandenen Hefeflora durchgeführt (MIETKE-HOFMANN 2008). Dabei wurde deutlich, dass die Datenbank prinzipiell sehr gut geeignet ist, besonders ascomycetale Hefen auf Genus- oder Speziesebene zu erfassen. Im Bereich der Gattungen *Pichia-Issatchenkia-Williopsis*, die sehr häufig zur epiphytären Flora von Pflanzen gehören, traten allerdings gehäuft Fehler bzw. unsichere Analyseergebnisse auf. Zudem spielt die häufig vertretene Hefeart *Issatchenkia orientalis* (anamorphe Form *Candida krusei*) eine besondere Rolle, weil sie sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin den opportunistisch pathogenen Hefen zugeordnet wird (ELAD et al. 1995; KANO et al. 2001; PFALLER et al. 2008; HAMAL & KOUKALOVÁ 2010; SEKER 2010; WAWRON et al. 2011). Eine eindeutige Identifizierung von *I. orientalis*-Stämmen sowie eine zuverlässige Differenzierung zu nah verwandten und damit phänotypisch ähnlichen Arten war somit erforderlich.

Um komplexe Klassifizierungsprobleme, die gerade bei nah verwandten Arten eine exakte Identifizierung häufig erschweren, zu lösen, wurde die FT-IR-Spektroskopie in Verbindung mit künstlichen neuronalen Netzen angewandt. Dieses erhöhte Klassifizierungspotenzial ermöglichte eine Differenzierung auf Stammebene zwischen probiotischen und ubiquitären *S. cerevisiae*.

1.2 Grundzüge der FT-IR-Spektroskopie

Erste Identifizierungen und Differenzierungen von Bakterien mit Hilfe von Fourier-transform Infrarot (FT-IR)-Spektroskopie konnten bereits in den 1950er-Jahren durchgeführt werden (GÜNZLER & HEISE 1994). Aufgrund der nicht ausgereiften Gerätetechnologie konnte sich die FT-IR Spektroskopie jedoch erst in den 1980er-Jahren etablieren und wird heute unter anderem in der routinemäßigen Identifizierung von Mikroorganismen im Lebensmittelbereich eingesetzt (AMIEL et al. 2000, OBERREUTER et al. 2002).

In der FT-IR-Spektroskopie wird der mittlere Infrarotbereich ($4.000 - 500 \text{ cm}^{-1}$) genutzt, um Atome innerhalb eines Molekülverbandes anzuregen und in Schwingung zu versetzen. Die Emission und Absorption von Photonen wird im Strahlengang des IR-Spektrometers gemessen und mit Hilfe der Fourier-Transformation in Spektren umgewandelt. Der typische Spektrenverlauf für Hefen ist in Abbildung 1 beispielhaft für die beiden nah verwandten Arten *Pichia galeiformis* und *Pichia fermentans* dargestellt.

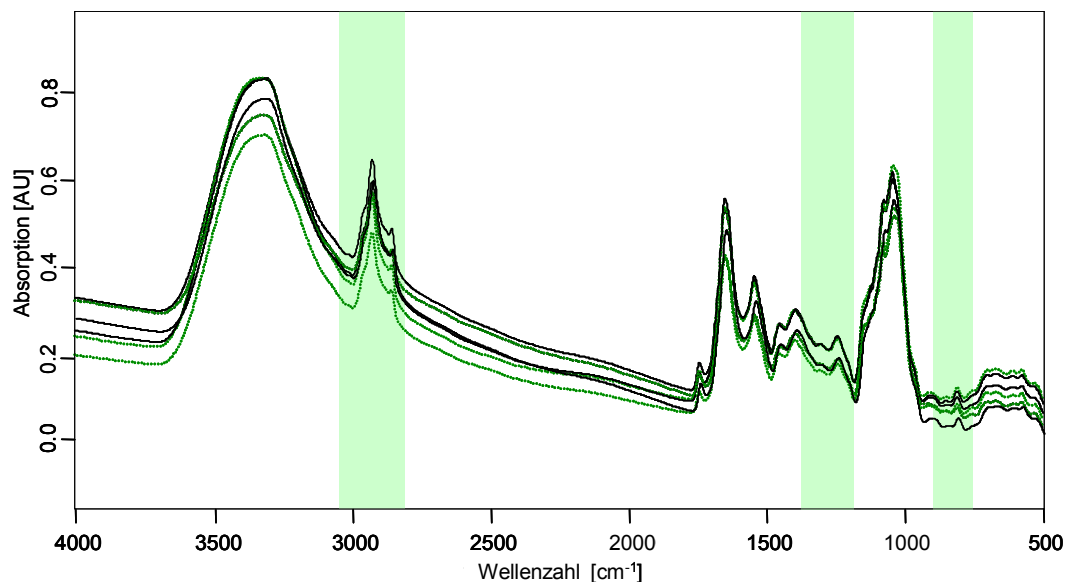


Abbildung 1: FT-IR-Spektren der nah verwandten Hefearten *P. galeiformis* (schwarz) und *P. fermentans* (grün)

Farbig hinterlegt sind Spektralbereiche, die für die Identifizierung von Hefen genutzt werden.

Die Energiezufuhr für die Anregung bestimmter Atome ist genau festgelegt, sodass die Absorption funktioneller Molekülgruppen spezifischen Wellenzahlen zugeordnet werden kann (NAUMANN et al. 1991). Vor diesem Hintergrund ist die Zuordnung bestimmter spektraler Bereiche zur Absorption unterschiedlicher Zellbestandteile möglich. HELM et al. (1991) deklarierten fünf spektrale Fenster, die in Tabelle 1 aufgelistet sind. Für die Identifizierung von Hefen sind besonders drei Spektralbereiche, in Abbildung 1 farbig hinterlegt, geeignet (KÜMMERLE et al. 1998). Diese Bereiche wurden als Konsensus ausgewählt, weil hier spektrale Informationen mit größtmöglichem Differenzierungspotenzial für eine größtmögliche Anzahl an Hefearten lokalisiert sind.

Tabelle 1: Absorption von Zellbestandteilen in spezifischen Bereichen des FTIR-Spektrums

absorbierende Verbindungen	spektraler Bereich
Fettsäuren	3.000 – 2.800 cm ⁻¹ 1.500 – 1.400 cm ⁻¹
Phospholipide	etwa 1.740 cm ⁻¹
Proteine, DNS/RNA	1.800 – 1.500 cm ⁻¹
Polysaccharide	1.200 - 900 cm ⁻¹

In den Spektren spiegelt sich somit die chemische Zusammensetzung der Zellen wider, die für unterschiedliche Organismen charakteristisch ist. Als Konsequenz dessen kann man FT-IR-Spektren von Mikroorganismen auch als Fingerabdruck bezeichnen, der jedoch durch den sehr komplexen mikrobiellen Zellaufbau von stark überlagernden Banden im FT-IR-Spektrum charakterisiert ist. Um dennoch Aussagen über die Identität des betreffenden Mikroorganismus treffen zu können, werden Ableitungen des Absorptionsspektrums berechnet, für Hefen die zweite Ableitung, und für einen Vergleich mit Spektren der Referenzdatenbank herangezogen (KÜMMERLE et al. 1998). In Abbildung 2 sind die zweiten Ableitungen der beiden Arten *P. galeiformis* und *P. fermentans* dargestellt. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt deutliche Unterschiede im Spektrenverlauf, welche für eine Differenzierung genutzt werden können.

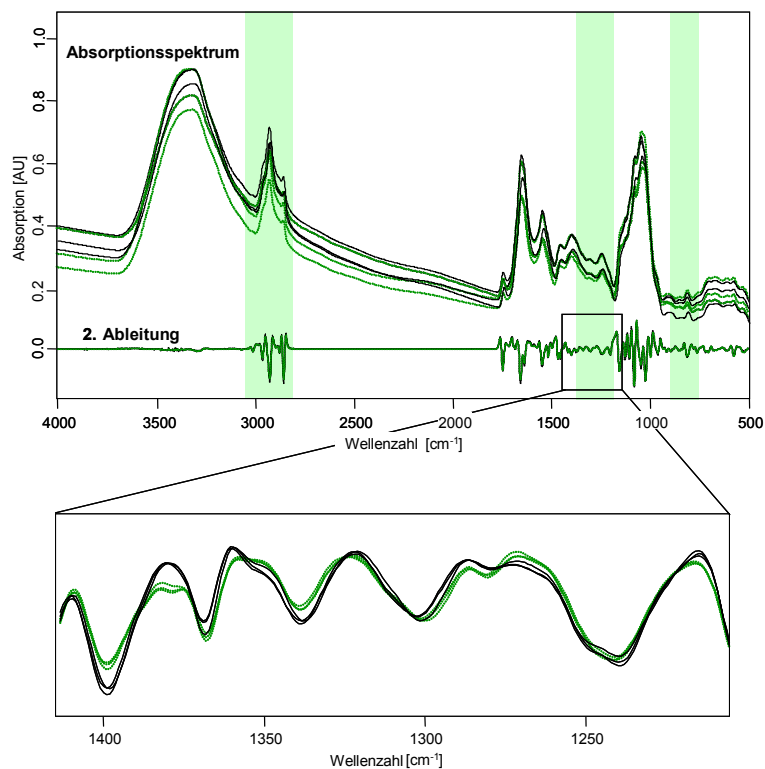


Abbildung 2: FT-IR-Spektren und deren zweite Ableitungen der nah verwandten Hefearten *P. galeiformis* (schwarz) und *P. fermentans* (grün)

Im vergrößerten Ausschnitt zwischen 1.400 cm⁻¹ und 1.200 cm⁻¹ ist der Abschnitt der zweiten Ableitungen hervorgehoben, der das größte Differenzierungspotenzial für diese beiden Arten enthält. (nach BÜCHL et al. 2008)

Unbekannte Spektren lassen sich mit Hilfe von Referenzdatenbanken mit bekannten vergleichen und über die Quantifizierung der spektralen Distanz können Aussagen über die Identität gemacht werden. Dieser direkte Vergleich setzt sowohl die Einhaltung der standardisierten Methodik in der Probenaufbereitung als auch die Wahl einer passenden Referenzdatenbank voraus. Eine entscheidende Rolle für die Qualität einer Identifizierung mittels FT-IR-Spektroskopie spielt die Zusammensetzung

der vorliegenden Datenbank und auch die korrekte Identifizierung der darin enthaltenen Referenzstämme. Um den steigenden Anforderungen gerecht werden zu können, müssen bestehende Referenzdatenbanken stets basierend auf neuen Erkenntnissen in der Taxonomie aktualisiert und mit neuen Stämmen erweitert werden. Dies ist insbesondere erforderlich, wenn Mikroorganismen identifiziert werden sollen, die nur in geringer Zahl in bereits bestehenden Datenbanken vertreten sind.

Einen großen Vorteil von FT-IR-Referenzdatenbanken zur Identifizierung von Mikroorganismen stellt zudem die große Variabilität der Anwendungsgebiete dar. Durch entsprechende Erweiterungen können bestehende Datenbanken für jeden gewünschten Bereich gezielt angepasst und somit nutzbar gemacht werden.

1.3 Einsatz künstlicher neuronaler Netze (KNN)

In den letzten Jahren wird FT-IR-Spektroskopie häufig in Verbindung mit selbstlernenden künstlichen neuronalen Netzen angewandt, um den steigenden Anforderungen nach immer genauer differenzierenden Methoden gerecht werden zu können (REBUFFO-SCHEER et al. 2007, BÜCHL et al. 2008, WENNING et al. 2010). Gerade für den Bereich der mikrobiologischen, medizinischen und biodiagnostischen Routineanalyse, in dem das Probenmaterial sehr komplex ist, eröffnet diese Kombination neue Möglichkeiten der Datenauswertung (SCHMITT & UDELHOVEN 2001). Weil es sich bei künstlichen neuronalen Netzen um eine mathematische Datenauswertung handelt, lassen sich sehr detaillierte Informationen aus den Spektren extrahieren.

Wie ihr biologisches Vorbild sind künstliche neuronale Netze aus virtuellen Zellen – den Neuronen – aufgebaut. Obgleich diese stark idealisiert werden, stehen auch sie miteinander in Verbindung und können ab Überschreitung eines gewissen Schwellenwertes ihren Aktivierungszustand ändern und so Informationen weiterleiten. Die Ausgabe beinhaltet in den meisten Fällen eine Identitätsfunktion, was der Zuordnung von unbekanntem Daten zu bekannten, vorgegebenen Klassen entspricht. Handelt es sich um die Identifizierung von Mikroorganismen, entsprechen die unbekanntem Daten gemessenen FT-IR-Spektren. Die vorgegebenen Klassen stellen das gewünschte Zuordnungsschema zu einer bestimmten Gruppe von Mikroorganismen dar (Abbildung 3).

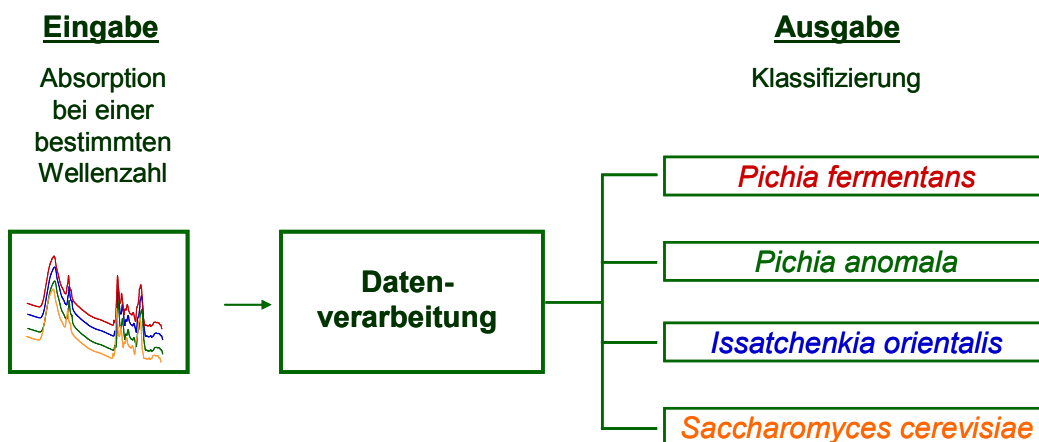


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des Funktionsprinzips eines künstlichen neuronalen Netzes
 Als Beispiele wurden vier häufig vorkommende Hefearten gewählt.

Um einen besseren Lernprozess zu ermöglichen, werden gerade bei komplexen Klassifizierungen Netze ohne Rückkopplung (*feedforward*) mit sogenannten *shortcut connections* eingesetzt, weil bei ihnen Ebenen übersprungen werden können (UDELHOVEN et al. 2000). Eine weitere Verbesserung wird durch vollständig verbundene (engl. *fully connected*) Netze erzielt, in denen jedes Neuron der zugrundeliegenden Schicht mit jedem Neuron der darauffolgenden Schicht verbunden ist. Feedforward-Netze stellen die Basis für sogenannte Backpropagation-Netze dar, die aus einer Eingabe-Schicht (engl. *input layer*), einer Ausgabe-Schicht (engl. *output layer*) und mindestens einer verborgenen Schicht (engl. *hidden layer*) bestehen (siehe Abbildung 4). Die verborgene Schicht wurde eingeführt, um die Leistungsfähigkeit des Netzes zu erhöhen. Die

Backpropagation gehört zu den Verfahren des überwachten Lernens. Der Lernprozess aller neuronalen Netze beinhaltet eine Selbstmodifikation basierend auf Versuch und Fehler.

Besonders für die Klassifizierung von Mikroorganismen bietet das überwachte Lernen den Vorteil, dass man dem Netz zu jeder Eingabe (gemessenes Spektrum) die korrekte Ausgabe (zugehörige Klasse) vorgeben kann. Zudem können Subnetze für einzelne Klassen von Mikroorganismen zu einem Gesamtnetz verbunden werden, welches dadurch eine hohe Flexibilität und ein noch größeres Klassifizierungspotential erhält (SCHMITT & UDELHOVEN 2001). Dieses wird in Abbildung 4 verdeutlicht, die den Aufbau eines vollständig verbundenen Backpropagation-Netzes, bestehend aus einem Toplevel-Netz (Ebene 1) und drei Sublevel-Netzen (Ebene 2), darstellt.

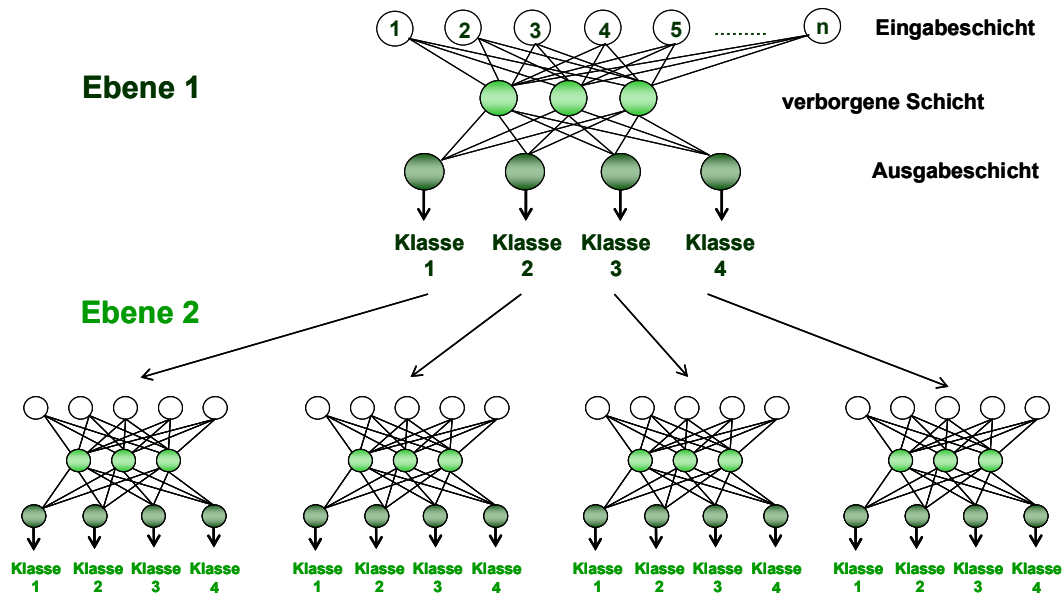


Abbildung 4: Vollständig verbundenes dreischichtiges neuronales Netz, bestehend aus zwei Klassifizierungsebenen

Die hohe Flexibilität, verbunden mit dem größeren Klassifizierungspotenzial, eignet sich sehr gut, um nah verwandte Gattungen, Arten und teilweise sogar Stämme der gleichen Art exakt voneinander zu differenzieren.

1.4 Molekularbiologische Referenzmethoden

Zur exakten Identifikation der Referenzstämmen, die für die Etablierung eines Systems zur Identifizierung und Differenzierung von Mikroorganismen entscheidend ist, stehen eine Vielzahl unterschiedlichster Methoden zur Verfügung. Für die Artidentifizierung von Hefen sind klassische Methoden, die physiologische, morphologische und biochemische Tests, basierend auf der Untersuchung von Enzymprofilen und Wachstumscharakteristika, umfassen, beschrieben. Als nachteilig erweisen sich jedoch der hohe Zeitaufwand, der für die Durchführung dieser Methoden benötigt wird, sowie die häufig schwer zu interpretierenden Ergebnisse. Aufgrund dessen sind diese traditionellen Techniken zur Artidentifizierung gerade von nah verwandten Arten mit großer phänotypischer Ähnlichkeit nur bedingt geeignet, eine Unterscheidung von Stämmen der gleichen Art ist mit Hilfe dieser Methoden in der Regel nicht möglich. Seit einigen Jahren werden daher vermehrt unterschiedliche molekularebiologische Methoden eingesetzt, die sich sowohl zur Artidentifizierung als auch zur Differenzierung auf Stammebene eignen. Angewandt werden Restriktionsenzymanalysen, wie beispielsweise die Analyse des RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) (ANDRADE et al. 2006, SCORZETTI et al. 2002, ESTEVE-ZARZOSO et al. 1999), aber auch auf PCR (*polymerase chain reaction*)-Analysen basierende Techniken wie PFGE (*pulsed field gel electrophoresis*) oder RAPD (*randomly amplified polymorphic DNS*) (DEAK et al. 2000, PRILLINGER et al. 1999). Bei allen Methoden werden abhängig von der Unterscheidungsebene (Gattung, Art oder Stamm) bestimmte Bereiche des ribosomalen Hefengenoms untersucht (Abbildung 5). Während sich zur Unterscheidung verschiedener Arten konservierte, für bestimmte ribosomale Gene kodierende Bereiche (in Abbildung 5 grün markierte Felder) eignen, müssen zur Differenzierung auf Stammebene nicht kodierende und daher

weniger konservierte Genomabschnitte, wie die internal transcribed (ITS) und die intergenic spacer (IGS) Region, untersucht werden. Diese Bereiche enthalten selbst bei Stämmen der gleichen Art Sequenzunterschiede.

Im Rahmen dieses Projektes wurde zur Überprüfung der Identität nah verwandter Arten der Gattungen *Issatchenkia* und *Pichia* die bekannteste molekularbiologische Methode zur Artidentifizierung angewandt – die Sequenzierung der variablen D1/D2 Dömane am 5'-Ende der 26S rDNS (KURTZMAN & ROBNETT 1998, KURTZMAN & ROBNETT 2003, FELL et al. 2000). In Abbildung 5 ist der entsprechende Bereich durch das verwendete Primerpaar NL-1 und NL-4 gekennzeichnet. Die Nukleotidsequenz des amplifizierten Genabschnittes kann mit Hilfe einer weltweit zugänglichen Datenbank von NCBI mit Referenzsequenzen verglichen werden und ermöglicht somit eine Identifizierung auf Artebene.

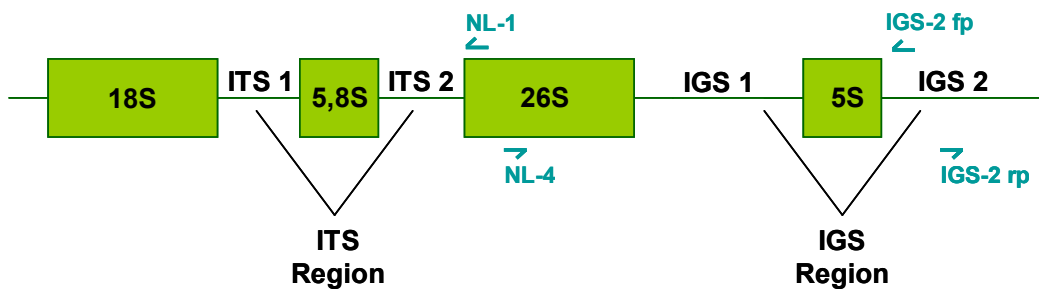


Abbildung 5: Schematische Darstellung der ribosomalen Genstruktur von Hefen

ITS, internal transcribed Region; IGS, intergenic spacer Region. NL-1 und NL-4 bzw. IGS-2 fp und IGS-2 rp kennzeichnen jeweils Primerbindungsstellen.

Zur Unterscheidung von probiotischen und ubiquitären *S. cerevisiae* in Futtermitteln wurde die in diesem Bereich bereits erfolgreich angewandte Amplifizierung von δ -Sequenzen eingesetzt (DELLANOS et al. 2006, LEGRAS & KARST 2003, LEUSCHNER et al. 2004). δ -Elemente sind kurze direkt wiederholte DNS Sequenzen, die eine Größe von etwa 300 bp besitzen und das TY1 Retrotransposon flankieren. Jedes *S. cerevisiae* Genom enthält ca. 100 Kopien dieser δ -Elemente mit einer statistischen Verteilung von einem Element je 150 kb. Die jeweils vorliegende Kopienzahl sowie deren Verteilung sind spezifisch für jeden einzelnen Stamm und führen in der PCR-Analyse mit δ -Primern zu unterschiedlichen Fragmentmustern, was eine Stammunterscheidung ermöglicht (NESS et al. 1993). Um ein möglichst zuverlässiges Stammtypisierungsergebnis zu erhalten, wurde denaturierende Hochaffinitätschromatographie (dHPLC) als zusätzliche Technik zur Differenzierung von *S. cerevisiae*-Stämmen etabliert. Diese Methodik wurde ursprünglich vorwiegend im medizinischen Bereich zur Detektion von Mutationen in der DNS Sequenz eingesetzt (FRUEH et al. 2003) und zeichnet sich durch hohe Sensitivität aus. Sie findet daher in jüngerer Zeit auch vermehrt Anwendung bei der Identifizierung von Bakterien (ERCOLINI et al. 2008) und Hefen (GOLDENBERG et al. 2007). Aber auch ein erfolgreicher Einsatz zur Stammtypisierung von Bakterien (JURY et al. 2006) und klinisch relevanten Hefen (GOLDENBERG et al. 2005) ist dokumentiert. Nach dem in dieser Studie angewandten Protokoll wird zunächst ein stark variabler Abschnitt der IGS 2 Region amplifiziert, der in Abbildung 5 durch die beiden für *S. cerevisiae* spezifischen Primer IGS-2 fp und IGS-2 rp gekennzeichnet ist. Dieses etwa 200 bp lange Fragment eignet sich durch den hohen Grad an Sequenz-Polymorphismus sehr gut zur Stammtypisierung von *S. cerevisiae* (HUTZLER 2009). Während der denaturierenden HPLC wird dieses Fragment über eine Säule temperaturbedingt aufgetrennt und mittels Pufferlösungen abgewaschen. Aufgrund der polymorphen DNS Sequenz kann das amplifizierte Fragment unterschiedlich stark an die Säule binden. Die Bindeaffinität ist umso höher, je größer der GC-Anteil innerhalb dieses Sequenzabschnittes ist. Mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes kann der Denaturierungszeitpunkt gemessen werden und als Peakprofil dargestellt werden.

2 Methodik

Zur späteren Etablierung der FT-IR-Spektroskopie in der Futtermittelmikrobiologie erfolgte zunächst die Erweiterung der bestehenden Stammsammlung der Abteilung Mikrobiologie des Zentralinstituts für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL). Dieser Sammlung, die über 3.500 Hefestämme von 215 Arten unterschiedlichster Habitats (Lebensmittel, Luftkeime, Getränkeproben etc.) sowie offizielle Sammlungsstämme umfasst, wurden 280 Stämme, die aus Futtermitteln isoliert wurden, hinzugefügt. Die Stämme wurden bei -80 °C in Glycerinlösungen gelagert und für die Untersuchungen in Flüssigmedium mit Hefeextrakt und Dextrose reaktiviert. Anschließend erfolgte eine zweimalige Passagierung auf Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Festmedium (YGC-Agar von Merck), welches mit $0,01\text{ g/l}$ Bromphenolblau versetzt wurde (YGCB-Agar). Durch Zugabe des Farbstoffes lassen sich unterschiedliche Koloniemorphologien deutlicher erkennen, was die Kontrolle von Reinkulturen vereinfacht. Sowohl Stämme zum Aufbau des Systems als auch Validierungsstämme wurden hinsichtlich ihrer Identität mittels phänotypischer und molekularbiologischer Methoden überprüft.

2.1 Methoden zur Artidentifizierung und Stammdifferenzierung

2.1.1 FT-IR-Spektroskopie

Probenaufbereitung und Messung

Ausgehend von frischen Reinkulturen wird eine definierte Menge Zellmaterial abgenommen und auf YGC-Agar (Merck) ausplattiert, um das Wachstum eines konfluenten Zellrasens zu ermöglichen. Die Inkubation erfolgt für 24 h bei 27 °C . Für die Messung wird eine volle Impföse Material aus der Mitte dieses konfluenten Zellrasens abgenommen und in $100\text{ }\mu\text{l}$ autoklaviertem Wasser suspendiert und gevortext. Von der Suspension werden $35\text{ }\mu\text{l}$ je Feld auf einen Probenträger aus Zink-Selenit aufgetragen und anschließend etwa 45 Minuten bei 40 °C zu einem Zellfilm getrocknet. In Abbildung 6 sind diese Schritte der Probenaufbereitung und Messung grafisch dargestellt.

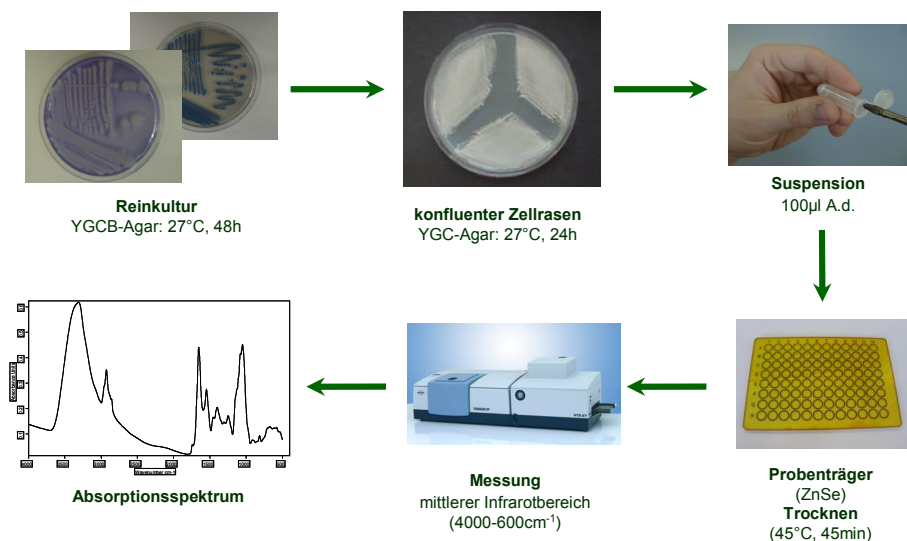


Abbildung 6: Arbeitsschritte der Probenaufbereitung und FT-IR-Messung

Die Messungen erfolgten im IFS 28B Spektrometer (Bruker) mit folgenden Messparametern:

- 6 cm^{-1} Auflösung
- 10 kHz scan speed
- Apodisation Blackman-Harris 3-term
- Zerofilling 4

Alle Stämme wurden mehrfach unabhängig gemessen, sodass pro Stamm mindestens 10, für *S. cerevisiae*-Isolate mindestens 30 FT-IR-Spektren zur Verfügung standen.

Auswertung und Identifizierung der Spektren

Für die Auswertung wird von den erhaltenen Spektren zunächst die zweite Ableitung gebildet und diese anschließend normiert. Weiterhin erfolgt eine Glättung der zweiten Ableitung nach SAVITZKY, A. (SAVITZKY & GOLAY 1967) an neun Punkten. Um die physikalische Güte der Messdaten zu überprüfen, wurden die Originalspektren einem Qualitätstest nach HELM et al. (1991) unterzogen.

Bei bestandenem Qualitätstest erfolgte die Identifizierung in Opus 3.1[®] (Bruker) mit der bestehenden Referenzdatenbank für Hefen (KÜMMERLE et al. 1998). Verglichen wird an dieser Stelle die zweite Ableitung sowie die Kombination von drei spektralen Fenstern: 3.030-2.830 cm⁻¹, 1.350-1.200 cm⁻¹ und 900-700 cm⁻¹ mit einer Gewichtung von eins und einem Replevel von 30.

2.1.2 Training der künstlichen neuronalen Netze

Um eine eindeutige Identifizierung von Arten der nah verwandten Gattungen *Issatchenkia* und *Pichia* gewährleisten zu können, wurde ein künstliches neuronales Netz erarbeitet, welches als zusätzliche Methode zur FT-IR-Spektroskopie angewandt werden kann. Ebenso wurde ein KNN zur Differenzierung von probiotischen und ubiquitären *S. cerevisiae* entwickelt, das nach einer vorherigen Artidentifizierung mittels Referenzdatenbank zur Stammtypisierung eingesetzt werden kann.

Für die Etablierung des jeweiligen KNN erfolgte eine Einteilung der zur Verfügung stehenden Stämme in Trainingsstämme, deren Spektren zum Aufbau des KNN eingesetzt wurden und Validierungsstämme, mit deren Spektren im Anschluss eine Prüfung der Funktionsfähigkeit und Korrektheit durchgeführt wurde. Diese Validierungsspektren wurden nicht in den Trainingsprozess des KNN integriert und sind daher dem System völlig unbekannt.

Zusammenstellung von Datensätzen

Vor Beginn des Trainings wurden mit den überprüften Spektren der Trainingsstämme drei Datensätze erstellt.

Tabelle 2: Datensätze für das Training des KNN

Datensatz	Spektrenanzahl je Stamm	Spektrenanzahl insgesamt (<i>S. cerevisiae</i> -Netz)	Spektrenanzahl insgesamt (<i>Issatchenkia-Pichia</i> -Netz)
Training	mindestens 8	1.399	2.026
Validierung	1	108	238
Test	1	108	238

Der Validierungsdatsatz wurde von der verwendeten Software automatisch während des Trainings für eine interne Validierung genutzt. Eine weitere interne Validierung mit den Testspektren, welche zur Prüfung der gewählten Netzstruktur diente, erfolgte anschließend manuell.

Zum Abschluss wurde eine externe Validierung durchgeführt. Dem *Issatchenkia-Pichia*-Netz wurden hierbei insgesamt insgesamt 1.608 unbekannte Spektren von 179 Stämmen der beiden Gattungen präsentiert, dem *S. cerevisiae*-Netz 965 unbekannte Spektren von 63 Stämmen bzw. Isolaten der fünf probiotischen Futtermittelzusätze.

Trainingssoftware

Das Training des künstlichen neuronalen Netzes wurde mit der Software NeuroDeveloper[®] (Synthon GmbH, Heidelberg) durchgeführt. Diese Software wurde für die Erstellung modulierbarer neuronaler Bibliotheken für die Klassifizierung spektraler Daten entwickelt. Im Vordergrund steht die unabhängige Wahl verschiedener Techniken der Datenvorbehandlung für jede Klassifizierungsstufe (UDELHOVEN et al. 2003). Dementsprechend dient der **FeatureDeveloper**, das erste von vier aufeinander aufbauenden Modulen, der Datenvorbehandlung sowie der automatisierten Selektion der am stärksten diskriminierenden Wellenzahlen. Diese sind für eine Klassifizierung relevant, weil hier wichtige Diskrepanzen für die Differenzierung zwischen den Klassen lokalisiert sind. Vorab werden im FeatureDeveloper die vorhandenen Trainingsspektren definierten Klassen zugeteilt

und mit den gewählten Parametern (siehe Tabelle 3) zu Datensätzen für das Training und die programminterne Validierung zur Überwachung des Trainingsprozesses verknüpft.

Der **NeuroSimulator** stellt das zweite Modul, welches zum Training der einzelnen Netze dient, dar. Es findet eine automatisierte Suche nach der vorteilhaftesten Neuronenkombination statt, die zudem vom Anwender überwacht und jederzeit manuell angehalten werden kann. Die Software verfährt nach dem ihr vorgegebenen Lernalgorithmus und bietet dementsprechend die Neuronenkombination an, bei der während der vom System durchgeführten internen Validierung der geringste Fehler aufgetreten ist (*best net so far*).

In jedem Fall werden mit Hilfe der NeuroDeveloper® Software KNN vom Typ fully connected Backpropagation trainiert. Die hier trainierten KNN enthielten zudem *shortcut connections*.

Im dritten Modul, dem **ModuleDeveloper**, lassen sich die vorher einzeln trainierten Netze in der gewünschten hierarchischen Struktur zu einem Gesamtnetz, bestehend aus einem Toplevelnetz und den entsprechenden Sublevelnetzen, zusammenstellen. Das KNN-Modell kann im **Classification**-Modul einer externen Validierung mit unbekanntem Spektren unterzogen werden.

Tabelle 3: Übersicht der gewählten Parameter zur Datenvorbehandlung

Parameter	Einstellung
Ableitung	Zweiter Grad mit Savitzky-Golay Algorithmus und neun Glättungspunkten
Normierung	Vektornormierung über gesamten Spektralbereich
Spektralbereiche	Fenster 1: 700 – 1.800 cm ⁻¹ /900 – 1.800 cm ⁻¹ Fenster 2: 2.800 – 3.100 cm ⁻¹
Algorithmus zur Auswahl der Wellenlänge/Bestpoints	Covar
Lernalgorithmus	Resilient propagation (Rprop)

2.1.3 Anwendung des API 20C AUX Systems

Ein Stammset probiotischer *S. cerevisiae*-Stämme wurde mittels API 20C AUX (Biomérieux) auf Unterschiede hinsichtlich der Zuckerassimilation untersucht. Die Vorkultur wurde auf YGCB-Agar (Merck) für 24h bei 30 °C inkubiert. Das Beimpfen der Teststreifen erfolgte nach Herstellerangaben, das Ablesen fand nach 48 h und 72 h statt. Weil sich die zu erwartenden Unterschiede auf die Verwertung bestimmter Substrate (D-Trehalose und D-Melezitose) beschränkten, wurde auf die Untersuchung der Pseudomycelbildung verzichtet.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Partielle Sequenzierung der 26S rDNS zur Artidentifizierung

Die Zellanzucht erfolgte auf YGCB-Agar (Merck) bei 27 °C für 48 Stunden. Eine definierte Menge Zellmaterial wurde in 200 µl sterilem MilliQ Wasser suspendiert und mittels Zirkoniumsilikatperlen (0,5 mm, Roth) in einem FastPrep®-24 Gerät (MP Biomedicals) bei 6,5 m/s zweimal 45 Sekunden aufgeschlossen. Diese Suspension wurde bei 13.000 rpm für 3,5 Minuten zentrifugiert und der Überstand bei -21 °C bis zum weiteren Gebrauch tiefgefroren.

Die PCR-Amplifizierung des 579 bp langen Fragmentes der 26S rDNS wurde nach KURTZMAN & ROBNETT (2003) unter Verwendung der Primer NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') und NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') durchgeführt. Der 50 µl Ansatz enthielt 8 µl Lysat als Template, 0,5 µl je Primer [50 pmol/µl], 5 µl 10 x Thermoprime Standard Buffer (ABgene), 2 µl dNTP Mix [20 mM] (ABgene), 3 µl MgCl₂ [25 mM] (ABgene), 0,1 µl Thermoprime Taq Polymerase ®

(ABgene) und 30,9 µl steriles MilliQ Wasser. Zur Überprüfung der PCR wurde eine Agarosegelelektrophorese mit einem 1%igen Agarosegel (SeaKem) durchgeführt. Die mit 6 µl PCR-Produkt geladenen und mit 1x-TAE-Puffer überschichteten Gele liefen bei 90 V etwa 45 min. Für die Auswertung wurden zusätzlich 4 µl GeneRuler DNS Ladder Mix (#SM1173, MBI – Fermentas) als Standard auf das Gel aufgetragen. Anschließend wurden die Gele für die fotografische Auswertung im Ethidiumbromidbad 20-30 Minuten gefärbt. Wurden die gewünschten PCR-Produkte mit etwa 579 bp Länge erhalten, folgte die Reinigung des verbleibenden Volumens nach Protokoll des QIA-quick PCR Purification Kits (QIAGEN, Hilden).

Die Sequenzier-PCR wurde extern durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Die Identifizierung der erhaltenen Nukleotidsequenzen erfolgte über eine Datenbankrecherche mit BlastN bei NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Zur zusätzlichen Überprüfung der Blast-Ergebnisse wurden mit den Sequenzen Alignments in ClustalX 1.81 (THOMPSON et al. 1997) errechnet und die entsprechenden phylogenetischen Bäume in TREECON für Windows 3.1b visualisiert (VAN DE PEER & DE WACHTER 1997). Es wurden zusätzlich Referenzsequenzen offizieller Stämme von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) in die Berechnungen aufgenommen.

2.2.2 Denaturierende HPLC zur Stammtypisierung

Die Anzucht der Zellen erfolgte auf YGCB-Agar (Merck) bei 27 °C für 48 Stunden. Zur Isolation der DNS wurde das InstaGene™ Matrix Kit (Bio-Rad Laboratories) nach den Herstellerangaben zur DNS Präparation aus Bakterien verwendet. Zur Anwendung dieses Protokolls auf Hefezellen musste eine Modifizierung des erstens Arbeitsschrittes vorgenommen werden: Die Zellen wurden direkt in 200 µl InstaGene matrix Lösung suspendiert und bei 56 °C für 30 Minuten inkubiert. Die isolierte DNS wurde bei -21 °C bis zum weiteren Gebrauch tiefgefroren.

Für die Amplifizierung eines 200 bp langen rDNS Fragmentes der IGS 2 wurden die Primer pIGS2-fp (5'-CGGGTAACCCAGTTCCTCACT-3') und pIGS2-rp (5'-GTAGCATATATTTCTTGTGTGAG-AAAGGT-5') verwendet (BÜCHL et al. 2010). Der 25 µl Ansatz enthielt 2,5 µl DNS als Template, 1,5 µl je Primer [600 nmol/µl], 2,5 µl 10 x Optimase Reaction Buffer mit 15 mM MgSO₄ (Transgenomic), 2,5 µl dNTP Mix [2 mM] (Transgenomic), 0,5 µl Optimase® [2,5 U] (Transgenomic) und 14 µl AMPUWA Wasser (Fresenius Kabi Deutschland GmbH). Die PCR wurde nach BÜCHL et al. (2008) durchgeführt, die erhaltenen Produkte mittels Agarosegelelektrophorese (analog zu Kapitel 2.2.1) überprüft. Die dHPLC Analyse erfolgte mittels WAVE® Microbial Analysis System (Transgenomic), die Parametereinstellungen wurde nach BÜCHL et al. (2008) gewählt. Zur Datenanalyse wurde die Navigator™ Software Version 1.5.4 (Transgenomic) verwendet.

2.2.3 δ-PCR zur Stammdifferenzierung

Die Zellen wurden in 5 ml Hefeextrakt-Dextrose-Bouillon über Nacht bei 27 °C angezogen. Zur Isolation von genomischer DNS aus Zellen wurde das NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel) mit den Protokollangaben für kultivierte Zellen verwendet. Die PCR-Amplifizierung erfolgte nach NESS et al. (1993) unter Verwendung der Primer δ-1 (5'-CAAATTCACCTAT^ΔTCTCA-3') und δ-2 (5'-GTGGATTTTATTCCAACA-3') im 50 µl Ansatz. Für jeden Ansatz wurden 50 ng/µl DNS, 0,5 µl je Primer [50 pmol/µl], 5 µl 10 x Thermoprime Standard Buffer (ABgene), 2 µl dNTP Mix [20 mM] (ABgene), 3 µl MgCl₂ [25 mM] (ABgene), 0,1 µl Thermoprime Taq Polymerase® (ABgene) und 30,9 µl steriles MilliQ Wasser eingesetzt. Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.1), je Ansatz wurde ein Volumen von 7 µl auf das Gel geladen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Differenzierung von Hefearten der Gattungen *Issatchenkia* und *Pichia*

Die Gattung *Pichia* zählt mit derzeit 91 beschriebenen Arten zu einer der größten beschriebenen Hefegattungen, die Gattung *Issatchenkia* dagegen stellt mit fünf bekannten Arten eine der kleinsten Hefegattungen dar (KURTZMAN & FELL 1998). Vertreter beider Gattungen können aus einer Vielzahl unterschiedlichster Habitats wie Boden, Wasser und Früchte isoliert werden. Die dementsprechend notwendige Anpassung an unterschiedliche Lebensbedingungen resultiert in einer großen phänotypischen Varianz zwischen den Arten, die häufig eine Identifizierung auf Artebene mit Hilfe klassischer physiologischer und biochemischer Identifizierungssysteme erschwert. In beiden Gattungen finden sich allerdings Arten, die als opportunistisch pathogene Organismen beschrieben sind und deren exakte Identifizierung demzufolge von großer Bedeutung ist (HURLEY et al. 1989, PFALLER et al. 2008). Um dies zu ermöglichen, wurde ergänzend zur FTIR-spektroskopischen Datenbank ein künstliches neuronales Netz zur Differenzierung von Arten der Gattungen *Issatchenkia* und *Pichia* etabliert. Hierfür standen alle fünf beschriebenen *Issatchenkia*-Arten sowie 16 *Pichia*-Arten, die häufig im Futter- und auch Lebensmittelbereich auftreten, in der abteilungseigenen Stammsammlung zur Verfügung.

3.1.1 Identifizierung der Referenzstämme

Für die Etablierung des KNN ist die eindeutige Identifikation aller Referenzstämme essentiell, da der Trainingprozess des KNN einen Schritt zur Kalibrierung des Systems beinhaltet. Es erfolgte daher im Vorfeld die Identifizierung von insgesamt 144 Stämmen mittels 26S rDNA Sequenzierung (Tabelle 4).

Tabelle 4: Stammübersicht der mittels 26S rDNA Sequenzierung identifizierten Stämme

	Gattung	Art	Anzahl der Stämme insgesamt	Anzahl der sequenzierten Stämme
		<i>I. hanoiensis</i>	3	-
		<i>I. occidentalis</i>	13	8
		<i>I. orientalis</i>	142	42
		<i>I. scutulata</i>	8	-
		<i>I. terricola</i>	10	3
Summe	<i>Issatchenkia</i>	5 Arten	176	53
		<i>P. angusta</i>	13	7
		<i>P. anomala</i>	31	5
		<i>P. cactophila</i>	8	6
		<i>P. deserticola</i>	22	22
		<i>P. fabianii</i>	6	1
		<i>P. farinosa</i>	5	1
		<i>P. fermentans</i>	35	20
		<i>P. galeiformis</i>	7	4

	Gattung	Art	Anzahl der Stämme insgesamt	Anzahl der sequenzierten Stämme
		<i>P. guilliermondii</i>	30	6
		<i>P. jadinii</i>	12	3
		<i>P. kluyveri</i>	17	3
		<i>P. membranifaciens</i>	27	3
		<i>P. nakasei</i>	2	2
		<i>P. norvegensis</i>	9	5
		<i>P. pseudocactophila</i>	3	3
		<i>P. triangularis</i>	14	-
Summe	<i>Pichia</i>	16 Arten	241	91
Gesamtsumme		21 Arten	417	144

Zu den sequenzierten Stämmen zählten auch mehrere Stämme aus offiziellen Stammsammlungen, deren Identität aufgrund von atypischen FT-IR-Spektren überprüft wurde. Drei dieser Stämme mussten basierend auf den Sequenzierungsergebnissen umbenannt werden. Zwei *I. occidentalis*-Stämme, der Typstamm CBS 5459 (Centralbureau voor Schimmelcultures, Niederlande) und der Stamm CBS 2107, wiesen eine 26S rDNS Sequenz auf, die zu 100 % identisch war zur 26S rDNS Sequenz vom *I. orientalis*-Stamm CBS 573 (BLAST Zugriffsnummer AY497684). Dieses Identifizierungsergebnis wurde durch die CBS bestätigt. Der ursprüngliche *I. occidentalis*-Typstamm konnte allerdings nicht nachgeliefert werden und ist daher nicht im Stammset zur Etablierung des KNN enthalten. Des Weiteren wurde der *I. orientalis*-Stamm DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) 70086 mit 100 % Sequenzhomologie zum CBS Stamm 1876 (BLAST Zugriffsnummer AY497672) eindeutig als *P. fermentans*-Stamm identifiziert. Aufgrund dieser eindeutigen Sequenzierungsergebnisse wurden alle drei Stämme in den Trainingsprozess des KNN integriert.

Zusätzlich zum Datenbankvergleich bei NCBI wurden für sehr nah verwandte Arten basierend auf den 26S rDNS Sequenzen Ähnlichkeitsanalysen berechnet und bildhaft in phylogenetischen Bäumen dargestellt (Abbildung 7). Dies ermöglichte die Unterscheidung zwischen Arten mit hoher genetischer Ähnlichkeit.

In Abbildung 7 ist deutlich erkennbar, dass Arten der Gattung *Issatchenkia* kein separates Cluster formen, sondern eine gemischte Gruppe mit *Pichia*-Arten bilden (Cluster 1). Dies bestätigten bereits veröffentlichte Daten von KURTZMAN & ROBNETT (1998), die in ihrer Veröffentlichung die Vermutung nahe legten, dass es sich bei der Gattung *Issatchenkia* um ein Synonym der Gattung *Pichia* handeln könnte. Besonders die Spezies *I. orientalis* scheint genetisch aufgrund großer Ähnlichkeit der 26S rDNS Sequenz näher zu drei *Pichia*-Arten, *P. membranifaciens*, *P. deserticola* und *P. galeiformis*, verwandt zu sein als zu den verbleibenden vier *Issatchenkia*-Arten.

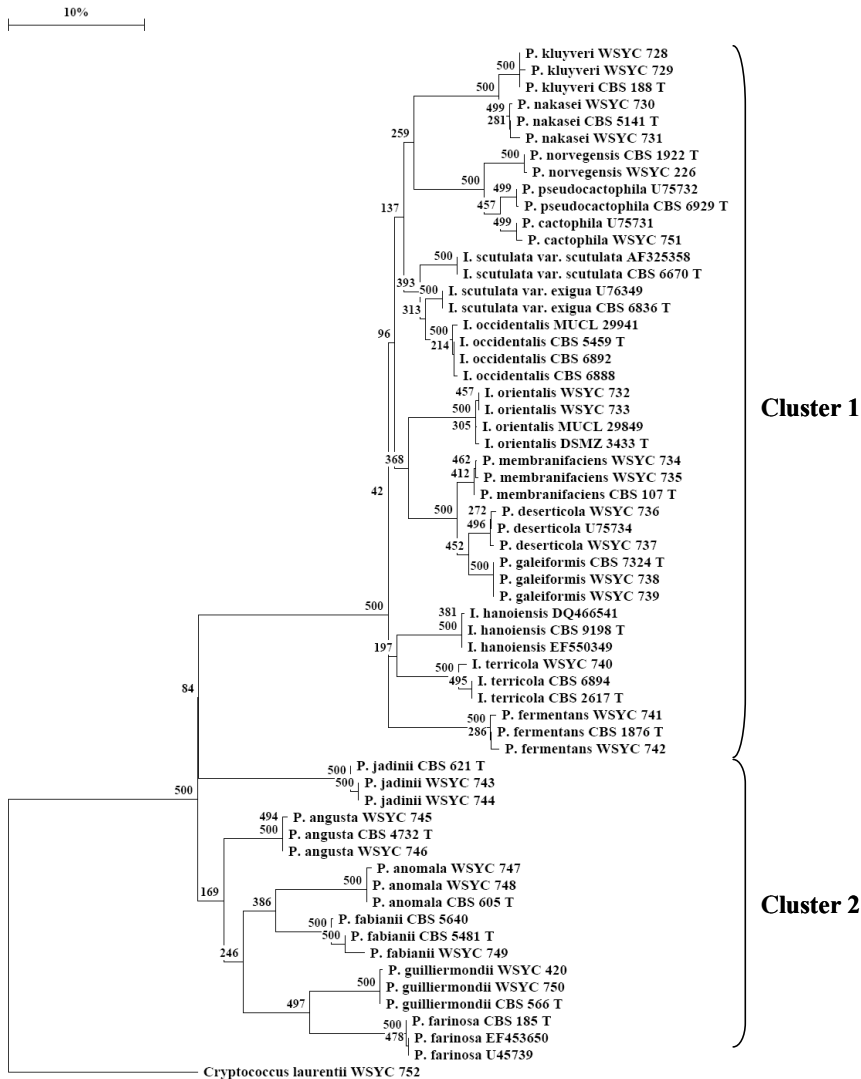


Abbildung 7: Phylogenetischer Baum nah verwandter *Issatchenkia*- und *Pichia*-Arten basierend auf 26S rDNS Sequenzen

Die Berechnung des Baumes erfolgte mittels Algorithmus von Jukes & Cantor, Neighbour-joining Berechnung und Bootstrap 500. Als Außengruppe wurde der Stamm *Cryptococcus laurentii* WSYC 752 gewählt. CBS, Centralbureau voor Schimmelcultures, Niederlande; DSMZ, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen; MUCL, Industrial Fungi and Yeasts Collection, Belgien; WSYC, Weihenstephaner Hefesammlung; T, Typstamm. Der Balken indiziert 10 % Unterschied hinsichtlich der 26S rDNS Sequenz (aus BÜCHL et al. 2008).

Die Analyse der FT-IR-Spektren von Stämmen der fünf *Issatchenkia*-Arten durch Hierarchische Clusteranalyse bestätigte dieses Resultat (Abbildung 8). Auch in diesem Dendrogramm bilden die Spektren der *I. orientalis*-Stämme eine eigene Gruppe (Gruppe B), die einen großen spektralen Abstand zu den übrigen *Issatchenkia*-Arten (Gruppe A) aufweist.

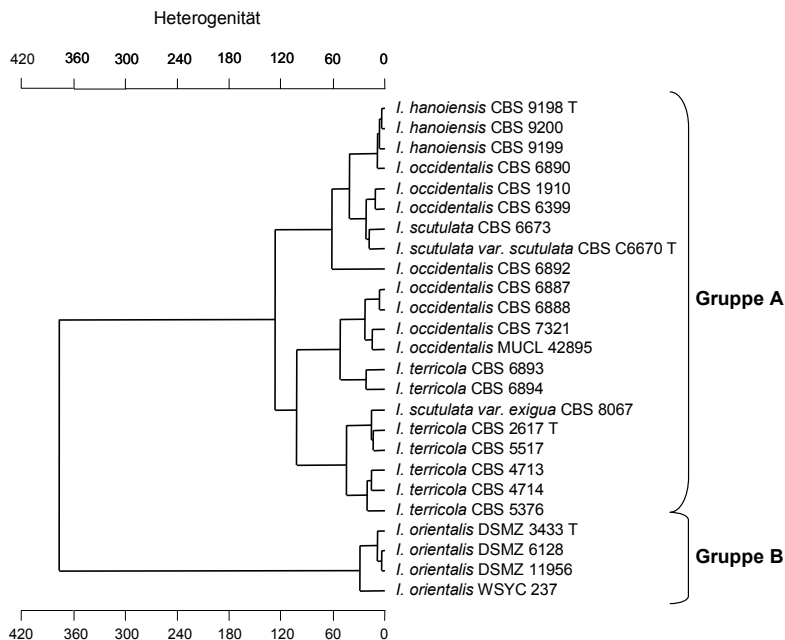


Abbildung 8: Dendrogramm der Hierarchischen Clusteranalyse der FT-IR-Spektren von 25 *Issatchenkia* Stämmen offizieller Stammsammlungen

Spektrale Fenster $3.030\text{-}2.830\text{ cm}^{-1}$, $1.350\text{-}1.200\text{ cm}^{-1}$, $900\text{-}700\text{ cm}^{-1}$, 2. Ableitung. CBS, Centralbureau voor Schimmelcultures, Niederlande; DSMZ, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen; MUCL, Industrial Fungi and Yeasts Collection, Belgien; WSYC, Weihenstephaner Hefesammlung; T, Typstamm.

Diese Erkenntnisse hinsichtlich der taxonomischen Verwandtschaft zwischen *Issatchenkia*- und *Pichia*-Arten wurden bei der späteren Entwicklung der hierarchischen Struktur des KNN berücksichtigt.

3.1.2 Etablierung des künstlichen neuronalen Netzes

Training und struktureller Aufbau des KNN

Die Güte eines Systems zur Identifizierung von Mikroorganismen ist stark von der Qualität des Referenzdatensatzes abhängig. Aus diesem Grund wurde eine hohe Anzahl an Stämmen, die aus unterschiedlichsten Habitaten isoliert wurden, für die Etablierung des KNN genutzt. Dadurch wurde ein größtmöglicher Varianzbereich hinsichtlich der Biodiversität innerhalb der Arten abgedeckt. Insgesamt wurden 417 Stämme von 21 Arten als Referenzstämme zum Systemaufbau verwendet, wobei 238 von diesen Stämmen als Trainingsstämme eingesetzt und die verbleibenden 179 Stämme zur Validierung des Systems genutzt wurden (siehe Tabelle 5). Es wurde darauf geachtet, dass das Stammverhältnis zwischen den enthaltenen Arten so ausgeglichen wie möglich ist, um auch eine Identifizierung von Arten gewährleisten zu können, von denen eine geringere Anzahl an Stämmen verfügbar war. Eine Stammüberzahl einzelner Arten würde ansonsten zu Missidentifizierungen von unterrepräsentierten Arten führen.

Tabelle 5: Stammübersicht zur Etablierung und Validierung des KNN

	Gattung	Art	Anzahl der Stämme insgesamt	Anzahl der Stämme im Training	Anzahl der Stämme in der Validierung
		<i>I. hanoiensis</i>	3	3	-
		<i>I. occidentalis</i>	13	11	2
		<i>I. orientalis</i>	142	36	106
		<i>I. scutulata</i>	8	6	2
		<i>I. terricola</i>	10	8	2
Summe	<i>Issatchenkia</i>	5 Arten	176	64	112
		<i>P. angusta</i>	13	9	4
		<i>P. anomala</i>	31	18	13
		<i>P. cactophila</i>	8	7	1
		<i>P. deserticola</i>	22	14	8
		<i>P. fabianii</i>	6	5	1
		<i>P. farinosa</i>	5	4	1
		<i>P. fermentans</i>	35	23	12
		<i>P. galeiformis</i>	7	6	1
		<i>P. guilliermondii</i>	30	20	10
		<i>P. jadinii</i>	12	11	1
		<i>P. kluyveri</i>	17	14	3
		<i>P. membranifaciens</i>	27	21	6
		<i>P. nakasei</i>	2	2	-
		<i>P. norvegensis</i>	9	8	1
		<i>P. pseudocactophila</i>	3	3	-
		<i>P. triangularis</i>	14	9	5
Summe	<i>Pichia</i>	16 Arten	241	174	67
Gesamtsumme		21 Arten	417	238	179

Zur Etablierung des KNN wurde die NeuroDeveloper Software[®] verwendet. Diese bietet den Vorteil, dass einzelne Subnetze in voneinander getrennten Trainingsprozessen trainiert werden und abschließend zu einem einzigen großen KNN miteinander verbunden werden können. Dadurch wird eine unabhängige Datenvorbehandlung und unabhängige Wahl der Trainingsparameter für jedes Subnetz ermöglicht (UDELHOVEN et al. 2003). Im Zuge der Datenvorbehandlung können so systematisch die Wellenzahlen mit dem größten Differenzierungspotenzial für die spezifischen Differenzierungsprobleme jedes Subnetzes ermittelt werden. Für die Identifizierung der nah verwandten *Issatchenkia*- und *Pichia*-Arten wurden insgesamt zehn Subnetze trainiert und miteinander verbunden. Bei sechs dieser Subnetze wurde der sogenannte Fingerprint-Bereich zwischen

900 cm⁻¹ und 700 cm⁻¹ als Spektralbereich mit dem größten Differenzierungspotenzial ermittelt. Obwohl dieser Bereich bislang noch nicht der Absorption von spezifischen Zellbestandteilen zugeordnet wurde, ist bekannt, dass er sehr charakteristische Peaks enthält, die gerade zur Unterscheidung von nah verwandten Arten genutzt werden können. Dagegen wurde zur Differenzierung der Arten *P. anomala* und *P. fabianii* bzw. *P. cactophila* und *P. pseudocactophila* beispielsweise vorwiegend ein Abschnitt des gemischten Bereiches bei 1300 cm⁻¹ genutzt. Die Unterscheidung anderer Arten wie *I. orientalis* und *P. norvegensis* erforderte hingegen Wellenzahlen, die sich über den gesamten mittleren Infrarotbereich erstreckten.

Der strukturelle Aufbau des KNN ist in Abbildung 9 dargestellt und zeigt, dass sich das KNN aus zehn Subnetzen zusammensetzt, die in vier aufeinander folgenden Ebenen angeordnet sind. Diese Struktur basiert sowohl auf den Ergebnissen der 26S rDNS Sequenzierung (Abbildung 7) als auch auf den Gruppierungen, die sich bei der Spektralanalyse im Zuge der Hierarchischen Clusteranalyse (Abbildung 8) ergeben haben.

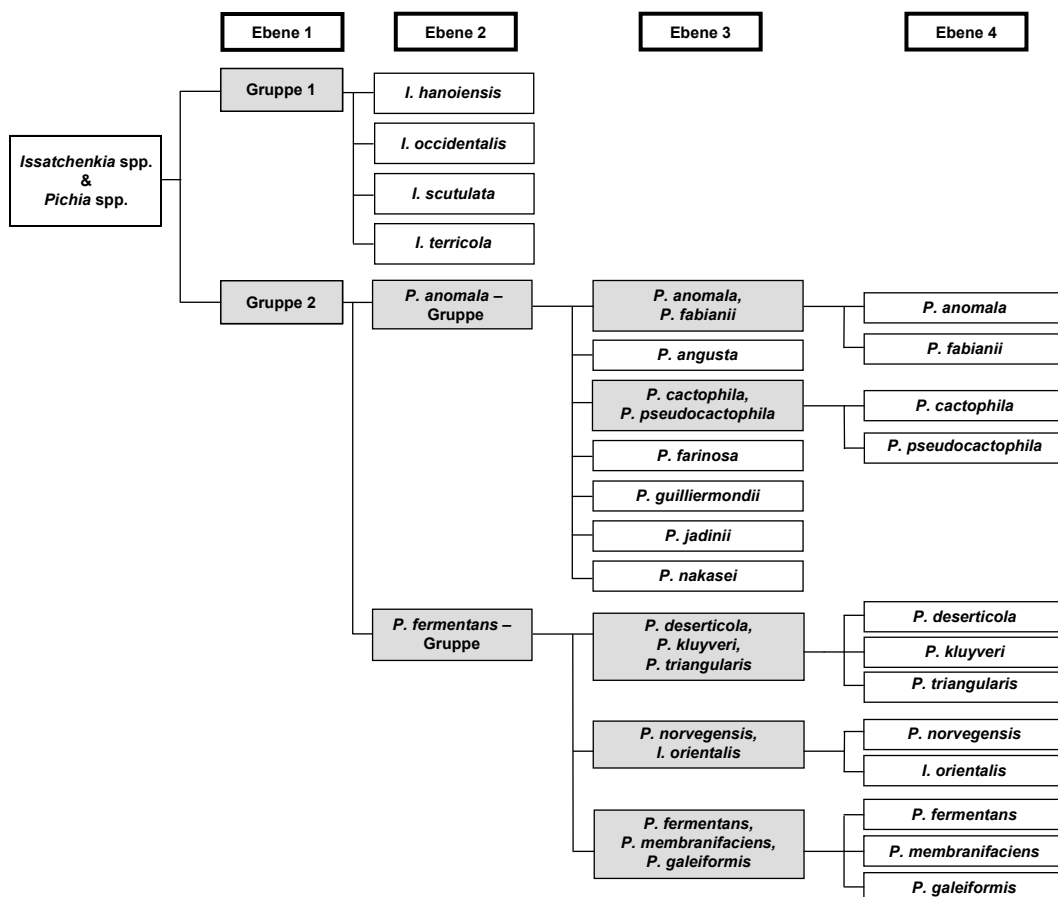


Abbildung 9: Hierarchische Struktur des KNN zur Differenzierung nah verwandter *Issatchenkia* und *Pichia* Arten

Das System umfasst zehn Subnetze, die auf vier Ebenen verteilt sind. Jedes Subnetz (grau markiert) ist speziell optimiert für die Unterscheidung der in ihm enthaltenen Arten (aus BÜCHL et al. 2008).

Diesen Ergebnissen entsprechend wurde die Spezies *I. orientalis* von den restlichen *Issatchenkia*-Arten getrennt und mit allen vertretenen *Pichia*-Arten in Gruppe zwei der ersten Ebene zusammengefasst (Abbildung 9). Die Artidentifizierung der verbleibenden vier *Issatchenkia*-Arten in Gruppe eins wurde auf der zweiten Ebene des KNN realisiert. Dagegen wurde Gruppe zwei in der darauffolgenden Ebene zwei aufgrund der großen Artanzahl und der dadurch bedingten großen Heterogenität erneut in zwei Untergruppen mit mehreren Arten unterteilt. Die Einteilung in eine *P. fermentans*- sowie eine *P. anomala*-Gruppe entspricht den beiden Gruppierungen der phylogenetischen Analyse der 26S rDNS Sequenz in Abbildung 7. Vertreter der *P. fermentans*-Gruppe bilden in Abbildung 7 Cluster 1, wohingegen die in der *P. anomala*-Gruppe zusammengefassten Arten den Spezies in Cluster 2 entsprechen. Aufgrund ihrer spektralen Ähnlichkeit zu Vertretern der *P. anomala*-Gruppe wurden die Arten *P. nakasei*, *P. cactophila* und *P. pseudocactophila* abweichend von den phylogenetischen Daten dieser Gruppe

zugeordnet. Das Beispiel demonstriert, dass spektroskopische Daten nicht zwingend mit genetischen Daten zu Verwandtschaftsbeziehungen übereinstimmen müssen. Der Einsatz von FT-IR-Spektroskopie zur Analyse genetischer Ähnlichkeitsbeziehungen ist daher nicht geeignet. Auf Ebene drei des KNN konnten bereits fünf Vertreter der *P. anomala*-Gruppe auf Artebene identifiziert werden, was größeren Unterschieden in der 26S rDNS Sequenz wie in Abbildung 7 dargestellt entspricht. *P. angusta*- und *P. jadinii*-Sequenzen sind in dieser Abbildung innerhalb des Cluster 2 deutlich getrennt, wogegen *P. fabianii*- und *P. anomala*-Sequenzen eine höhere Homologie aufweisen. Dies spiegelte sich auch in einer großen spektralen Ähnlichkeit zwischen *P. fabianii*- und *P. anomala*-Stämmen wider, die eine Trennung der Spektren mittels Hierarchischer Clusteranalyse nicht zuließ. In Bezug auf das KNN war daher eine weitere vierte Ebene zur Unterscheidung dieser Arten notwendig. Die Artidentifizierung von *P. cactophila* und *P. pseudocactophila* erfolgte ebenfalls erst auf der vierten Ebenen des KNN, weil diese beiden Arten die größte Homologie hinsichtlich ihrer 26S rDNS Sequenz (siehe Abbildung 7) und zugleich sehr große spektrale Ähnlichkeit aufwiesen. Im Gegensatz zur *P. anomala*-Gruppe konnte kein Vertreter der *P. fermentans*-Gruppe auf der dritten Ebene des KNN identifiziert werden, weshalb eine weitere Unterteilung der enthaltenen Arten in Untergruppen erfolgte. Dies ist auf eine sehr große Ähnlichkeit der 26S rDNS Sequenzen der in dieser Gruppe zusammengefassten Arten zurückzuführen. Die Einteilung in die drei Untergruppen erfolgte daher ausschließlich anhand von Gruppierungen einer Hierarchischen Clusteranalyse der Spektren. Die Identifizierung der Arten wurde auf der vierten Ebene des KNN realisiert.

Validierung des KNN

Zur Prüfung der Funktionsfähigkeit sowie der Verlässlichkeit des KNN wurden zwei unterschiedliche Validierungsdatensätze verwendet. Zunächst wurde dem Netz in einer internen Validierung ein Spektrum jedes Referenzstammes präsentiert, das nicht im Trainingsdatensatz enthalten war. Zur Durchführung dieses Tests wurden dementsprechend insgesamt 238 Spektren verwendet, von denen 99,2 % richtig zugeordnet wurden (Tabelle 6). Die hohe Prozentzahl an korrekten Identifizierungen belegt, dass ein geeigneter struktureller Aufbau des KNN gewählt wurde. Hervorzuheben ist, dass kein Spektrum falsch identifiziert wurde und lediglich zwei Spektren keine Zuordnung getroffen werden konnte. Weil es sich hierbei um *P. cactophila*- bzw. *P. pseudocactophila*-Spektren handelt, wurde eine eindeutige Identifizierung durch den hohen Grad an genetischer, phänotypischer und damit auch spektraler Ähnlichkeit verhindert. Nichtsdestotrotz spricht die hohe Rate an korrekten Identifizierungen der internen Validierung für das Potenzial und die Verlässlichkeit des etablierten KNN.

Tabelle 6: Ergebnisse der internen Validierung des KNN

Gattung	Gesamtanzahl der Spektren	korrekt identifizierte Spektren (%)	nicht identifizierte Spektren (%)	falsch identifizierte Spektren (%)
<i>Issatchenkia</i>	64	64 (100)	0	0
<i>Pichia</i>	174	172 (98,9)	2 (1,1)	0
Summe	238	236 (99,2)	2 (0,8)	0

Um die Funktionsfähigkeit des KNN in der Praxis zu testen, wurde daraufhin eine externe Validierung durchgeführt. Da hierbei 1608 Spektren von 179 Stämmen verwendet wurden, die nicht im Training enthalten waren (siehe Tabelle 5) und dem Netz daher völlig unbekannt waren, stellt dieser Test einen realistischeren Test als die interne Validierung dar. Wie in Tabelle 7 aufgeführt, wurden 98,6 % der Spektren korrekt identifiziert. Dies bestätigt erneut die geeignete hierarchische Struktur des KNN sowie das große Potenzial und die Genauigkeit des Systems. Darüber hinaus ist die Rate an korrekten Identifizierungen in der externen Validierung annähernd so hoch wie in der voraus gegangenen internen Validierung. Frühere Studien auf diesem Gebiet, in denen Bakterien verwendet wurden (REBUFFO et al. 2006), folgerten aus vergleichbaren Ergebnissen der internen und externen Validierung einen Beleg für die Stabilität des KNN. Dies zeigt, dass eine repräsentative Zahl an Stämmen im Training genutzt wurde, welche die phänotypische Biodiversität ausreichend abdeckt. Neun der insgesamt 18 Arten, die in der externen Validierung vertreten waren, wurden zu 100 % korrekt identifiziert. Dies waren Stämme der Arten *I. occidentalis*, *I. scutulata*, *I. terricola*, *P. anomala*, *P. galeiformis*, *P. guilliermondii*, *P. jadinii*, *P. kluyveri* und *P. membranifaciens*. Lediglich 23 Spektren wurden nicht korrekt zugeordnet, von welchen neun falsch und 14 nicht identifiziert wurden.

Tabelle 7: Ergebnisse der externen Validierung des KNN

Gattung	Gesamtanzahl der Spektren	korrekt identifizierte Spektren (%)	nicht identifizierte Spektren (%)	falsch identifizierte Spektren (%)
<i>Issatchenkia</i>	918	907 (98,8)	7 (0,8)	4 (0,4)
<i>Pichia</i>	690	678 (98,3)	2 (0,3)	10 (1,4)
Summe	1608	1585 (98,6)	9 (0,5)	10 (0,9)

Obwohl durchschnittlich acht Spektren pro Stamm in der externen Validierung enthalten waren, wurde nur bei drei Stämmen mehr als ein Spektrum nicht korrekt zugeordnet. Folglich wurde kein Stamm komplett falsch identifiziert. Trotzdem konnten drei von 10 Spektren eines *P. norvegensis*-Stammes nicht korrekt zugeordnet werden. In diesem Fall war die Anzahl der Stämme im Training nicht ausreichend, um eine Identifizierung der Validierungsspektren gewährleisten zu können. Daher müssen weitere *P. norvegensis*-Stämme in das System integriert werden, um eine Verbesserung dieses KNN-Bereiches zu erzielen. Die Anzahl der Stämme, die notwendig ist, um die Biodiversität innerhalb einer Art ausreichend abzudecken, scheint allerdings abhängig von der jeweiligen Art zu sein. Denn trotz einer vergleichsweise geringen Stammzahl im Training (sechs enthaltene Stämme), wurden alle *P. galeiformis*-Spektren in der externen Validierung korrekt identifiziert.

3.2 Differenzierung von probiotischen und ubiquitären

S. cerevisiae

Neben der Ausarbeitung eines verlässlichen Systems zur eindeutigen Identifizierung der in Futtermitteln vorkommenden Hefearten wurde ein weiteres künstliches neuronales Netz zur Stammdifferenzierung von probiotischen und ubiquitären *S. cerevisiae* entwickelt. Hierzu dienten insgesamt 171 *S. cerevisiae*-Isolate, die sich aus 67 ubiquitären Isolaten aus Futtermitteln, Lebensmitteln und der Umwelt sowie aus 107 Isolaten der fünf zugelassenen Futtermittelzusatzstoffe zusammensetzten. Die Identität aller Isolate wurde mit Hilfe der abteilungseigenen Datenbank zur Identifizierung von Hefen überprüft und in allen Fällen eindeutig als *S. cerevisiae* bestätigt.

3.2.1 Stammtypisierung der Referenzisolate

Für die Etablierung des KNN ist die exakte Klassifizierung der Isolate, die in den Trainingsprozess des Systems eingebunden werden, von besonderer Bedeutung. Als Referenzmethoden wurden sowohl klassische phänotypische Methoden als auch molekularbiologische Techniken hinsichtlich ihrer Eignung geprüft.

Anwendung phänotypischer Techniken

Hierarchische Clusteranalyse der FT-IR Spektren

Zunächst wurde geprüft, ob sich die Hierarchische Clusteranalyse der FT-IR Spektren eignet, um probiotische und ubiquitäre Referenzisolate eindeutig von einander zu differenzieren. Ferner wurde das Potenzial dieser Methode zur Unterscheidung zwischen probiotischen Isolaten der fünf Futtermittelzusätze untersucht, um auf diese Weise eine verlässliche Zuordnung zu dem jeweiligen probiotischen Futtermittelzusatz treffen zu können. Das Resultat der HCA von repräsentativen Vertretern dreier ubiquitärer *S. cerevisiae*-Stämme sowie 25 probiotischer *S. cerevisiae*-Stämme ist in Abbildung 10 dargestellt. Die Spektren der drei ubiquitären Isolate lassen sich deutlich von den Spektren der probiotischen Isolate trennen. Innerhalb der probiotischen *S. cerevisiae* bilden lediglich die Isolate des Stammes CNCM I-1079 ein separates Cluster, was eine Differenzierung zu den restlichen vier probiotischen Stämmen mittels HCA ermöglicht. Isolate der Stämme NCYC 1026 und NCYC Sc47 bzw. CNCM I-1077 und MUCL 39885 dagegen lassen sich mit Hilfe der verwendeten spektralen Fenster nicht trennen und bilden jeweils ein gemischtes Cluster.

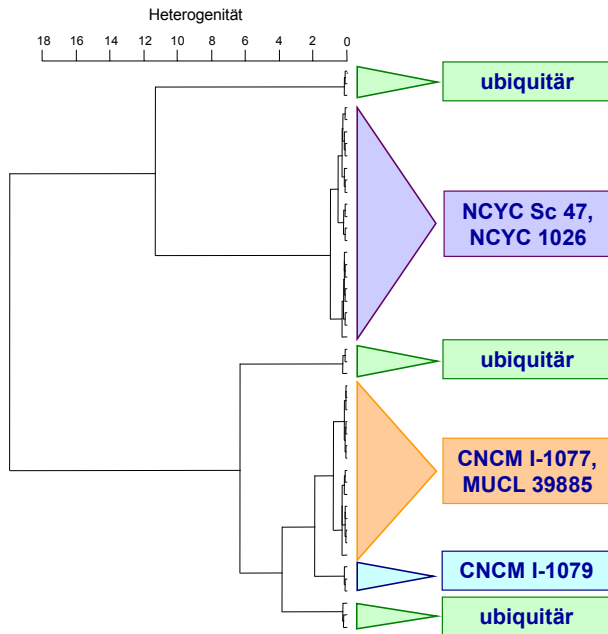


Abbildung 10: Hierarchische Clusteranalyse von drei ubiquitären und 25 probiotischen *S. cerevisiae*-Isolaten der Futtermittelzusatzstoffe CNCM I-1077, CNCM I-1079, NCYC Sc47, NCYC 1026 und MUCL 39885

2. Ableitung, Wards Algorithmus, spektrale Fenster 3.030-2.830 cm^{-1} , 1.350-1.200 cm^{-1} , 900-700 cm^{-1} , Gewichtung 1 und Reprolevel 30

Eine Betrachtung des gesamten Spektralbereiches zeigte jedoch, dass eine Trennung der beiden Stämme CNCM I-1077 und MUCL 39885 unter Verwendung anderer Spektralbereiche möglich ist. So liegen die für diese Differenzierung relevanten Unterschiede im Polysaccharidbereich zwischen 1.000 und 1.140 cm^{-1} (Abbildung 11).

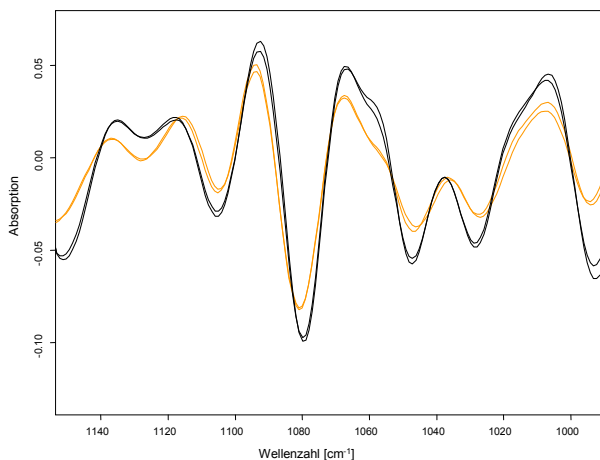


Abbildung 11: Ausschnitt der 2. Ableitung von Isolaten der probiotischen Stämme MUCL 39885 (orange) und CNCM I-1077 (schwarz)

Eine Differenzierung zwischen den verbleibenden Stämmen NCYC Sc47 und NCYC 1026 konnte jedoch nicht realisiert werden. Die Ergebnisse zeigen beispielhaft für eine Auswahl an Stämmen, dass sich die Anwendung der FT-IR-Spektroskopie zur Unterscheidung von probiotischen und ubiquitären *S. cerevisiae* grundsätzlich eignet. Für die Differenzierung einer hohen Anzahl an ubiquitären Stämmen unterschiedlichster Habitate sowie die Unterscheidung zwischen Isolaten der fünf probiotischen Stämme ist jedoch die Verknüpfung mit künstlichen neuronalen Netzen nötig.

API 20C AUX

Das API 20C AUX (Biomérieux) stellt eine häufig angewandte klassische Methode zur Identifizierung von Hefen dar, welche Unterschiede in der Assimilationsfähigkeit verschiedener Substrate zur Differenzierung nutzt. Im Auswertungsschema dieses Systems finden sich für *S. cerevisiae* zwei unterschiedliche Muster der Substratverwertung, weshalb das Stammtypisierungspotenzial dieser Methode zur Unterscheidung von probiotischen *S. cerevisiae*-Stämmen geprüft wurde. Laut Herstellerangaben sind *S. cerevisiae*-Stämme der Kategorie 1 befähigt Trehalose und Melizitose zu verstoffwechseln, Stämme der Kategorie 2 dagegen nicht. Die Verwertung der beiden Substrate Methyl- α -D-Glucopyranoside und Raffinose stellen ebenfalls sogenannte variable Reaktionen dar, weil Kategorie 1-Stämme häufiger zur Verstoffwechslung fähig sind als Stämme der Kategorie 2.

Für den Test wurde ein repräsentatives Stammset mit insgesamt 27 probiotischen *S. cerevisiae*-Stämmen verwendet, wobei der Schwerpunkt basierend auf Vortests bei Isolaten der Stämme NCYC Sc47 und NCYC 1026 mit je 11 vertretenen Isolat lag. Die Versuche im Vorfeld mit einer geringeren Isolatanzahl dieser beiden Stämme legte die Vermutung nahe, dass eine Unterscheidung zwischen NCYC Sc47 und NCYC 1026 anhand der Verwertung von Methyl- α -D-Glucopyranoside und Melizitose möglich ist, weil beide Reaktionen nur bei NCYC Sc47-Isolaten positiv waren (siehe Abbildung 12). Die Verwertungsschemata der Isolate von CNCM I-1077, CNCM I-1079 und MUCL 39885 wiesen dagegen bereits im Vortest keine Muster auf, die sich zur Stammdifferenzierung eigneten. So zeigten Isolate des gleichen Stammes keine einheitlichen Verwertungsmuster, was keine Zuordnung eines Isolates zu einem bestimmten probiotischen Stamm möglich machte. Es wurde daher auf die Untersuchung einer größeren Isolatanzahl von CNCM I-1077, CNCM I-1079 und MUCL 39885 verzichtet.

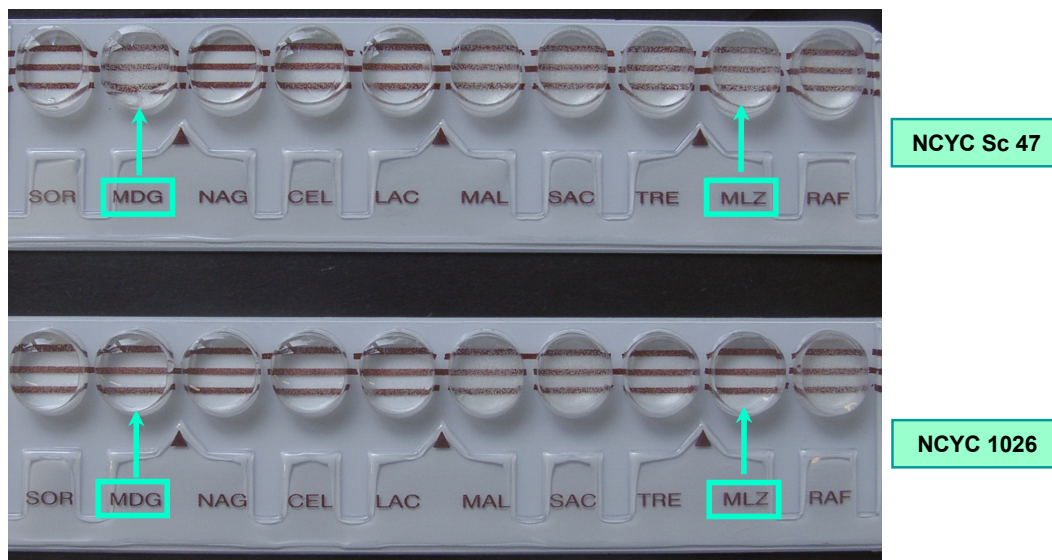


Abbildung 12: Ausschnitt der API-Teststreifen der NCYC-Stämme Sc47 und 1026 nach 48 h Bebrütung

Im Test zeigten jedoch je drei der 11 untersuchten Isolate von NCYC 1026 abweichende Ergebnisse, weil sie eindeutig beide Substrate – Methyl- α -D-Glucopyranoside und Melizitose – verstoffwechseln konnten. Dies bestätigte auch eine unabhängige Wiederholung des Versuchs.

Die Anwendung des API 20C AUX-Systems ist somit nicht als Referenzmethode zur Stammdifferenzierung von probiotischen *S. cerevisiae* geeignet. Keiner der probiotischen Futtermittelzusätze wies ein tatsächlich stammspezifisches unterscheidbares Verwertungsschema der enthaltenen Substrate auf.

Einsatz molekularbiologischer Methoden

Entsprechend dem derzeitigen Kenntnisstand sind Kombinationen unterschiedlicher Stammtypisierungsverfahren zu bevorzugen, um verlässlichere Ergebnisse zu erzielen. Daher wurde neben einer dHPLC-Analyse auch eine δ -PCR-Analyse an einem Isolatset probiotischer und ubiquitärer *S. cerevisiae* (Tabelle 8) durchgeführt. Basierend auf der Hierarchischen Clusteranalyse der Spektren wurden für jeden Stamm repräsentative Isolate ausgewählt.

Tabelle 8: Stammübersicht zur molekularbiologischen Stammtypisierung

	<i>S. cerevisiae</i> Stämme	Anzahl der Isolate insgesamt	Anzahl der Isolate in der dHPLC- Analyse	Anzahl der Isolate in der δ -PCR-Analyse
	CNCM I - 1077	23	7	4
	CNCM I – 1079	19	7	4
	MUCL 39885	18	10	9
	NCYC 1026	28	9	3
	NCYC Sc47	16	10	3
Summe	5 probiotische Stämme	104	43	23
	ubiquitäre Stämme	67	20	3
Gesamtsumme		171	63	26

DHPLC

Insgesamt wurden 63 *S. cerevisiae*-Isolate, davon 43 probiotische und 20 ubiquitäre Isolate (Tabelle 8), mittels dHPLC im unabhängigen Doppelansatz untersucht. Die resultierenden Peakprofile sind in Abbildung 13-A und -B dargestellt und zeigen deutliche Unterschiede zwischen probiotischen und ubiquitären Isolaten. Im Gegensatz zu den ubiquitären Isolaten, die eine Vielzahl an Peaks aufweisen, sind die Peakprofile der probiotischen Isolate durch eine geringe Anzahl an Peaks gekennzeichnet. Die Peakprofile waren in beiden unabhängigen Experimenten für jedes Isolat reproduzierbar.

Zwischen den probiotischen Isolaten ergaben sich unterschiedliche Peakprofile, die für alle Isolate des gleichen probiotischen Stammes reproduzierbar identisch waren. Somit ist die Zuordnung der probiotischen Isolate zu den einzelnen Futtermittelzusatzstoffen basierend auf den dHPLC-Profilen möglich. Lediglich die beiden probiotischen NCYC-Stämme wiesen sehr ähnliche Peakprofile auf, die keine Unterscheidung zwischen NCYC 1026- und NCYC Sc47-Isolaten zuließen. Schwach erkennbare Nebenpeaks nach 4,5 und 5,5 Minuten (Abbildung 13-A) wurden nicht für alle untersuchten Isolate des jeweiligen Stammes erhalten. Dieses Ergebnis entspricht einer früheren Studie zur Stammdifferenzierung probiotischer Futtermittelzusätze, in welcher die Unterscheidung zwischen den beiden NCYC-Stämmen ebenfalls nicht realisiert werden konnte (LEUSCHNER et al. 2004).

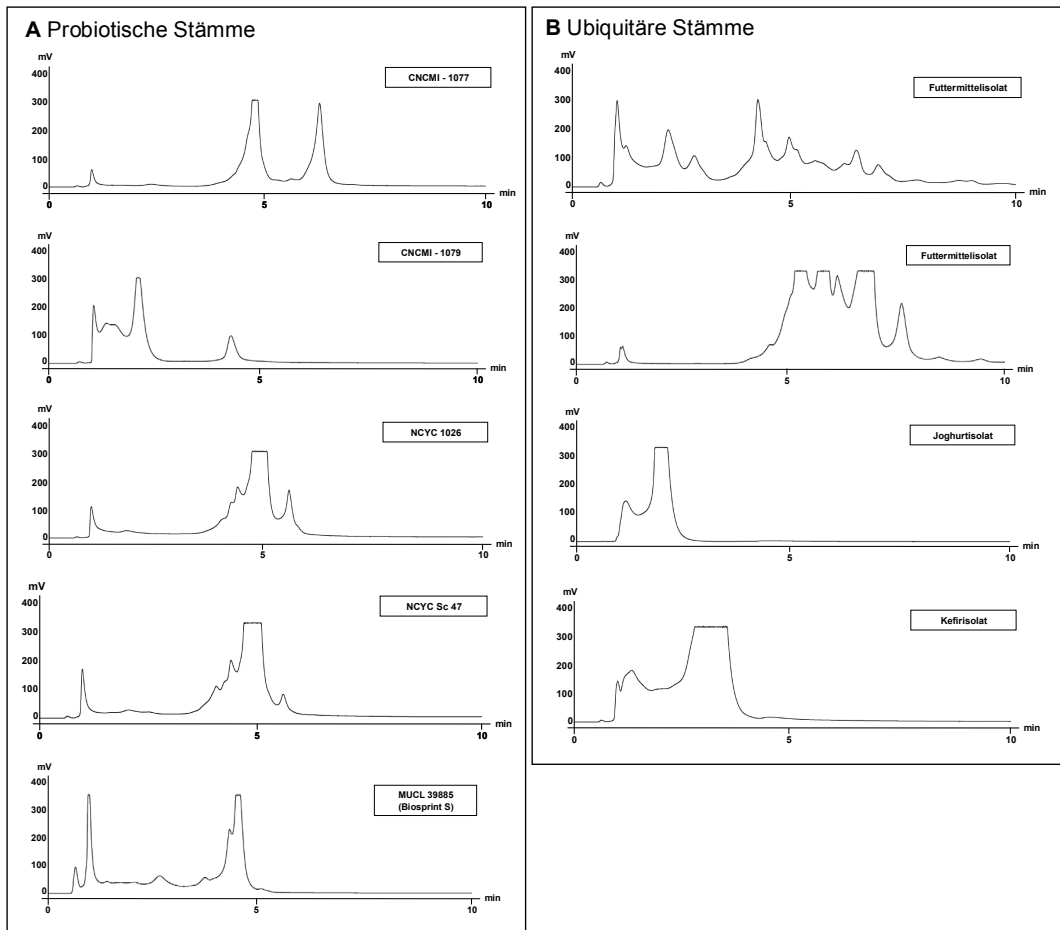


Abbildung 13: DHPLC Peakprofile von probiotischen und ubiquitären *S. cerevisiae*-Isolaten

Teil A enthält die Profile der fünf zugelassenen Futtermittelzusätze; in Teil B sind die Profile von vier ubiquitären Isolat aus Futtermitteln (Zuckerrübenpressschnitzel und Flüssigfuttermittel) sowie aus unterschiedlichen Molkereiprodukten dargestellt.

δ-PCR

Die Anwendung von δ-PCR zur Stammdifferenzierung wurde schon mehrfach beschrieben (DELLANOS et al.2006, LEGRAS & KARST 2003, NESS et al. 1993) und auch Studien zur Unterscheidung von probiotischen Futtermittelzusätzen mittels modifizierter δ-Primer wurden bereits veröffentlicht (LEUSCHNER et al. 2004). Insgesamt wurden 26 *S. cerevisiae*-Isolate mit dieser Methode untersucht (Tabelle 8). Abbildung 14 zeigt das Ergebnis der δ-PCR, das mit dem Ergebnis der zuvor durchgeführten dHPLC-Analyse übereinstimmt. Auch hier lassen sich vier unterschiedliche probiotische Muster (Bahn 1-10) erkennen, die sich aufgrund geringerer Fragmentzahl deutlich von den ubiquitären Isolaten (Bahn 11-19) unterscheiden. Obwohl das Bandenmuster der δ-PCR vergleichsweise weniger klar erkennbar ist als die deutlichen Peakprofile der dHPLC-Analyse, waren die Anzahl und Größe der erhaltenen Fragmente reproduzierbar in zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Dies ermöglichte die Zuordnung der Isolate zu einem probiotischen Futtermittelzusatz anhand des Fragmentmusters und folglich deren Unterscheidung. Einzig Isolate der beiden NCYC-Stämme ergaben wiederum gleiche Muster, was keine Differenzierung zwischen NCYC 1026- und NCYC Sc47-Isolaten auch mittels δ-PCR-Analyse ermöglichte.

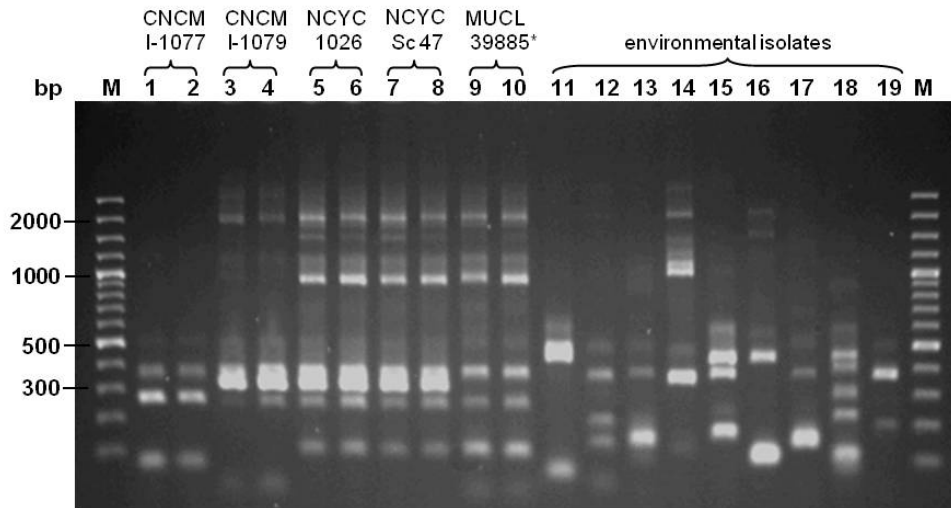


Abbildung 14: Fragmentmuster der δ -PCR-Analyse der fünf zugelassenen Probiotika (Bahn 1-10) und von neun ubiquitären *S. cerevisiae*-Isolaten (Bahn 11-19)

Für jeden probiotischen Stamm sind zwei unabhängige Isolate dargestellt. Das hier dargestellte MUCL 39885 Isolat stammt aus dem Präparat Biosprint S. Die ubiquitären Stämme wurden aus Lebensmitteln, Getränken, Zuckerrüben-Pressschnitzel und Flüssigfuttermittel isoliert (nach BÜCHL et al. 2010). M: Marker (GeneRuler™ 100 bp Plus DNS Ladder, Fermentas)

3.2.2 Etablierung des künstlichen neuronalen Netzes

Training und struktureller Aufbau des KNN

Zur Etablierung des Systems wurden 171 Isolate probiotischer und ubiquitärer *S. cerevisiae*-Stämme verwendet. Als Trainingsstämme wurden 108 Isolate eingesetzt, die verbleibenden 63 Isolate wurden zur Validierung des Systems genutzt (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Stammübersicht zur Etablierung und Validierung des KNN

	<i>S. cerevisiae</i> Stämme	Anzahl der Isolate insgesamt	Anzahl der Isolate im Training	Anzahl der Isolate in der Validierung
	CNCM I - 1077	23	12	11
	CNCM I – 1079	19	13	6
	MUCL 39885	18	12	6
	NCYC 1026	28	14	14
	NCYC Sc47	16	12	4
Summe	5 probiotische Stämme	104	63	41
	ubiquitäre Stämme	67	45	22
Gesamtsumme		171	108	63

Im Trainingsprozess des KNN wurden die Wellenzahlen mit dem größtmöglichen Differenzierungspotenzial ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass zur Unterscheidung zwischen probiotischen und ubiquitären Stämmen Wellenzahlen zwischen 750 cm^{-1} und 900 cm^{-1} genutzt wurden (Subnetz Ebene 1). Dieser Fingerprintbereich zeichnet sich durch schwache, aber sehr charakteristische Peaks der aromatischen Ringe einzelner Aminosäuren und Nukleotide aus. Für die Differenzierung der Probiotika waren dagegen Wellenzahlen von 1.050 cm^{-1} bis 1.490 cm^{-1} entscheidend, die spektrale Informationen über mehrere Zellbestandteile wie Polysaccharide, Fettsäuren und Proteine enthalten.

Der strukturelle Aufbau des KNN basiert auf dem primären Ziel - der Differenzierung probiotischer und ubiquitärer *S. cerevisiae*-Stämme, aber auch auf den Ergebnissen der dHPLC- und δ -PCR-Analysen. Es wurden daher zwei Subnetze trainiert und zu einem Gesamtnetz mit zwei aufeinander folgenden Ebenen verbunden (Abbildung 15).

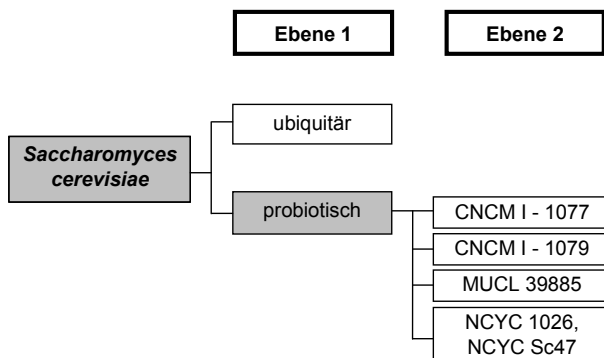


Abbildung 15: Hierarchische Struktur des KNN zur Differenzierung probiotischer und ubiquitärer *S. cerevisiae*-Stämme
Das System setzt sich aus einem Toplevelnetz für die erste Ebene und einem Subnetz für die zweite Ebene zusammen. Beide Einzelnetze sind grau markiert (nach BÜCHL et al. 2010).

Auf der ersten Ebene findet eine Unterscheidung zwischen probiotischen und ubiquitären *S. cerevisiae* statt. Die weiterführende Differenzierung zwischen den probiotischen Stämmen erfolgt auf der zweiten Ebene, wobei die beiden NCYC-Stämme eine gemeinsame Klasse bilden, da keine Differenzierung zwischen NCYC Sc47 und NCYC 1026 mit Hilfe der Referenzmethoden möglich war.

Validierung des KNN

Analog zur Validierung unter Kapitel 3.1.2 erfolgte eine interne und externe Validierung des KNN. Für die interne Validierung wurden 108 Spektren verwendet, von denen 107 (99,1 %) richtig zugeordnet wurden (Abbildung 16). Lediglich ein Spektrum eines ubiquitären Stammes konnte keiner der gegebenen Klassen zugeordnet werden, somit wurde kein Spektrum falsch identifiziert.

Die externe Validierung wurde mit 965 Spektren von 63 Isolaten, die nicht im Training enthalten waren, durchgeführt (Tabelle 9). Für die Differenzierung der probiotischen und ubiquitären Stämme ergibt sich auf Ebene 1 eine Erfolgsquote von 98,2 % korrekter Zuordnungen. Besonders hervorzuheben ist, dass 99,9 % aller Spektren der enthaltenen probiotischen Stämme als solche erkannt und korrekt klassifiziert wurden (Abbildung 16). Diese Klassifizierungsrate ist nahezu identisch zu der der internen Validierung und unterstreicht dadurch die Stabilität des KNN in Bezug auf die Unterscheidung zwischen ubiquitären und probiotischen Isolaten. Eine zusätzliche Bestätigung stellen die Erfolgsquoten der ubiquitären Isolate dar, die in beiden Validierungen ebenfalls annähernd gleich waren. Die externe Validierung umfasste nicht nur ubiquitäre *S. cerevisiae* aus Futtermitteln, sondern enthielt auch Stämme aus verschiedensten Habitaten (diverse Lebensmittel-, Getränke- und Umweltisolate). Vor diesem Hintergrund zeigt die korrekte Klassifizierung von 94,0 % der Spektren ubiquitärer Isolate in der externen Validierung, dass die phänotypische Varianz ubiquitärer *S. cerevisiae* noch nicht ausreichend abgedeckt ist. Zur Verbesserung dieses KNN Bereiches müssen weitere ubiquitäre Isolate integriert werden.

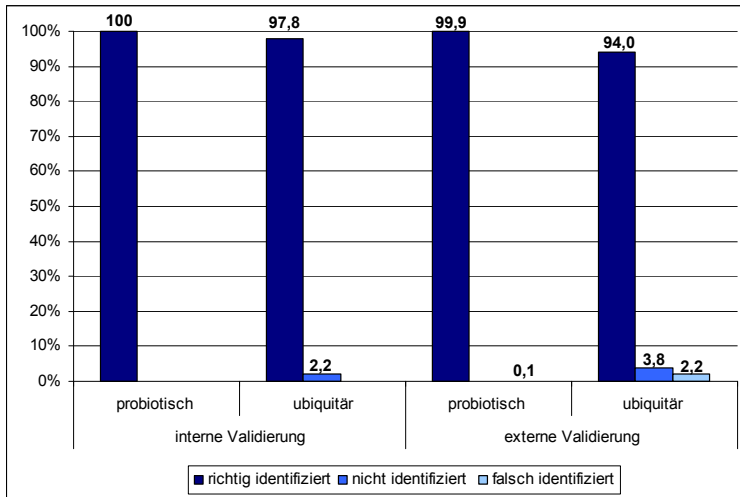


Abbildung 16: Ergebnisse der internen und externen Validierung der ersten Ebene des KNN zur Differenzierung zwischen ubiquitären und probiotischen *S. cerevisiae*

Die zweite Ebene des KNN realisiert die Differenzierung zwischen vier Probiotika-Klassen (Abbildung 15). Für diese Ebene wurde in der externen Validierung eine Erfolgsquote von annähernd 100 % korrekter Klassifizierung für Spektren der Stämme CNCM I-1077 und den beiden NCYC Stämmen, die aufgrund sehr großer Ähnlichkeit in einer Klasse zusammengefasst wurden, erzielt (Abbildung 17).

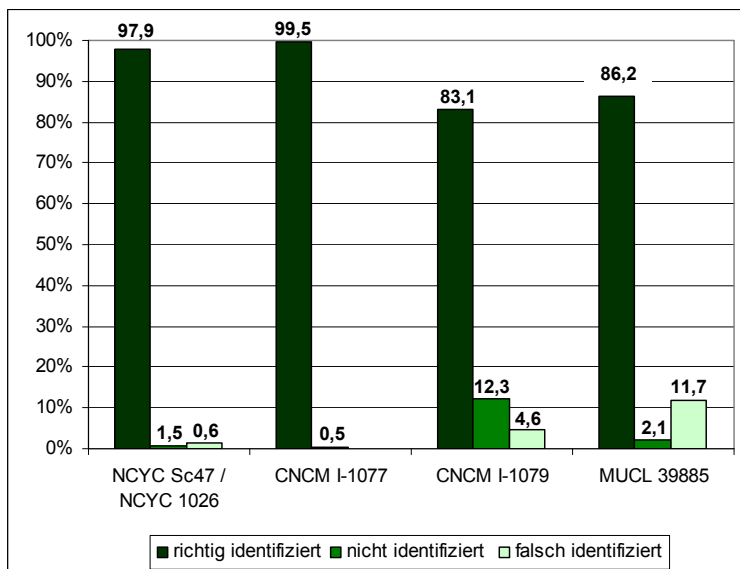


Abbildung 17: Ergebnisse der externen Validierung der zweiten Ebene des KNN zur Differenzierung zwischen probiotischen *S. cerevisiae*

Die Validierungsspektren der CNCM I-1079- und MUCL 39885-Isolate wurden dagegen nur zu 83 % bzw. 86 % der richtigen Klasse zugeordnet. Für beide Probiotika waren weniger Isolate verfügbar als für die anderen drei Stämme (Tabelle 8). Weil sich MUCL 39885-Isolate durch einen sehr hohen Grad an Heterogenität auszeichnen, der im KNN bislang nicht ausreichend durch die Trainingsspektren repräsentiert wurde, führte die geringe Isolatanzahl zu einer vergleichsweise hohen Fehlklassifizierung. Bei Spektren der CNCM I-1079-Isolate wurde hingegen eine höhere Rate an nicht identifizierten Spektren in der externen Validierung erreicht. Die Ergänzung des KNN durch eine zusätzliche Ebene, in der die Probiotika CNCM I-1079 und MUCL 39885 in einer Klasse zusammengefasst werden und erst auf einer dritten Ebene unterschieden werden, wurde bereits getestet (Daten nicht gezeigt). Es konnte dadurch allerdings keine Verbesserung erzielt werden. Bei beiden Probiotika-Klassen ist somit eine Verbesserung durch Erhöhung der Isolat- und damit Spektrenanzahl im Training zu erwarten.

Für das gesamte KNN zur Differenzierung zwischen ubiquitären und probiotischen *S. cerevisiae* lag die Erfolgsquote korrekt zugeordneter Spektren der externen Validierung bei 94,9 %. Es wurden 2,7 % der Spektren falsch zugeordnet und für die restlichen 2,4 % der Spektren konnte keine Zuordnung zu den gegebenen Klassen getroffen werden.

4 Zusammenfassung

Für eine fundierte mikrobiologische Beurteilung von Futtermitteln ist sowohl eine Quantifizierung als zuweilen auch eine Speziesbestimmung der kultivierten Hefeflora von entscheidender Bedeutung. Einige Hefegattungen spielen eine große Rolle beim Abbau von leichtverdaulichen Kohlenhydraten und sind somit am Verderb des Produktes maßgeblich beteiligt. Andere Spezies gelten in der Human- und Veterinärmedizin als opportunistisch pathogen und können bei massivem Auftreten zu gesundheitlichen Problemen in Tierbeständen führen. Zudem können *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme als probiotische Zusatzstoffe in Futtermitteln enthalten sein, die mit biochemischen Tests nicht eindeutig von ubiquitär auftretenden *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen zu unterscheiden sind. Bei mykologischen Befunden von hohen Hefegehalten ($> 10^5$ KBE/g Futtermittel) mit einer kulturmorphologisch augenscheinlichen Monoflora ist eine Speziesdiagnose in jedem Falle indiziert. Kommerzielle Testsysteme, wie API 20 C Aux sind klinisch orientiert und liefert häufig keine ausreichend gute Speziesdiagnose in der Futtermittelmikrobiologie. Molekularbiologische Verfahren sind allerdings im Routinebetrieb zu teuer und zu zeitintensiv für derlei Aussagen. Die FT-IR-Spektroskopie seinerseits ist ein zeitsparendes kostengünstiges Verfahren, das zudem exakte Ergebnisse auf Spezies- und Stammesebene zu liefern vermag.

Im Rahmen des hier vorgestellten Forschungsprojektes wurde mit FT-IR-Spektroskopie in Kombination mit künstlichen neuronalen Netzen ein System aufgebaut, das die Grundlage zur Verbesserung der Hefediagnostik darstellt.

Die Erweiterung der bestehenden Stammsammlung der Abteilung Mikrobiologie des ZIEL durch Futtermittelisolate ermöglichte die Etablierung eines künstlichen neuronalen Netzes, welches sich zur Differenzierung von nahverwandten Arten der Gattungen *Issatchenkia* und *Pichia* sehr gut eignet, die in Futtermitteln pflanzlichen Ursprungs sehr häufig zu finden sind. Grundlage war die eindeutige Identifizierung der Referenzstämme, welche mittels 26S rDNS Sequenzierung erfolgte. Die sehr hohe Erfolgsquote von 98,6 % korrekt identifizierten Spektren in der externen Validierung zeigt, dass das KNN in der Praxis erfolgreich eingesetzt werden kann.

Zur Differenzierung von probiotischen und ubiquitären *S. cerevisiae* Stämmen wurden zunächst in der aktuellen Literatur beschriebene Methoden zur Stammtypisierung hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit geprüft. Als geeignet bezüglich Sensitivität und Reproduzierbarkeit erwiesen sich die δ -PCR-Methode nach NESS (1993) sowie die denaturierende HPLC nach BÜCHL et al. (2008). Beide Methoden lieferten übereinstimmende in unabhängigen Wiederholungsexperimenten reproduzierbare stammspezifische Muster. Darauf basierend konnte ein KNN zur Differenzierung probiotischer und ubiquitärer *S. cerevisiae*-Stämme etabliert werden, das zudem eine Unterscheidung zwischen den probiotischen Futtermittelzusätzen ermöglicht. Dies zeigt das sehr gute Ergebnis der externen Validierung, im Zuge derer 98,2 % der Spektren der richtigen Klasse probiotischer bzw. ubiquitärer *S. cerevisiae* zugeordnet wurden und die korrekte Differenzierungsquote innerhalb der probiotischen Isolate 94,9 % war.

Durch die umfangreiche Stammsammlung der Abteilung Mikrobiologie des ZIEL, die neben einer Vielzahl an Stämmen aus unterschiedlichen Lebensmitteln und Umwelthabitaten um Hefeisolate aus Futtermitteln erweitert wurde, konnte die FT-IR-Technologie für den Anwendungsbereich der Futtermittelmikrobiologie erschlossen werden. Unter Anwendung der FT-IR-Spektroskopie und künstlicher neuronaler Netze konnte ein zuverlässiges System zur eindeutigen Identifizierung der in Futtermitteln vorkommenden Hefearten etabliert werden. Darüber hinaus wurde aufgrund der hohen Sensitivität, die durch die Kombination dieser Methoden erreicht wurde, die Differenzierung zwischen unterschiedlichen probiotischen und ubiquitären *S. cerevisiae* Stämmen realisiert.

Literaturverzeichnis

- ANDRADE, M.J.; M. RODRIGUEZ; B. SANCHEZ; E. ARANDA & J.J. CORDOBA (2006): DNS typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. *Int J Food Microbiol* 107: 48-58.
- AMIEL, C.; L. MARIEY; M.C.CURK-DAUBIE ; P. PICHON & J. TRAVERT (2000): Potentiality of Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) for discrimination and identification of dairy lactic acid bacteria. *Lait* 80: 445-459.
- BÜCHL, N.R.; M. WENNING; H. SEILER; H. MIETKE-HOFMANN & S. SCHERER (2008): Reliable identification of closely related *Issatchenkia* and *Pichia* species using artificial neural network analysis of Fourier-transform infrared spectra. *Yeast* 11: 787-498.
- BÜCHL N.R.; M. HUTZLER; H. MIETKE-HOFMANN; M. WENNING; S. SCHERER (2010): Differentiation of probiotic and environmental *Saccharomyces cerevisiae* strains in animal feed. *J Appl Microbiol* 109:783-791.
- DEAK, T.; J. CHEN & L.R. BEUCHAT (2000): Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. *Appl Environ Microbiol* 66: 4340-4344.
- DE LLANOS, R.; A. QUEROL; J. PEMAN; M. GOBERNADO & M.T. FERNANDEZ-ESPINAR (2006): Food and probiotic strains from the *Saccharomyces cerevisiae* species as a possible origin of human systemic infections. *Int J Food Microbiol* 110:286-90.
- EFSA (2008): Technical Guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed (FEEDAP) on the Compatibility of zootechnical microbial additives with other additives showing antimicrobial activity. *The EFSA Journal* 658:1-5.
- ELAD, D.; N.Y. SHIPGEL; M. WINKLER; I. KLINGER; V. FUCHS; A. SARAN AND D. FAINGOLD (1995): Feed contamination with *Candida krusei* as a probable source of mycotic mastitis in dairy cows. *JAVMA* 207:620-622.
- ERCOLINI, D.; G. FRISSE; G. MAURIELLO; F. SALVATORE & S. COPPOLA. (2008): Microbial diversity in natural whey cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese. *Int J Food Microbiol* 124:164-70.
- ESTEVE-ZARZOSO, B.; C. BELLOCH; F. URUBURU & A. QUEROL (1999): Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol* 49: 329-337.
- FELL, J.W.; T. BOEKHOUT; A. FONSECA; G. SCORZETTI & A. STATZELL-TALLMAN (2000): Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNS D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evolution Microbiol* 50: 1351-1371.
- FRUEH, F.W. AND M. NOYER-WEIDNER (2003): The use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: impact for diagnostics and pharmacogenetics. *Clin Chem Lab Med* 41:452-61.
- FULLER, R. (1989): Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66:365-378.
- GOLDENBERG, O.; S. HERRMANN; T. ADAM; G. MARJORAM; G. HONG; U.B. GOBEL AND B. GRAF (2005): Use of denaturing high-performance liquid chromatography for rapid detection and identification of seven *Candida* species. *J Clin Microbiol* 43:5912-5915.
- GOLDENBERG, O.; S. HERRMANN; G. MARJORAM; M. NOYER-WEIDNER; G. HONG; S. BERESWILL & U. B. GOBEL (2007): Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography. *J Microbiol Methods* 68:94-105.
- GÜNZLER, H. & M. HEISE (1994): IR-Spektroskopie - Eine Einführung, 3. Auflage ed. VCH, Weinheim.
- HAMAL, P. & KOUKALOVÁ, D. (2010): Yeasts in domestic animals:species identification and susceptibility to antifungals. *Klin Microbiol Infekc Lek.* 16(1), 4-9
- HELM, D.; H. LABISCHINSKI; G. SCHALLEHN & D. NAUMANN (1991): Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Gen Microbiol* 137: 69-79.
- HURLEY, R.; J. DE LOUVOIS & M. MULHALL (1989): Yeasts as Human and Animal Pathogens. In *The Yeasts*, Rose AH, Rose JS. (eds). Academic Press. 207-277.
- HUTZLER, M. (2009): Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von getränkerelevanten Hefen. Diss. Technische Universität München, Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II, 2009
- JURY, F.; M. AL-MAHROUS; M. APOSTOLOU; S. SANDIFORD; A. FOX; W. OLLIER & M. UPTON (2006): Rapid cost-effective subtyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by denaturing HPLC. *J Med Microbiol* 55:1053-60.
- KANO, R.; K. KONISHI; K. NAKATA; K. SATO; S. KOMATSU; M. NOMURA; K. OKUZUMI & A. HASEGAWA (2001): Isolation of *Candida krusei* from a case of bovine bronchopneumonia in a one-year-old heifer. *The Veterinary Record* 148: 636-640.
- KÜMMERLE, M.; S. SCHERER & H. SEILER (1998): Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* 64: 2207-2214.

- KURTZMAN, C.P. & J.W. FELL (1998): *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Elsevier Science B.V.: Amsterdam, The Netherlands.
- KURTZMAN, C.P. & C.J. ROBNETT (1998): Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNS partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331-371.
- KURTZMAN, C.P. & C.J. ROBNETT (2003): Phylogenetic relationships among yeasts of the '*Saccharomyces complex*' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res* 3: 417-432.
- LEGRAS, J.L.; & F. KARST (2003): Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol Lett* 221:249-55.
- LEUSCHNER, R.G.; J. BEW; P. FOURCASSIER & G. BERTIN (2004): Validation of the official control method based on Polymerase Chain Reaction (PCR) for identification of authorised probiotic yeast in animal feed. *Syst Appl Microbiol* 27:492-500.
- MAQUELIN, K, C. KIRSCHNER; L.P. CHOO-SMITH; N.A. NGO-THI; T. VAN VREESWIJK; M. STAMMLER; H.P. ENDTZ; H.A. BRUINING; D. NAUMANN & G.J. PUPPELS (2003): Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *J Clin Microbiol* 41: 324-329.
- MIETKE-HOFMANN, H., KRETZSCHMAR, A., GAREIS, M., BUCHER, E. (2008): Mikrobiologische Charakterisierung von Malzkeimen. *Schriftenreihe des LfULG* 31/2008
- MIETKE, H.; BEER, W., SCHLEIF, J., SCHABERT, G., REISSBRODT, R. (2010): Differentiation between probiotic and wild-type *Bacillus cereus* isolates by antibiotic susceptibility test and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). *Int.J.Food Microb.* 140, 57-60
- NAUMANN, D.; D. HELM & H. LABISCHINSKI (1991): Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* 351: 81-82.
- NESS, F.; F. LAVALLÉE; D. DUBOURDIEU; M. AIGLE & L. DULAU (1993): Identification of Yeast Strains Using the Polymerase Chain Reaction. *J Sci Food Agric* 62:89-94.
- OBERREUTER, H.; H. SEILER & S. SCHERER (2002): Identification of coryneform bacteria and related taxa by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 91-100.
- PFALLER, M.A.; D.J. DIEKEMA; D.L. GIBBS; V.A. NEWELL; E. NAGY; S. DOBIASOVA; M. RINALDI; R. BARTON; A. VESELOV & THE GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP (2008): *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol* 46: 515-521.
- PRILLINGER, H.; O. MOLNAR; F. ELISKASES-LECHNER & K. LOPANDIC (1999): Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. *Antonie van Leeuwenhoek* 75: 267-283.
- REBUFFO-SCHEER, C.A.; J. SCHMITT & S. SCHERER (2007): Differentiation of *Listeria monocytogenes* serovars by using artificial neural network analysis of Fourier-transformed infrared spectra. *Appl Environ Microbiol* 73:1036-40.
- REBUFFO, C.A.; J. SCHMITT; M. WENNING; F. VON STETTEN & S. SCHERER (2006): Reliable and rapid identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* 72:994-1000.
- SANDT, C.; G.D. SOCKALINGUM; D. AUBERT; H. LEPAN; C. LEPOUSE; M. JAUSSAUD; A. LEON; J.M. PINON; M. MANFAIT & D. TOUBAS (2003): Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units. *J Clin Microbiol* 41: 954-959.
- SAVITZKY, A. & M.J.E. GOLAY (1964): Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal Chem* 36: 1627-1639.
- SCHLEIF, J. & D. MIETKE, H. (2003): Charakterisierung und Identifizierung von *Bacillus cereus*-Isolaten aus Futtermitteln und Lebensmitteln mittels Fourier-Transform-Infrarot (FT-IR) Spektroskopie. *Schriftenreihe der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft Heft 3- 8. Jahrgang 2003*
- Identifizierung von *Bacillus cereus*. *Schriftenreihe der LfL Heft 3 - 8. Jahrgang 2003*
- SCHMITT, J.; & T. UDELHOVEN (2001): Use of Artificial Neural Networks in Biomedical Diagnosis. In *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*, Gremlich HU, Yan B. (eds). Marcel Dekker, Inc.: New York, USA; 379-419.
- SCORZETTI, G.; J.W. FELL; A. FONSECA & A. STATZELL-TALLMAN (2002): Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNS regions. *FEMS Yeast Res* 2: 495-517.
- SEKER, E. (2010): Identification of *Candida* species isolated from bovine mastitic milk and their haemolytic activity in Western Turkey. *Mycopathologia* 169 (4): 303-308
- SIMON, O.; A. JADAMUS & W. VAHJEN (2001): Probiotic feed additives - effectiveness and expected modes of action. *Journal of Animal and Feed Sciences* 10:51-67.
- THOMPSON, J.D.; T.J. GIBSON; F. PLEWNIAK; F. JEANMOUGIN & D.G. HIGGINS (1997): The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nuclc Acids Res* 25: 4876-4882.

- TOUBAS, D.; M. ESSENDOUBI; I. ADT; J.M. PINON; M. MANFAIT & G.D. SOCKALINGUM (2007): FTIR spectroscopy in medical mycology: applications to the differentiation and typing of *Candida*. *Anal Bioanal Chem* 387: 1729-1737.
- UDELHOVEN, T.; D. NAUMANN & J. SCHMITT (2000): Development of a hierarchical classification system with artificial neural networks and FT-IR spectra for the identification of bacteria. *Appl Spec* 54: 1471-1479.
- UDELHOVEN, T.; M. NOVOZHILOV & J. SCHMITT (2003): The NeuroDeveloper: a tool for modular neural classification of spectroscopic data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 66:219-226.
- VAN DE PEER, Y. & R. DE WACHTER (1997): Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites. *Comput Appl Biosci* 13: 227-230.
- WAWRON, W.; BOCHNIAZR, M. & SZCZUBIAŁ, M. (2011): Enzymatic activity of yeasts isolated from the inflamed mammary secretion in dairy cows. *Pol J Vet Sci.* 14(1): 65-68
- WENNING, M.; H. SEILER & S. SCHERER (2002): Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. *Appl Environ Microbiol* 68: 4717-4721.
- WENNING, M.; S. SCHERER & D. NAUMANN (2008): Infrared spectroscopy in the identification of microorganisms. In *Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis*, Diem M.; P. Griffith and J.M. Chalmers (eds). John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK; 71-96.
- WENNING M.; N.R. BÜCHL & S. SCHERER (2010): Species and strain identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks. *Journal of Biophotonics* 3(8-9):493-505.
- WENNING, M., SCHERER, S., MIETKE-HOFMANN, H. (2011): Differenzierung probiotischer Bakterien; Schriftenreihe des LfULG, Heft 26/2011

Herausgeber:

Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie
Pillnitzer Platz 3, 01326 Dresden
Telefon: + 49 351 2612-0
Telefax: + 49 351 2612-1099
E-Mail: lfulg@smul.sachsen.de
www.smul.sachsen.de/lfulg

Autoren:

Dr. Nicole R. Büchl, Dr. Mareike Wenning, Prof. Dr. Siegfried Scherer,
Technische Universität München, Zentralinstitut für Ernährungs- und
Lebensmittelforschung, Abteilung Mikrobiologie
Ansprechpartner: Dr. Nicole Büchl
Telefon: + 49 8161 717570
Telefax: + 49 8161 774492
E-Mail: ZIEL-Mikrobiologie@wzw.tum.de
Dr. Henriette Mietke-Hofmann
Staatliche Betriebsgesellschaft für Umwelt und Landwirtschaft, Geschäftsbereich
Labore Landwirtschaft

Redaktion:

Dr. Henriette Mietke-Hofmann
Staatliche Betriebsgesellschaft für Umwelt und Landwirtschaft
Telefon: + 49 341 9174-248
Telefax: + 49 341 9174-211
E-Mail: henriette.mietke@smul.sachsen.de

Redaktionsschluss:

29.07.2011

ISSN:

1867-2868

Hinweis:

Die Broschüre steht nicht als Printmedium zur Verfügung, kann aber als PDF unter
<http://www.smul.sachsen.de/lfulg/6447.htm> heruntergeladen werden.

Verteilerhinweis:

Diese Informationsschrift wird von der Sächsischen Staatsregierung im Rahmen ihrer
verfassungsmäßigen Verpflichtung zur Information der Öffentlichkeit herausgegeben.
Sie darf weder von Parteien noch von deren Kandidaten oder Helfern im Zeitraum
von sechs Monaten vor einer Wahl zum Zwecke der Wahlwerbung verwendet
werden. Dies gilt für alle Wahlen.

Missbräuchlich ist insbesondere die Verteilung auf Wahlveranstaltungen, an Infor-
mationsständen der Parteien sowie das Einlegen, Aufdrucken oder Aufkleben
parteipolitischer Informationen oder Werbemittel. Untersagt ist auch die Weitergabe
an Dritte zur Verwendung bei der Wahlwerbung. Auch ohne zeitlichen Bezug zu einer
bevorstehenden Wahl darf die vorliegende Druckschrift nicht so verwendet werden,
dass dies als Parteinarbeit des Herausgebers zugunsten einzelner politischer
Gruppen verstanden werden könnte.

Diese Beschränkungen gelten unabhängig vom Vertriebsweg, also unabhängig
davon, auf welchem Wege und in welcher Anzahl diese Informationsschrift dem
Empfänger zugegangen ist. Erlaubt ist jedoch den Parteien, diese Informationsschrift
zur Unterrichtung ihrer Mitglieder zu verwenden.