

ABTEILUNG MIKROBIOLOGIE  
ZENTRALINSTITUT FÜR ERNÄHRUNGS- UND LEBENSMITTELFORSCHUNG WEIHENSTEPHAN  
TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**Identifizierung von Mikroorganismen aus  
Lebensmitteln durch Fourier-transformierte  
Infrarot (FTIR)-Mikrospektroskopie**

MAREIKE WENNING

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Haushalts- und Ernährungswissenschaften  
(Dr. oec. troph.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender : Univ.- Prof. Dr. U. Kulozik  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.- Prof. Dr. S. Scherer  
2. Univ.- Prof. Dr. G. Cerny

Die Dissertation wurde am 10.08.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 07.10.2004 angenommen.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits vorab veröffentlicht:

**Wenning, M., H. Seiler und S. Scherer.** 2002. Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:** 4717-21.

# Danksagung

Diese Dissertation wurde in der Abteilung Mikrobiologie des ZIEL Weihenstephan an der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. Siegfried Scherer angefertigt. Herrn Scherer möchte ich für das in mich gesetzte Vertrauen und die gute Betreuung meiner Arbeit sehr herzlich danken.

Prof. Dr. Gerhard Cerny danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Die vorliegende Arbeit wurde zum großen Teil aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung (Bundesministerium für Wirtschaft und Arbeit / AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert.

Ein großes Dankeschön geht nach Berlin ans Robert Koch-Institut. Prof. Dr. Dieter Naumann und seine Mitarbeiterinnen Dr. Carolin Kirschner und Maren Stämmler haben mir die „Kontaktaufnahme“ zu meinem IR-Mikroskop zu Beginn meiner Arbeit sehr erleichtert. Auch Herr Alexander Piry von der Bruker Optik GmbH stand mir bei technischen Problemen immer hilfsbereit mit Rat und Tat zur Seite. Vielen Dank.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei meinem Arbeitsgruppenleiter Dr. Herbert Seiler bedanken, der mir über die FTIR-Spektroskopie hinaus die klassische Mikrobiologie nahe gebracht hat. Ein besonderer Dank geht an Andreas Bischof für seine tatkräftige Unterstützung im Labor. Der gesamten „FTIR-Laborcrew“ danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die stets gute Stimmung im Labor.

Ein sehr herzliches Dankeschön möchte ich an Stefanie Goerges, Cecilia Rebuffo und Dr. Simone Müller-Hellwig für all die hilfreichen Diskussionen, Anregungen und Korrekturen meines Manuskriptes richten. Allen Kollegen danke ich für die außerordentlich gute Arbeitsatmosphäre.

Von Herzen danke ich meinen Eltern und meinem Lebensgefährten Jörg Bräuer, mit denen ich während meiner Arbeit all meine Sorgen und Nöte, aber ebenso auch meine Freude teilen konnte und die mir eine großartige Unterstützung waren.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>VI</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>VIII</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>IX</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>XII</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>XIV</b>
<b>I. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1. Fourier-transformierte Infrarot (FTIR)-Spektroskopie</b>	<b>1</b>
1.1 Methodisches Prinzip	1
1.2 FTIR-Mikrospektroskopie	4
<b>2. Mikroorganismen</b>	<b>6</b>
2.1 Taxonomie	6
2.1.1 Hefen	7
2.1.2 Coryneforme Bakterien	10
2.1.3 Milchsäurebakterien	11
2.2 Vorkommen in Lebensmitteln	13
2.2.1 Hefen	13
2.2.2 Coryneforme Bakterien	15
2.2.3 Milchsäurebakterien	15
<b>3. Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>16</b>
<b>II. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
<b>1. Referenzstämme</b>	<b>17</b>
1.1 Stammhaltung	17
1.1.1 Verwendete Medien	17
1.1.2 Reaktivierung von Stämmen aus der Gefriertrocknung	18
1.1.3 Reaktivierung von Stämmen aus Glycerinstocks	19
1.2 Stammlagerung	19
<b>2. FTIR-Spektroskopie</b>	<b>20</b>
2.1 FTIR-Makrospektroskopie	20
2.1.1 Probenvorbereitung und Messung	20
2.1.2 Physiologische Tests zur Identifizierung von Milchsäurebakterien	20
2.1.3 Auswertung und Identifizierung der Spektren	23
2.2 FTIR-Mikrospektroskopie	25
2.2.1 Probenvorbereitung und Messung	25

---

2.2.2	Auswertung der Spektren	27
2.2.3	Erstellung der Datenbanken	27
2.2.4	Validierung der Datenbanken	28
<b>3.</b>	<b>16S rDNA-Sequenzierung</b>	<b>28</b>
<b>4.</b>	<b>Populationsanalysen</b>	<b>29</b>
4.1	Analyse der Oberflächenreifungsflora von Rotschmirekäse	29
4.2	Analyse einer undefinierten Starterkultur für Emmentaler Käse	30
<b>III.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>32</b>
<b>1.</b>	<b>Standardisierung der Methode</b>	<b>32</b>
1.1	Bestimmung der optimalen Koloniegröße	32
1.2	Einfluss der Irisblende auf die Messung	35
1.3	Einfluss der Luftfeuchte auf die Messung	36
<b>2.</b>	<b>Identifizierung von Mikroorganismen</b>	<b>39</b>
2.1	Hefen	39
2.1.1	Entwicklung und Bewertung der Datenbank	39
2.1.2	Typisierung von Hefen auf Stammniveau	43
2.2.	Coryneforme Bakterien	44
2.2.1	Kultivierung und Transferzeitpunkte	44
2.2.2	Entwicklung und Bewertung der Datenbank	46
2.3	Milchsäurebakterien	47
2.3.1	Kultivierung und Transferzeitpunkte	47
2.3.2	Entwicklung und Bewertung der Datenbank	49
<b>3.</b>	<b>Populationsanalysen mit FTIR-Mikrospektroskopie</b>	<b>53</b>
3.1	Analyse der Reifungsflora von Vorarlberger Bergkäse	53
3.2	Analyse der Reifungsflora von Appenzeller Käse	56
3.3	Analyse einer undefinierten Starterkultur für Emmentaler Käse	58
3.3.1	Analyse der Starterkultur	59
3.3.2	Analyse des Quarks vor dem Pressen	61
3.3.3	Analyse des Quarks nach dem Pressen	63
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>67</b>
<b>1.</b>	<b>Spektrqualität und Reproduzierbarkeit der FTIR-Messungen</b>	<b>67</b>
1.1	Einfluss der Koloniegröße	67
1.2	Einfluss der Irisblende	68
1.3	Einfluss der Luftfeuchte	68
1.4	Einfluss der Kolonieheterogenität	69
<b>2.</b>	<b>Identifizierung von Mikroorganismen</b>	<b>69</b>

---

2.1	Hefen	70
2.1.1	Identifizierung von Hefen mit FTIR-Spektroskopie	70
2.1.2	Identifizierung von Hefen mit physiologischen und molekularbiologischen Methoden	73
2.2	Coryneforme Bakterien	75
2.2.1	Identifizierung coryneformer Bakterien mit FTIR-Spektroskopie	75
2.2.2	Identifizierung coryneformer Bakterien mit physiologischen und molekularbiologischen Methoden	77
2.3	Milchsäurebakterien	79
2.3.1	Identifizierung von Milchsäurebakterien mit FTIR-Spektroskopie	79
2.3.2	Identifizierung von Milchsäurebakterien mit physiologischen und molekularbiologischen Methoden	82
2.4	Optimierung der Identifizierung	83
<b>3.</b>	<b>Populationsanalysen</b>	<b>87</b>
3.1	Voraralberger Bergkäse	87
3.2	Appenzeller Käse	90
3.3	Emmentaler Käse	91
3.3.1	Analyse der eingesetzten Starterkultur	91
3.3.2	Analyse der Flora im Käse	92
3.4	Alternative Methoden zur Populationsanalyse	95
<b>4.</b>	<b>Beurteilung der Einsatzmöglichkeiten von FTIR-Mikrospektroskopie in der Lebensmittelindustrie</b>	<b>98</b>
<b>5.</b>	<b>Ausblick</b>	<b>100</b>
<b>V.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>101</b>
	<b>ANHANG</b>	<b>113</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Seite
1 A+B FTIR-Spektrum mit Ableitung	3
2 Strahlengang des IR-Lichts im FTIR-Mikroskop	5
3 Darstellung der phylogenetischen Verhältnisse im <i>Saccharomyces</i> -Komplex	9
4 Klassifizierung der <i>Actinobacteria</i> auf Basis von 16S rDNA-Sequenzen	11
5 Darstellung der phylogenetischen Verhältnisse bei gram-positiven Bakterien	12
6 Darstellung der phylogenetischen Verhältnisse zwischen Milchsäurebakterien und verwandten Arten	13
7 A-C Vorrichtung zum Kolonietransfer von der Agarplatte auf den ZnSe-Probenträger	26
7 D IRscope II mit Kunststoffgehäuse zur Erzeugung einer kontrollierten Luftfeuchte	26
8 A Wachstumskurven verschiedener Hefearten bei 25°C	33
8 B Korrelation von Koloniedurchmesser und Reproduzierbarkeit der FTIR-Messungen I	33
9 Korrelation von Koloniedurchmesser und Reproduzierbarkeit der FTIR-Messungen II	34
10 Reproduzierbarkeit der FTIR-Messungen bei unterschiedlich großen Blenden	36
11 A-C Einfluss der Luftfeuchte auf die Reproduzierbarkeit der FTIR-Messungen	37+38
12 Vergleich des Identifizierungserfolgs für Hefen ermittelt mit FTIR-Mikro- und -Makrospektroskopie	40
13 Verbesserung des Identifizierungserfolgs in Abhängigkeit von der Spektrenzahl	41
14 Visuelle Spektrenanalyse von <i>D. hansenii</i> und <i>P. guillermondii</i> im Bereich von 1800-1710 cm <sup>-1</sup>	43
15 Stammtypisierung bei <i>D. hansenii</i> und <i>S. cerevisiae</i>	44
16 Wachstumskurven verschiedener coryneformer Bakterien bei 30°C	45
17 Identifizierungserfolg für coryneforme Bakterien	47
18 Wachstumskurven verschiedener Milchsäurebakterien bei 30°C	48

---

19	Kolonieabdrücke von <i>Lb. delbreuckii</i> auf dem ZnSe-Proben­träger	49
20	Spektrale Fenster zur Identifizierung von Milchsäurebakterien	50
21 A+B	Identifizierungserfolg für Milchsäurebakterien	52
22	Zusammensetzung der Flora von Bergkäse bestimmt nach 48 h Inkuba­ tion (Darstellung mit Ward's Algorithmus)	54
23	Zusammensetzung der undefinierten Starterflora für Emmentaler Käse	60
24	Mikroskopisches Bild von <i>Lb. delbrueckii</i> aus der Starterflora und Kultur auf festem Medium	61
25	Zusammensetzung der Emmentalerflora vor dem Pressen	62
26	Zusammensetzung der Emmentalerflora nach dem Pressen	64
27	Änderung der Emmentalerflora während des Pressens	65
28	Schematischer Aufbau eines künstlich neuronalen Netzes	86
29	Zusammensetzung der Flora von Bergkäse bestimmt nach 48 h Inkuba­ tion (Darstellung mit Average linkage)	89



# Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle</b>		<b>Seite</b>
1	Absorption bestimmter Verbindungen in unterschiedlichen Bereichen des FTIR-Spektrums	2
2	Spektrale Fenster zur Identifizierung coryneformer Bakterien	24
3	Physiologische Tests zur Identifizierung von Milchsäurebakterien (Stäbchen)	24
4	Physiologische Tests zur Identifizierung von Milchsäurebakterien (Kokken)	25
5	Zusammensetzung der Flora von Appenzeller Käse	56
6	Zusammensetzung der Flora von Appenzeller Käse aufgeschlüsselt nach Zeitpunkten des Kolonietransfers	58
7	Leistungsfähigkeit unterschiedlicher Methoden bei der Identifizierung von Hefen	72
8	Leistungsfähigkeit unterschiedlicher Methoden bei der Identifizierung coryneformer Bakterien	76
9	Übersicht über die Zusammensetzung der FTIR-Datenbanken und deren Identifizierungserfolg	83

## Abkürzungsverzeichnis

16S	kleine Untereinheit am Ribosom
APT	All purpose medium mit Tween
APTB	APT-Bouillon
ARDRA	Amplified rDNA restriction analysis
ATR	Attenuated total reflectance
CASO	Caseinpepton-Sojamehlpepton (Synonym zu Trypton Soja, TS)
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
DAM	Discriminant Analysis Method
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTGS	Deuteriertes Triglycinsulfat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FISH	Fluorescence <i>in-situ</i> -hybridisation
FTIR	Fourier-transformierte Infrarot (-Spektroskopie)
HDB	Hefe-Dextrose-Bouillon
IR	Infrarot
KbE	Kolonie bildende Einheiten
kNN	künstliche neuronale Netze
LDA	linear discriminant analysis
M17CB	M17-Citrat-Bouillon
MCT	Quecksilber (Mercury)-Cadmiumtellurit
MRS	Agar nach de Man, Rogosa und Sharpe
MRSGB	MRS-Glucose-Bouillon
MRSPB	MRS-Pentose-Bouillon
MSB	Milchsäurebakterien
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCA	principal component analysis
PCR	polymerase chain reaction
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA

---

rDNA	ribosomale Desoxyribonucleinsäure
r. F.	relative Feuchte
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
SD	spektrale Distanz
S/N	Signal-zu-Rauschen (Noise)
sp.	species
sp. nov.	species nova
SSM	Search Standards Method
ssp.	subspecies
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
TTGE	Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis
U/min	Umdrehungen pro Minute
w/v	weight per volume
YGC	Yeast-Glucose-Chloramphenicol
YGCB	Yeast-Glucose-Chloramphenicol mit Bromphenolblau
ZnSe	Zink-Selenit

### **Abkürzungen von Gattungsnamen**

A.	<i>Arthrobacter</i>
B.	<i>Brevibacterium</i>
By.	<i>Brachybacterium</i>
C.	<i>Candida</i>
Co.	<i>Corynebacterium</i>
D.	<i>Debaryomyces</i>
E.	<i>Escherichia</i>
Ec.	<i>Enterococcus</i>
K.	<i>Kluyveromyces</i>
Ko.	<i>Kocuria</i>
Lb.	<i>Lactobacillus</i>
Lc.	<i>Lactococcus</i>
Ln.	<i>Leuconostoc</i>

---

M.	<i>Microbacterium</i>
P.	<i>Pichia</i>
R.	<i>Rathayibacter</i>
S.	<i>Saccharomyces</i>
St.	<i>Staphylococcus</i>
Str.	<i>Streptococcus</i>
W.	<i>Weissella</i>

## Zusammenfassung

FTIR-Mikrospektroskopie kombiniert FTIR-Spektroskopie mit Mikroskopie und ist eine verhältnismäßig neue Technik zur Identifizierung von Mikroorganismen anhand des Vergleichs mit Referenzspektren einer Datenbank. Das eigentliche Neue der Technik stellt die Messung von Mikrokolonien dar, die von der Agarplatte auf einen IR-transparenten Probenträger überführt werden. Da für die Bildung von Mikrokolonien eine verkürzte Inkubationsdauer ausreichend ist, wird eine schnellere Identifizierung als mit herkömmlichen kultivierungsbedingten Methoden möglich. Zudem kann die bislang für eine Identifizierung notwendige Isolierung von Mikroorganismen übergangen werden, was die schnelle quantitative Analyse gemischter mikrobieller Konsortien gestattet.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, die Identifizierung lebensmittelrelevanter Mikroorganismen durch FTIR-Mikrospektroskopie zur Anwendung zu bringen. Dazu wurde zunächst die Methode in Bezug auf die Inkubation der Organismen und den Einfluss verschiedener Parameter auf die Qualität der Spektren standardisiert. Anschließend wurden für die drei Organismengruppen Hefen, coryneforme Bakterien und Milchsäurebakterien Referenzdatenbanken mit 82, 64 bzw. 71 Stämmen erstellt sowie die für eine Identifizierung bedeutenden Wellenzahlbereiche und die geeignete Ableitung bestimmt.

Nach Optimierung der Parameter für die Auswertung ergab eine externe Validierung der Datenbanken für Hefen 80%, für coryneforme Bakterien 75% und für Milchsäurebakterien 83% korrekte Identifizierungen auf Speziesebene. Bei der Identifizierung der Hefenarten *Saccharomyces cerevisiae* und *Debaryomyces hansenii* auf Stammebene konnten 92% bzw. 91% richtige Zuordnungen erzielt werden. Diese Ergebnisse sind, verglichen mit den herkömmlichen Methoden zur routinemäßigen Identifizierung, sehr gut, zumal eine Differenzierung auf Stammebene mit kommerziell zu erwerbenden Kits in der Regel nicht erreicht wird. Sie zeigen jedoch auch, dass durchaus noch Verbesserungspotential besteht. So ließe sich der Identifizierungserfolg durch eine Erhöhung der Spektrenzahl in der Da-

tenbank oder den Einsatz hoch entwickelter multivariater Verfahren der Datenauswertung – wie künstlicher neuronaler Netze – noch erhöhen.

Eine Anwendung der Datenbanken für coryneforme Bakterien und Milchsäurebakterien unter Praxisbedingungen erfolgte bei der Populationsanalyse zweier Reifungskonsortien für Rotschmirekäse und einer undefinierten Starterkultur für Emmentaler Käse, für die insgesamt ca. 3750 Spektren aufgenommen wurden. Eine Überprüfung der Identifizierungsergebnisse der FTIR-Mikrospektroskopie bei der Analyse der Rotschmirekultur über die Identifizierung von Isolaten mittels FTIR-Makrospektroskopie und z.T. auch 16S rDNA-Sequenzierung ergab, dass in der Datenbank gut repräsentierte Arten mit FTIR-Mikrospektroskopie zweifelsfrei identifiziert werden konnten. Die Starterkultur des Emmentalers wurde vor der Analyse des Käses in die Referenzdatenbank übernommen. So konnte eine Differenzierung der im Käse vorhandenen Organismen in Starter- und Hausflora sowie einzelne Stämme vorgenommen und zudem die Verschiebung der Floraverhältnisse während der Säuerung festgestellt werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sich FTIR-Mikrospektroskopie erfolgreich auf die Identifizierung von lebensmittelrelevanten Mikroorganismen anwenden lässt. Aufgrund des höheren Arbeitsaufwandes für die Messung von Reinkulturen mit FTIR-Mikrospektroskopie erscheint die universelle Identifizierung, wie sie erfolgreich mit FTIR-Makrospektroskopie gemacht wird, jedoch nicht als optimale Anwendung der Technik. Das größte Potential dieser Methode liegt vielmehr in ihrem hohen Automatisierungsgrad bei der Messung vieler Kolonien der gleichen Probe, was die mikrobielle Populationsanalyse außerordentlich beschleunigt und über die große Datenbasis zudem sehr präzise Ergebnisse ermöglicht. So wird erstmals ein Monitoring von Reifungskonsortien oder auch die Kontaminationsroutenanalyse ohne den Einsatz molekularbiologischer Techniken und mit für Routineuntersuchungen vertretbarem Aufwand durchführbar.

## Summary

FT-IR microspectroscopy combines FT-IR spectroscopy with microscopy and is a relatively novel technique for the identification of microorganisms by comparison to reference spectra in a database. The novelty of the technique is displayed by the measurement of microcolonies that have to be transferred from the agar plate to an IR-transparent sample carrier. As for the formation of microcolonies a reduced incubation time is sufficient, an accelerated identification compared to conventional cultivation-dependent methods is possible. Moreover, the hitherto required isolation of microorganisms prior to the identification may be omitted, which enables rapid quantitative analysis of mixed microbial consortia.

The aim of the presented work was to apply FT-IR microspectroscopy to the identification of food-relevant microorganisms. For this purpose, the method was first standardised with respect to the incubation of the microorganisms and the influence of certain parameters on the quality of the spectra. Afterwards, reference databases for yeasts, coryneform bacteria and lactic acid bacteria were established including 82, 64, and 71 strains, respectively, and the spectral ranges important for the identification and the suitable derivation were determined.

After optimising the parameters for data analysis an external validation of the databases resulted in 80% correct identification on the species level for yeasts, 75% for coryneform bacteria, and 83% for lactic acid bacteria. For the yeast species *Saccharomyces cerevisiae* and *Debaryomyces hansenii*, 92% and 91% of the spectra, respectively, were typed correctly on the strain level. These are very good results compared to conventional techniques for routine identification of microorganisms, particularly as differentiation to the strain level with commercially available identification kits will normally not be achieved. However, the results also show that there is still potential for improvement. The success of identification might be improved by including more spectra in the database or by applying

highly sophisticated multivariate statistical techniques of data analysis, for example artificial neural networks.

The databases for coryneform bacteria and lactic acid bacteria were also applied to the population analyses of two red smear cheese ripening consortia and one undefined starter culture for Emmentaler cheese. Altogether, 3750 spectra were recorded. The identification results obtained by FT-IR microspectroscopy were verified by identifying isolates by FT-IR macrospectroscopy and partially by 16S rDNA sequencing, which showed that species well covered by the spectral library could be identified unequivocally. The starter culture for the Emmentaler cheese was included in the database for lactic acid bacteria prior to the population analysis, which enabled the differentiation of the organisms present in the cheese into starter culture and house flora as well as into different strains. Furthermore, a shift in the flora composition during the acidification could be observed.

The presented work shows that FT-IR microspectroscopy can be applied successfully to the identification of food-relevant microorganisms. Due to the higher work effort for the measurement of pure cultures by FT-IR microspectroscopy, the universal identification of microorganisms – as it is performed successfully applying FT-IR macrospectroscopy – seems not to be the optimal application for this technique. The highest potential of the method lies in the high degree of automation for the measurement of many colonies of the same sample, which significantly accelerates microbial population analyses. The large amount of data, furthermore, permits very precise results to be obtained. This renders, for the first time, a monitoring of ripening consortia as well as contamination route analyses without applying molecular techniques and with reasonable work effort possible for routine analyses.



# I. Einleitung

Die Identifizierung von Mikroorganismen stellt in der Lebensmittelindustrie einen wesentlichen Bestandteil der Qualitätssicherung sowohl im Rahmen der Produkt- als auch der Betriebshygiene dar. Insbesondere bei der Analyse von Kontaminationsrouten ist eine möglichst exakte Identifizierung und Typisierung der betreffenden Organismen wünschenswert. Dies erfolgt in der Regel über kommerziell zu erwerbende Identifizierungskits basierend auf physiologischen Reaktionen. Speziell Untersuchungen einer großen Anzahl an Organismen – wie beispielsweise bei der Analyse komplexer Populationen – sind mit diesen Methoden allerdings nur mit viel Aufwand durchzuführen. Hier besteht Bedarf nach einer Technik, die in kurzer Zeit die Identifizierung vieler Organismen unter möglichst geringem Material- und Personalaufwand ermöglicht. FTIR-Mikrospektroskopie – eine Kombination aus FTIR-Spektroskopie und Mikroskopie – verspricht, diesen Anforderungen gerecht zu werden.

## 1. Fourier-transformierte Infrarot (FTIR)-Spektroskopie

### 1.1 Methodisches Prinzip

Über die Identifizierung und Differenzierung von Bakterien mittels Fourier-transformierter Infrarot (FTIR)-Spektroskopie wurde bereits in den Fünfziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts berichtet [115, 137]. Aufgrund unzureichender Möglichkeiten der Datenauswertung und technischer Limitierungen konnte sich die Methode jedoch damals nicht durchsetzen. Anfang der Neunziger Jahre hat die Arbeitsgruppe um Dieter Naumann vom Robert-Koch-Institut in Berlin die Technik erneut vorgestellt [65, 103], und seitdem sind zahlreiche Arbeiten über die Identifizierung und Charakterisierung von Mikroorganismen mit FTIR-Spektroskopie publiziert worden.

In der IR-Spektroskopie wird die Eigenschaft von Atomen genutzt, innerhalb eines Moleküls nach Anregung durch Energiezufuhr – in diesem Fall über IR-Strahlung – um ihre Gleichgewichtslage zu schwingen [61]. Da die Schwingungsenergie wie auch der Ener-

giegehalt von Elektronenumlaufbahnen aus Quanten besteht, der Übergang auf ein anderes Niveau also nur schrittweise über Quantensprünge erfolgen kann, muss die Frequenz des eingestrahnten Lichts genau der Energiedifferenz zwischen den betreffenden Niveaus entsprechen. Diese ist u.a. abhängig von der Masse der Atome und den Bindungskräften, die zwischen ihnen wirken. Die in diesem Zusammenhang in Frage kommenden Frequenzen liegen im IR-Bereich bei Wellenzahlen zwischen 12.800 und 200  $\text{cm}^{-1}$  [61], von denen der mittlere IR-Bereich von 4.000-500  $\text{cm}^{-1}$  bei Anwendung der FTIR-Spektroskopie genutzt wird. Die bevorzugte Einheit ist die Wellenzahl pro Zentimeter, der reziproke Wert der Wellenlänge. Sie bietet den Vorteil der Proportionalität zur Frequenz und damit zum Energiegehalt der Strahlung.

Die Kalkulation der Spektren erfolgt aus dem Verhältnis der Intensität des Lichtstrahls vor und nach dem Passieren der Probe, wobei der Detektor ein Interferogramm aufzeichnet, aus dem anschließend über die Fourier-Transformation das Transmissions- bzw. Absorptionsspektrum errechnet wird. In der Regel bevorzugt man die Darstellung als Absorptionsspektrum, da hier die Höhe der Absorption einer Substanz oder Verbindung nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz direkt proportional zu ihrer Konzentration ist [104].

Aufgrund der genau festgelegten Energiemenge für die Anregung bestimmter Atome kann die Absorption funktioneller Gruppen in Molekülen spezifischen Wellenzahlen zugeordnet werden [104]. Auf dieser Basis ist es möglich, das Spektrum in spektrale Bereiche einzuteilen, denen näherungsweise die Absorption bestimmter Zellbestandteile zugeordnet werden kann (Tab. 1).

**Tabelle 1: Absorption von Zellbestandteilen in spezifischen Bereichen des FTIR-Spektrums nach Naumann [102] und Naumann et al. [104].**

absorbierende Verbindungen	spektraler Bereich
Fettsäuren	3.000-2.800 $\text{cm}^{-1}$ 1.500-1.400 $\text{cm}^{-1}$
Phospholipide	~1740 $\text{cm}^{-1}$
Proteine, DNA/RNA	1.800-1.500 $\text{cm}^{-1}$
Polysaccharide	1.200-900 $\text{cm}^{-1}$

In FTIR-Spektren von Mikroorganismen ist die Absorption aller Zellbestandteile enthalten; sie sind somit ein Abbild der kompletten chemischen Zusammensetzung des gemessenen Organismus und können als dessen Fingerabdruck gesehen werden. Analog zur Komplexität der Bakterien- oder Hefenzelle bestehen FTIR-Spektren von Mikroorganismen nicht aus isolierten, klar erkennbaren Peaks, sondern aus sich stark überlagernden Banden (Abb. 1A). Zur Verarbeitung und Auswertung der Daten wird daher die erste oder zweite Ableitung des Originalspektrums herangezogen, die eine Auflösung in einzelne deutlicher erkennbare Peaks bewirkt (Abb. 1B).

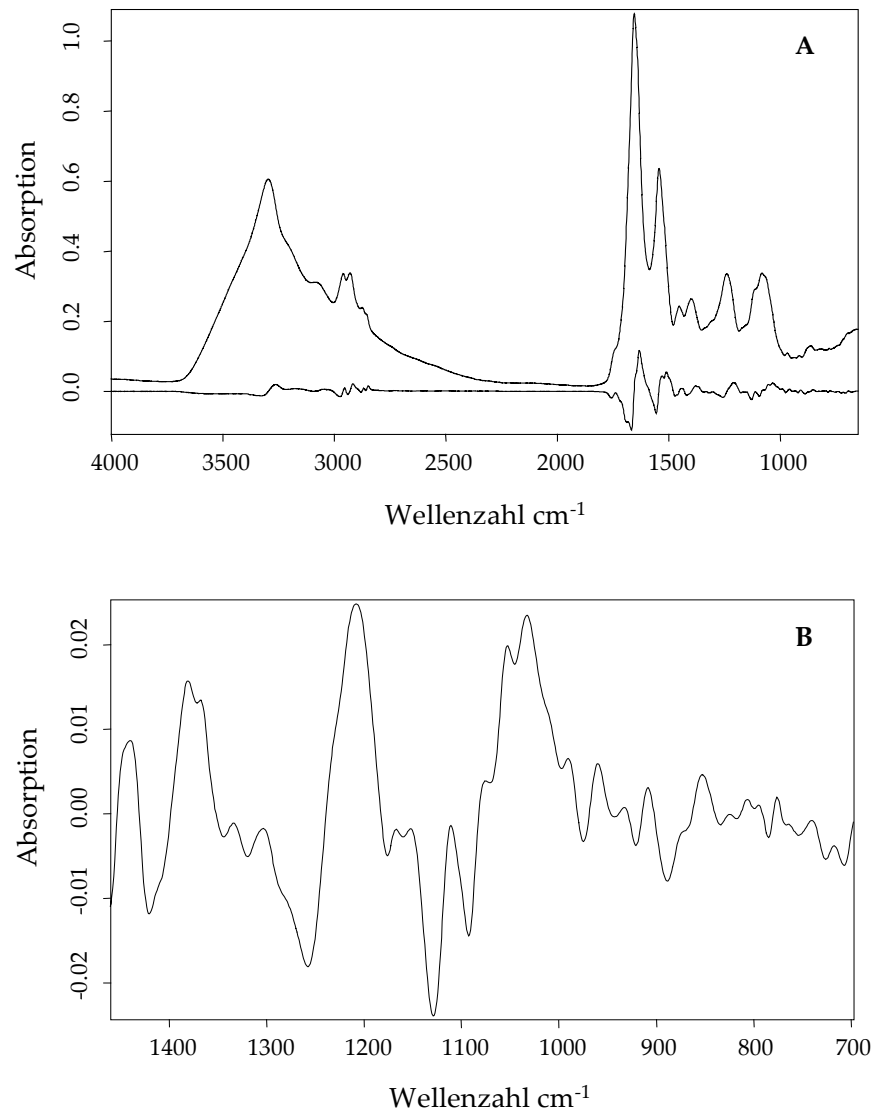


Abb. 1: Spektrum eines Bakteriums mit zugehöriger 1. Ableitung (A) und Vergrößerung der 1. Ableitung aus Abb. 1A im Bereich 1450-700 cm<sup>-1</sup>. Zu erkennen ist eine bessere Auflösung der Banden des Originalspektrums in einzelne Peaks (B).

Die Identifizierung von Mikroorganismen erfolgt über einen Vergleich der unbekanntes Spektren mit Referenzspektren einer Datenbank, wobei die spektrale Distanz zwischen den Spektren quantifiziert und als Hitqualität angegeben wird. Entscheidend für eine erfolgreiche Identifizierung sind neben der Zusammensetzung der Bibliothek auch die Wahl der Ableitung und der spektralen Bereiche sowie eine strikt standardisierte Probenaufbereitung, da sich Abweichungen im Medium, in der Inkubationstemperatur oder Inkubationsdauer im Spektrum niederschlagen und somit die Vergleichbarkeit einschränken. Die Vorteile der Methode liegen in ihrem hohen Differenzierungspotential bis auf Spezies- oder gar Stammebene, in ihrer einfachen Handhabung, in ihrem geringen Arbeitsaufwand und den geringen Kosten pro Probe.

## 1.2 FTIR-Mikrospektroskopie

FTIR-Mikrospektroskopie kombiniert die Anwendung von Mikroskopie und FTIR-Spektroskopie und ermöglicht damit sowohl die visuelle Betrachtung einer Probe als auch deren chemische Charakterisierung über die Aufnahme von IR-Spektren. Möglich wird dies aufgrund der stark verbesserten Spektrometertechnik mit erhöhter räumlicher Auflösung und hohem S/N-Verhältnis sowie durch den Einsatz sehr empfindlicher, mit flüssigem Stickstoff gekühlter MCT-Detektoren [26, 151]. Da die Objektive herkömmlicher Lichtmikroskope infrarotundurchlässig sind, werden in IR-Mikroskopen Infrarotstrahlen reflektierende Cassegrain-Spiegel-Linsen-Objektive eingesetzt, die sowohl als Kondensor als auch als Objektiv zu verwenden sind. In Abbildung 2 ist der Strahlengang des Infrarotlichts für eine Transmissionsmessung schematisch dargestellt. Das von unten einfallende Licht wird vom Kondensor auf die Probe gebündelt, nach der Passage der Probe vom Cassegrain-Objektiv auf einen Spiegel reflektiert und von diesem zum Detektor weitergeleitet.

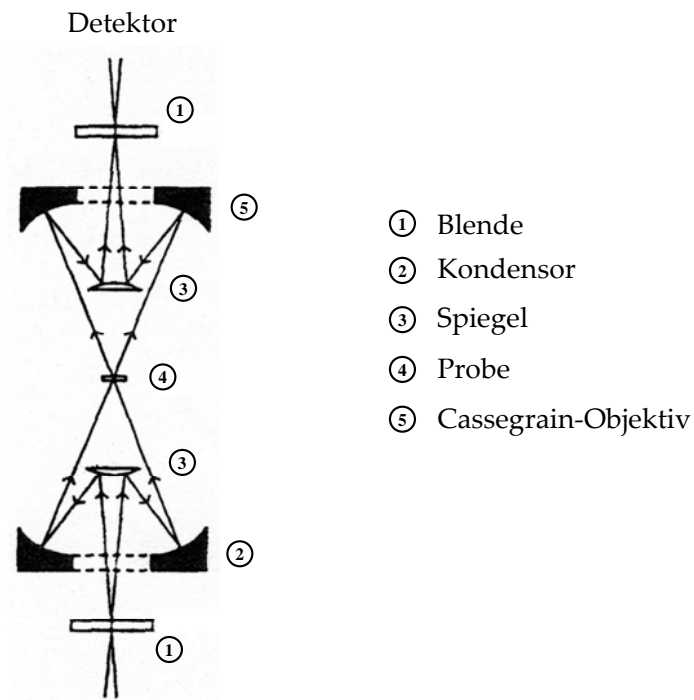


Abb. 2: Schematische Darstellung des Strahlengangs für eine Transmissionsmessung im FTIR-Mikroskop adaptiert von Christy et al. [26]. Das infrarotundurchlässige Objektiv herkömmlicher Lichtmikroskope ist durch ein Cassegrain-Spiegel-Linsen-Objektiv ersetzt, das auch als Kondensator fungiert. Dieser bündelt das von unten einfallende Licht auf die Probe. Nach dem Durchgang durch die Probe wird das Licht vom Cassegrain-Objektiv auf einen Spiegel reflektiert, der das Signal zum Detektor weiterleitet.

Die Anwendung der FTIR-Mikrospektroskopie beschränkte sich zunächst auf den nicht-biologischen Bereich wie die Materialwissenschaften, wo beispielsweise Farben alter Kunstwerke zum Zweck der Restauration oder der Erstellung von Zertifikaten analysiert wurden [151]. Auch in der Forensik wird FTIR-Mikroskopie eingesetzt, hier u.a. zur Charakterisierung von Fasern, Autolacken oder anderen Materialien im Zuge polizeilicher Ermittlungen. Im biologischen Sektor eignet sich FTIR-Mikrospektroskopie insbesondere zur Analyse von Schnittpräparaten bestimmter Gewebe (für eine Übersicht siehe [102, 151]). Über sogenannte mapping-Messungen wird hier die chemische Charakteristik eines Ausschnitts des Präparates erfasst, die dann anhand der Intensität ausgewählter Peaks als Karte des untersuchten Gewebes dargestellt werden kann. So ist es z.B. möglich, malignes oder scrapie-infiziertes von gesundem Gewebe zu unterscheiden [49, 79, 89].

In der Mikrobiologie bietet FTIR-Mikrospektroskopie den Vorteil einer beschleunigten Identifizierung über eine verkürzte Inkubationszeit der Mikroorganismen, da die Mes-

sung an Mikrokolonien erfolgt und aufgrund dessen nur wenig Zellmaterial benötigt wird. Für die Messung werden die obersten Zellschichten der Kolonien über eine Stempelvorrichtung von der Agarplatte auf ein IR-transparentes Trägermaterial überführt und im visuellen Modus des Mikroskops detektiert. Die Messung aller gewählten Kolonien erfolgt dann automatisiert. Die Messung von Mikrokolonien bietet über die Zeitersparnis hinaus den Vorteil, dass eine vorherige Isolierung der Organismen obsolet wird und somit auch die quantitative Analyse von Mischkulturen innerhalb sehr kurzer Zeit möglich ist.

Über die Möglichkeit der Anwendung von FTIR-Mikrospektroskopie zur Differenzierung und Charakterisierung von Mikroorganismen haben Naumann et al. [104] bereits 1991 berichtet, doch wurden weitere Arbeiten erst ab dem Jahr 2000 veröffentlicht. Ngo-Thi et al. [105] demonstrierten neben der Erfassung der Kolonieheterogenität auch das Potential der Technik zur Differenzierung gram-positiver Bakterien, gram-negativer Bakterien und Hefen sowie zur Differenzierung antibiotikaresistenter und -sensitiver Klone von *Staphylococcus aureus*. Es folgten weitere Arbeiten, die sich im Wesentlichen mit der Analyse der Kolonieheterogenität befassten [25, 111]. Über die Identifizierung von Mikroorganismen mittels FTIR-Mikrospektroskopie ist bis dato nur eine einzige Publikation erschienen und auch diese behandelt die FTIR-Mikrospektroskopie nur am Rande [78].

## 2. Mikroorganismen

### 2.1 Taxonomie

In der vorliegenden Arbeit wurden drei unterschiedliche Taxa von Mikroorganismen behandelt, wobei der Schwerpunkt auf den für Milchprodukte relevanten Gattungen und Spezies lag. Aus diesem Grund wird in diesem Kapitel ein genereller Überblick über die taxonomische Situation für Hefen, coryneforme Bakterien und Milchsäurebakterien vermittelt und auf Besonderheiten hingewiesen.

### 2.1.1 Hefen

Hefen gehören zu den Pilzen und ihre Bestimmung und Identifizierung erfolgte lange ausschließlich anhand morphologischer und physiologischer Kriterien und Eigenschaften, wobei die Beschreibungen und Schlüssel von Kreger-van Rij [82] und Barnett et al. [7] als umfassende Nachschlagewerke dienten und noch immer dienen.

Hefen werden in zwei Phyla, die *Ascomycotina* und *Basidiomycotina*, unterteilt, deren charakteristisches Merkmal die Bildung von Ascosporen im Fall der *Ascomycotina* bzw. von Basidiosporen im Fall der *Basidiomycotina* ist [7]. Neben den Besonderheiten der sexuellen Fortpflanzung werden auch das mikroskopische Bild der Hefen sowie physiologische und biochemische Charakteristika zur Klassifizierung und Identifizierung herangezogen. So wird beispielsweise geprüft, ob bestimmte Zucker fermentiert werden, welche Verbindungen als alleinige Kohlenhydrat- oder Stickstoffquelle für Wachstum ausreichend sind, ob Vitamine zum Wachstum benötigt werden oder ob Harnstoff hydrolysiert wird. Insgesamt umfassen die Beschreibungen von Barnett et al. [7] 99 verschiedene physiologische Tests.

Darüber hinaus können Hefen in perfekte – auch teleomorph genannte und zur sexuellen Vermehrung befähigte – und imperfekte – auch anamorph genannte, d.h. sich nur durch Knospung vermehrende – Formen differenziert werden. Genetisch sind diese identisch, morphologisch jedoch zu unterscheiden. Da die Mehrzahl der Arten sowohl die teleomorphe als auch die anamorphe Form ausprägen kann und diese häufig unabhängig voneinander beschrieben wurden, existieren meist zwei gültige Namen für ein und dieselbe Art. Zudem sind viele Spezies im Laufe der Zeit mehrfach reklassifiziert worden, so dass für einige Arten mehr als 20 Synonyme bekannt sind und in der dritten Ausgabe von „Yeasts: Characteristics and Identification“ [7] für die 678 erfassten Spezies im Register annähernd 4000 verschiedene Bezeichnungen aufgeführt sind.

Die herkömmliche, klassische Hefentaxonomie ist seit dem Einsatz molekularbiologischer Methoden zunehmend grundlegenden Veränderungen unterworfen, da Ergebnisse genotypischer Analysen häufig im Widerspruch zur bisherigen Systematik stehen. So wurden beispielsweise *Pichia carsonii*, *P. etchellsii*, *Schwanniomyces occidentalis* und *Wingea robertsii*,

---

für deren ursprüngliche Klassifizierung die unterschiedliche Morphologie von Ascosporen Ausschlag gebend war, auf der Grundlage von rDNA-Sequenzvergleichen in das Genus *Debaryomyces* integriert [84]. Dies zeigt bereits, dass phänotypische Merkmale aus phylogenetischer Sicht nicht unbedingt aussagekräftig sein müssen. Bestätigt wurde dies durch weitere ausführliche Studien von Kurtzman & Robnett [86, 87], die die Existenz scheinbar synonyme Bezeichnungen für viele Arten und enge Verwandtschaftsverhältnisse zwischen phänotypisch sehr unterschiedlichen Spezies sowie die Polyphyly einiger Gattungen im „*Saccharomyces*-Komplex“ zeigten. Mit Polyphyly ist hier die Zersplitterung verschiedener Spezies einer Gattung in mehrere Zweige des Stammbaums gemeint. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Beschreibungen von Gattungen in ihrer jetzigen Form nicht den tatsächlichen phylogenetischen Beziehungen entsprechen. Die Folge daraus wird eine umfassende Reorganisation der Hefentaxonomie in den kommenden Jahren sein, mit der Kurtzman [85] für den „*Saccharomyces*-Komplex“ bereits begonnen hat. Er untersuchte die phylogenetischen Verhältnisse zwischen Spezies des „*Saccharomyces*-Komplex“, wie sie sich aus Analysen verschiedenster Nukleotidsequenzen ergeben (Abb. 3), und schlug aufgrund seiner Daten eine Reklassifizierung vieler Arten sowie die Schaffung fünf neuer Gattungen vor.



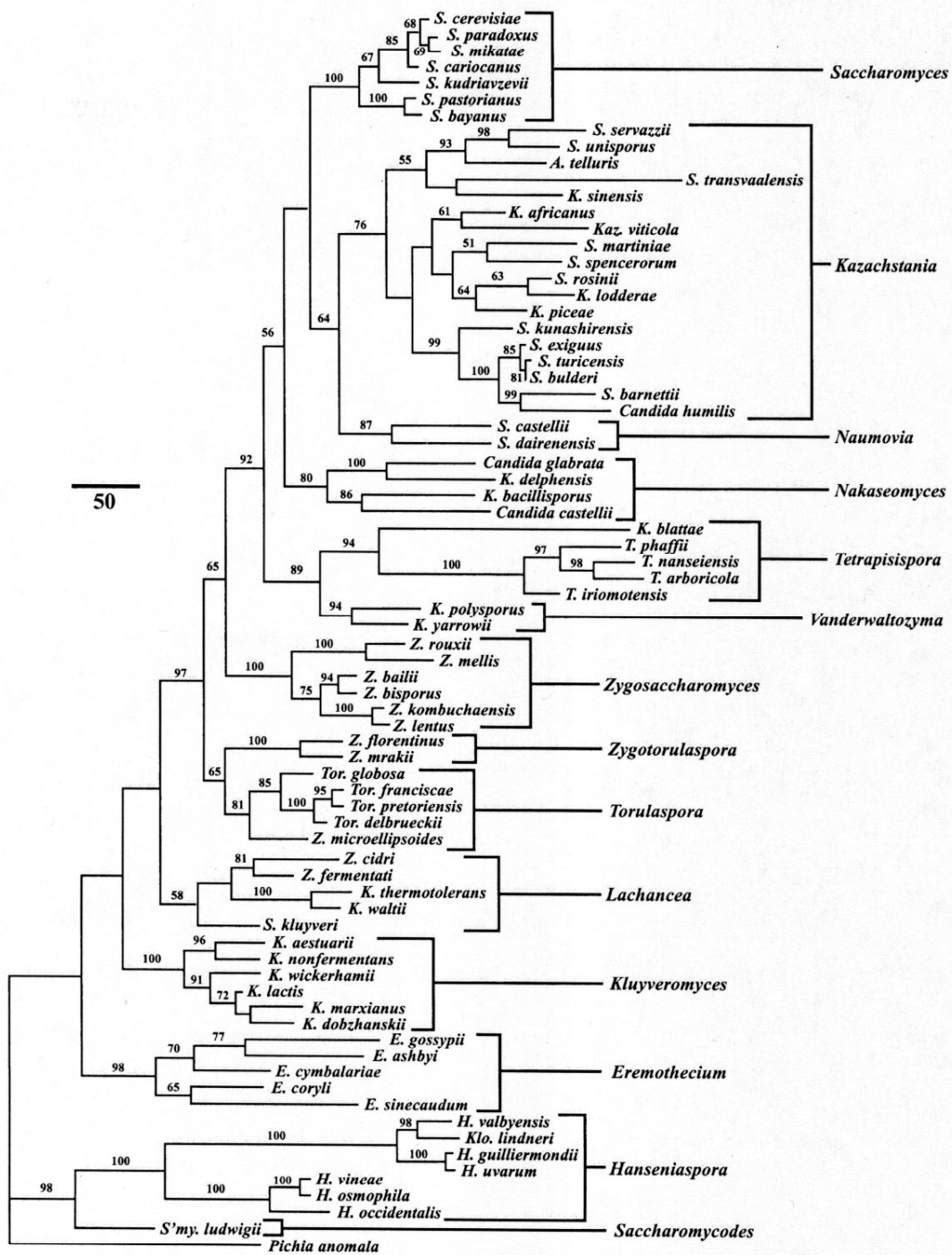


Abb. 3: Darstellung der phylogenetischen Verhältnisse zwischen unterschiedlichen Spezies des *Saccharomyces*-Komplex ermittelt aus den Sequenzregionen 18S rDNA, 5,8S ITS-Region, 26S rDNA, Translationselongationsfaktor EF-1 $\alpha$ , rDNA der mitochondrialen kleinen Untereinheit und COX II mit Neuordnung der Arten in alte und neugeschaffene Gattungen nach Kurtzman [85]. Der Balken entspricht 50 substituierten Nukleotiden.

### 2.1.2 Coryneforme Bakterien

Bei coryneformen Bakterien handelt es sich um gram-positive Stäbchen, deren DNA einen hohen G+C-Gehalt von mehr als 50 mol% aufweist. Sie sind Katalase-positiv, bilden keine Sporen und haben eine unregelmäßige Zellform [56]. Im mikroskopischen Bild sind sie durch ihre „snapping division“ charakterisiert, die zu einem V-förmigen Erscheinungsbild durch ungleichmäßiges Aufreißen der Zellwand bei der Teilung führt. Der Begriff „coryneform“ ist ein Relikt aus vergangenen Zeiten und bezeichnete ehemals die Gruppe gram-positiver Stäbchen mit unregelmäßiger Zellform [117]. Obwohl er längst aus dem systematisch korrekten Vokabular gestrichen wurde, verwenden v.a. klinische Mikrobiologen und Lebensmittelmikrobiologen ihn der Einfachheit halber weiterhin, wenn sie sich auf oben genannte Gruppe von Organismen beziehen. Auch in der vorliegenden Arbeit wird im Folgenden dieser Begriff verwendet werden.

Die Identifizierung und taxonomische Einteilung coryneformer Bakterien erfolgte lange Zeit über die Bestimmung chemotaxonomischer Merkmale wie der unterschiedlichen Zusammensetzung der Zellwandbestandteile Peptidoglykan, Polyamine, Fettsäuren oder Mykolsäuren, physiologischer Reaktionen wie beispielsweise Säurebildung aus Zuckern oder dem Vorhandensein bestimmter Enzyme [21, 32, 56, 123]. 1997 schlugen Stackebrandt et al. [133] ein neues, ausschließlich auf 16S rDNA/rRNA-Sequenzdaten basierendes Klassifizierungsschema für gram-positive Bakterien mit hohem G+C-Gehalt vor, in dem unter dem neuen Klassennamen *Actinobacteria* alle ehemals zur Gruppe der Actinomyceten zählenden Organismen in fünf Subklassen mit dazugehörigen Ordnungen und Familien zusammengefasst sind. Bestehende Beschreibungen für Genera und Spezies blieben unberührt, da lediglich eine Neuordnung der Gattungen vorgenommen wurde. Die Familien der coryneformen Arten sind in den Unterordnungen *Corynebacterineae* und *Micrococcineae* zusammengefasst, die wiederum zur Ordnung der *Actinomycetales* gehören (Abb. 4).

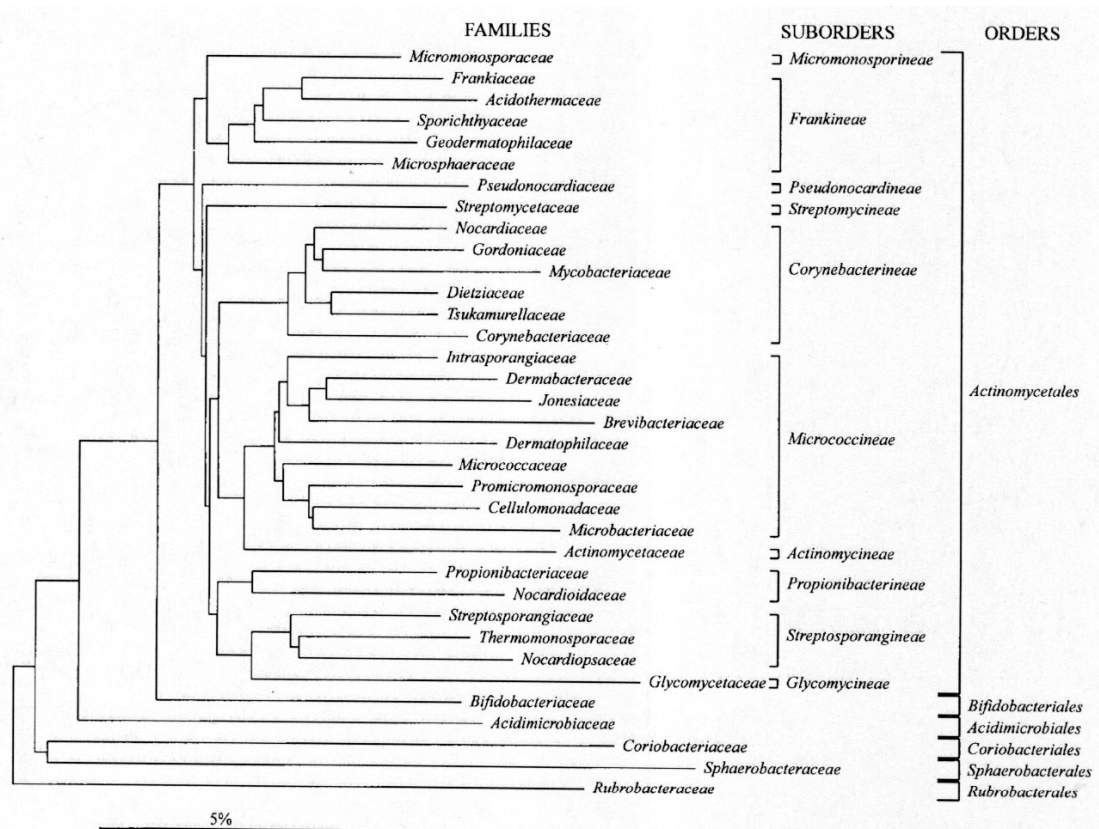


Abb. 4: Klassifizierung der *Actinobacteria* auf Basis von 16S rDNA-Sequenzen nach Stackebrandt et al. [133]. Der Balken indiziert 5% Sequenzunterschiede.

### 2.1.3 Milchsäurebakterien

Per definitionem gehören zu den Milchsäurebakterien diejenigen Organismen, die Milchsäure als hauptsächliches Endprodukt des Kohlenhydratstoffwechsels produzieren [134]. Demnach müssten auch einige *Bacillus*-Arten und die Bifidobakterien zu den Milchsäurebakterien gerechnet werden, doch haben Bifidobakterien einen hohen G+C-Gehalt in ihrer DNA und gehören phylogenetisch somit zu den *Actinobacteria*, während Bazillen Katalase-positiv und Sporenbildner sind. Milchsäurebakterien im eigentlichen Sinn gehören zum sogenannten „Clostridiumzweig“ der gram-positiven Bakterien, also zu jener Gruppe mit niedrigem G+C-Gehalt in ihrer DNA (Abb. 5). Sie sind Katalase-negativ, bilden keine Sporen und ihre Zellform reicht von Stäbchen über kokkoide Stäbchen bis hin zu Kokken.

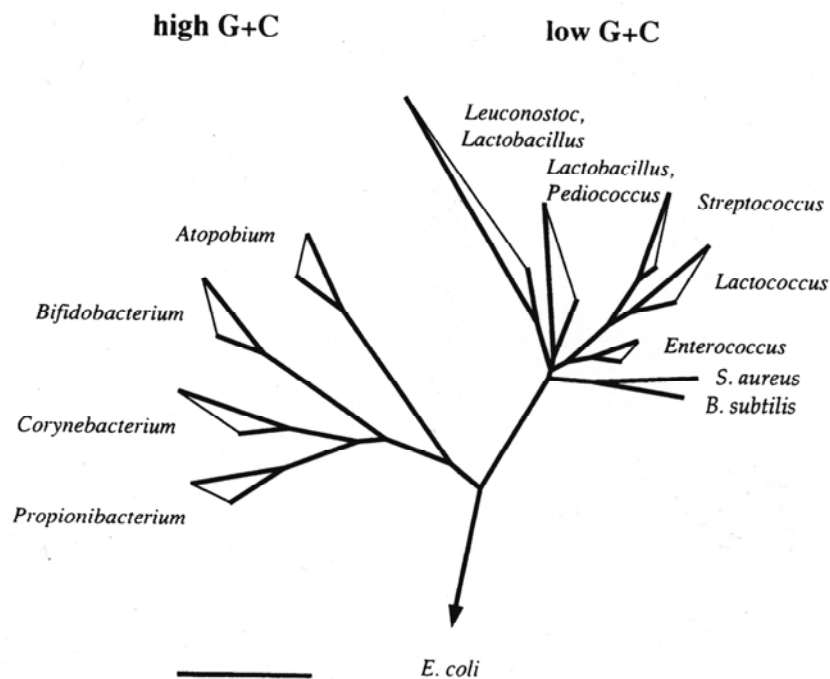


Abb. 5: Phylogenetische Beziehungen gram-positiver Bakterien auf Basis von 16S und 23S rRNA-Sequenzdaten nach Schleifer & Ludwig [125]. Der Balken indiziert 10% Sequenzunterschiede.

Nach Stiles & Holzapfel [134] zählen heute elf Gattungen zu den Milchsäurebakterien mit Relevanz für Lebensmittel, zu denen neben den allgemein bekannten wie *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* und *Leuconostoc* auch neuere Gattungen wie *Carnobacterium*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Vagococcus* und *Tetragenococcus* gehören. Abbildung 6 zeigt die phylogenetischen Beziehungen dieser Gattungen zueinander, wobei *Weissella* und *Oenococcus* zur *Leuconostoc*-Gruppe und *Pediococcus* zur *Lactobacillus casei*-Gruppe zählen.

Das Genus *Lactobacillus* ist mit mehr als 60 Spezies und Subspezies die umfangreichste Gattung der Milchsäurebakterien [134] und mit einem G+C-Gehalt der DNA je nach Spezies zwischen 32 und 54 mol% [126] zudem sehr divers. Phylogenetisch kann eine Unterteilung in die *Lb. delbrueckii*-, *Lb. casei*- oder *Leuconostoc*-Gruppe vorgenommen werden (Abb. 6), die jedoch nicht mit der phänotypischen Einteilung in obligat homofermentative und fakultativ oder obligat heterofermentative Spezies übereinstimmt [126]. Einen sehr guten Überblick über diese Gattung und ihre Unterteilung nach verschiedenen Kriterien vermitteln Hammes & Vogel [64] und Vandamme et al. [145].

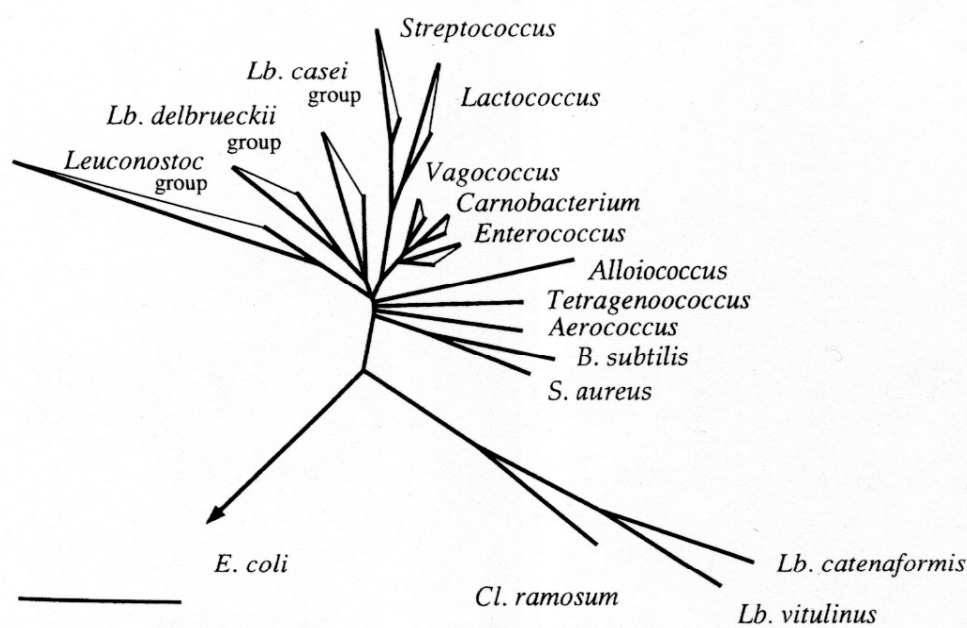


Abb. 6: Phylogenetische Beziehungen zwischen Milchsäurebakterien und verwandten Arten nach Schleifer & Ludwig [125]. Der Balken indiziert 10% Sequenzunterschiede.

## 2.2 Vorkommen in Lebensmitteln

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Identifizierung von Mikroorganismen aus Lebensmitteln im Allgemeinen und aus Milchprodukten im Besonderen. Im Folgenden wird deshalb dem Vorkommen der behandelten Organismen in Molkereiprodukten besonderes Augenmerk gewidmet.

### 2.2.1 Hefen

Hefen spielen in Lebensmitteln sowohl als Nutz- als auch als Schadkeime eine große Rolle (eine ausführliche Darstellung bieten Boekhout & Robert [16]). Da sie in einem breiten pH-Bereich wachsen können, verderben insbesondere Lebensmittel mit niedrigem pH-Wert bei gegebener Kontamination durch Hefen, da diese hier über einen Selektionsvorteil gegenüber der Konkurrenzflora verfügen. Hefen werden jedoch bei der Pasteurisierung abgetötet; der  $D_{1min}$ -Wert für die am stärksten hitzeresistente Art *Zygosaccharomyces bailii* liegt bei 56°C für vegetative Zellen und bei 64°C für Ascosporen [130]. Sie müssen also in der Regel durch Rekontamination wieder ins Produkt gelangen, um zum Verderb

führen zu können. Besonders gefährdet sind hier Sauermilchprodukte, die unter Zusatz von Fruchtzubereitungen, Honig, Zucker, Schokolade oder Nüssen produziert werden, da über diese Zutaten eine Rekontamination erfolgen kann und zudem zusätzlicher Zucker ins Produkt gelangt, der das Wachstum der Hefen und die Fermentation erheblich fördert [72, 130]. Da Früchte ein natürliches Habitat für Hefen darstellen [51], sind insbesondere Fruchtzubereitungen und fruchthaltige Sauermilchprodukte von Hefenverderb betroffen. Hier werden Spezies wie *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *P. anomala*, *P. fabianii*, *P. membranaefaciens*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida tropicalis*, *C. intermedia*, *C. parapsilosis*, *Torulasporea delbrueckii* und *Clavispora lusitaniae* häufig isoliert [130]. Die Folgen einer Kontamination mit Hefen sind Fehl aroma, Farb- und Texturänderungen sowie im Fall von fermentativen Hefen aufgrund von Gasbildung bombierte Verpackungen [130]. Obwohl sie für die Käseherstellung eine wichtige Rolle spielen, können Hefen auf Käse ebenfalls zu unerwünschten Aroma- und Farbveränderungen führen; auch sind antagonistische Effekte gegen Starterkulturen bekannt. So wurde beispielsweise beobachtet, dass *Issatchenkia orientalis* das Wachstum von *Lactococcus lactis* hemmt [130].

Neben ihrer Stellung als Saprophyten sind Hefen jedoch für die Produktion einer ganzen Reihe von Lebensmitteln wie Brot und Backwaren, Wein, Bier, Käse und Kefir unabdingbar. In Kefir produzieren Hefen Ethanol und Kohlendioxid [130], doch können in dem in Deutschland hergestellten „Kefir mild“ sehr häufig keine Hefen nachgewiesen werden [150]. Im Gegensatz zu Brot, Wein und Bier, wo lediglich unterschiedliche Stämme der Art *S. cerevisiae* eingesetzt werden, kommt auf Rotschmierekäsen ein breites Spektrum an Hefen vor [31], unter denen *D. hansenii* jedoch eine vorherrschende Stellung einnimmt [15]. Hefen besiedeln die Oberfläche der Käse und führen sowohl durch die Verstoffwechslung von Lactat als auch die Bildung alkalischer Metabolite durch Proteolyse zu einer Erhöhung des pH-Wertes [130]. Lipolyse und Proteolyse tragen ferner zur Bildung von Aroma gebenden Komponenten bei [31] und durch die Anhebung des pH-Wertes sowie die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wird die Entwicklung der bakteriellen Reifungsflora beschleunigt [31, 130]. So konnte gezeigt werden, dass *Brevibacterium linens* isoliert von Limburger Käse zum Wachstum Pantothen säure benötigt, die durch eine vom selben Käse isolierte Hefe synthetisiert wurde [31].

### 2.2.2 Coryneforme Bakterien

Coryneforme Bakterien spielen bei der Reifung sogenannter Rotschmierekäse wie Tilsiter, Romadur, Limburger, Münster, Appenzeller oder Bergkäse eine übergeordnete Rolle. Sie sind maßgeblich an der Entwicklung des z.T. sehr kräftigen Aromas und der in der Regel orange-roten bis hellbraunen Farbe beteiligt [14, 114]. Die am häufigsten vertretenen Gattungen sind *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Brachybacterium*, *Corynebacterium* und *Microbacterium* [15, 20, 22, 46, 93, 107, 129, 143], wobei die sogenannte „Hausflora“ eines Unternehmens wesentlichen Einfluss auf die Zusammensetzung hat. Bei Rotschmierekäsen, die nach der traditionellen Methode des Alt-Jung-Schmierens hergestellt werden, kommen keine definierten Organismen zum Einsatz, sondern die Reifungsflora wird beim Schmieren der Käse mit Salzlake von den älteren auf die jungen Käse übertragen. Dies bietet den Vorteil, dass die Organismen bereits gut an das vorherrschende Milieu adaptiert sind, birgt jedoch das Risiko des Transfers unerwünschter oder gar pathogener Organismen wie *Listeria monocytogenes* [119]. Um dies zu vermeiden, wird immer häufiger auf das Alt-Jung-Schmierens verzichtet und es werden alternativ die Käse nach dem Salzbad mit einer definierten Reifungskultur bestehend aus Hefen und *B. linens* beimpft [10]. Diese Kultur reflektiert jedoch nicht die komplexe, in der Regel aus mehreren Organismen zusammengesetzte Flora und berücksichtigt auch nicht die Tatsache, dass für die Ausprägung der typisch orange-roten Farbe nicht unbedingt *B. linens* verantwortlich sein muss [15, 107]. Aus diesem Grund wird seit einiger Zeit an der Entwicklung komplexer definierter Reifungskulturen gearbeitet [14].

### 2.2.3 Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien werden für die Produktion einer Vielfalt an Lebensmitteln technologisch genutzt. Sie sind an der Herstellung von Rohwurst, Sauerteig, Sauerkraut, Gewürzgurken, Oliven, Sojasauce und verschiedensten fermentierten Milchprodukten wie Käse, Joghurt oder Quark maßgeblich beteiligt [91, 120].

Bei der Herstellung von Käse kommen Organismen der Gattungen *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* und *Enterococcus* zum Einsatz [10]. Sie werden in der Regel

als definierte Starterkulturen zugegeben, doch kommen auch hochbewährte, in ihrer Zusammensetzung unbekannte Kulturen zum Einsatz, was in nicht unerheblichem Maß zur Produktvielfalt in diesem Segment beiträgt [8]. Die Funktion der Starterorganismen ist primär die Säuerung der Milch durch Bildung von Milchsäure, doch tragen sie auch durch bei der Autolyse freigesetzte intrazelluläre Peptidasen zur Reifung der Käse bei [10, 13, 33]. Die Flora der Milchsäurebakterien in Käse besteht jedoch nicht allein aus den eingesetzten Startern, sondern auch aus der sogenannten „Sekundärflora“, die nicht an der Säuerung beteiligt, wohl aber bedeutsam für die Reifung der Käse ist [10, 33]. Im Fall von Rohmilchkäse ist sie natürlicher Bestandteil der Milchflora, bei Käsen aus pasteurisierter Milch dagegen kommt sie als Rekontamination in das Produkt [10]. Jordan & Cogan [75] haben zudem über eine erhöhte Temperaturreistenz eines *Lb. paracasei*-Stammes berichtet, die dafür spricht, dass dieser die Pasteurisierung in geringen Zahlen überleben und sich dann im Käse wieder entwickeln könnte.

### 3. Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit behandelt die Anwendung der FTIR-Mikrospektroskopie auf die Identifizierung lebensmittelrelevanter Mikroorganismen, wobei folgende Vorgehensweise nahe lag: Zunächst wurde am Beispiel der Hefen die Methode standardisiert und der Einfluss verschiedener Parameter wie Koloniedurchmesser oder relativer Feuchte der Umgebungsluft auf die Qualität der Spektren evaluiert. Daraufhin erfolgte die Erstellung von Datenbanken mit Referenzspektren für drei unterschiedliche taxonomische Gruppen – Hefen, coryneforme Bakterien und Milchsäurebakterien – sowie jeweils die Optimierung der Parameter für die Identifizierung. Die Datenbanken für coryneforme Bakterien und Milchsäurebakterien wurden dann im dritten Abschnitt der Arbeit auf die Populationsanalyse mikrobieller Reifungskonsortien angewandt. Im Zuge dieser Anwendung erfolgte die Untersuchung der Reifungsflora zweier unterschiedlicher oberflächengereifter Rotschmierenkäse und einer undefinierten Säuerungskultur für Emmentaler Käse.



## II. Material und Methoden

### 1. Referenzstämmen

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Mikroorganismen drei verschiedener taxonomischer Gruppen – Hefen, coryneforme Bakterien und Milchsäurebakterien – gearbeitet. Im Anhang 1-3 finden sich Aufstellungen über alle verwendeten Referenzstämmen.

#### 1.1 Stammhaltung

##### 1.1.1 Verwendete Medien

Die Anzucht der Mikroorganismen zum Zweck der Messung im FTIR-Spektrometer erfolgte auf folgenden standardisierten Medien:

Hefen:	YGC (Yeast-Glucose-Chloramphenicol)-Agar (Merck)
Coryneforme:	TS (Trypton-Soja)-Agar (Oxoid), Synonym: CASO (Casein-pepton-Sojamehlpepton)-Agar
Milchsäurebakterien:	APT (All purpose medium mit Tween®)-Agar (Merck).

Von jedem Medium wurde eine größere Menge derselben Charge gelagert, um möglichst reproduzierbare Bedingungen zu gewährleisten, und vor dem Kauf einer neuen Charge wurde diese zunächst gegen die zur Neige gehende auf vergleichbare Ergebnisse getestet. Die untersuchten Chargen waren ausschließlich der Kultivierung für die FTIR-Spektroskopie vorbehalten.

Für die Anzucht der Organismen im Rahmen der Stammhaltung war ein Test der Agarchargen nicht notwendig. Hefen wurden auf YGC-Agar (Merck) mit 10 mg/l Bromphenolblau (YGCB), coryneforme Bakterien auf CASO-Agar (Roth) und Milchsäurebakterien auf APT-Agar (Merck) kultiviert.

Die Herstellung der Medien erfolgte nach den Angaben des jeweiligen Herstellers. Die Platten wurden mit einem Agarklav und einer angeschlossenen Gießmaschine (beide IBS Integra Biosciences), mit  $22 \pm 1$  g Medium pro Platte gegossen.

### 1.1.2 Reaktivierung von Stämmen aus der Gefriertrocknung

#### Verwendete Medien:

Hefen und Coryneforme:

<u>Hefe-Dextrose-Bouillon (HDB)</u>	Caseinpepton	10 g
	Hefeextrakt	3 g
	D(+)-Glucose · H <sub>2</sub> O	5 g
	Aqua dest.	1000 ml

Abfüllung in Reagenzröhrchen zu je 8 ml

Autoklavieren bei 121°C für 15 min

Milchsäurebakterien:

<u>APT-Bouillon (APT<sub>B</sub>)</u>	Caseinpepton	12,5 g
	Hefeextrakt	7,5 g
	D(+)-Glucose · H <sub>2</sub> O	10 g
	NaCl	5 g
	Tri-Natriumcitrat · 2 H <sub>2</sub> O	5 g
	Di-Kaliumhydrogenphosphat	5g
	Tween 80	0,2 g
	Magnesiumsulfat · 7 H <sub>2</sub> O	0,8 g
	Manganchlorid · 4 H <sub>2</sub> O	0,14 g
	Eisen(II)-sulfat · 7 H <sub>2</sub> O	40 mg
	Thiaminiumdichlorid	10 mg
	Aqua dest.	1000 ml

Einstellen des pH-Werts auf  $6,7 \pm 0,1$

Abfüllung in Reagenzröhrchen zu je 8 ml

Autoklavieren bei 121°C für 15 min

Die zum Zweck der langfristigen Lagerung lyophilisierten und gefriergetrockneten Stämme wurden zunächst in 1 ml Bouillon suspendiert. Ausgehend von dieser Suspension wurde ein Reinigungsausstrich gemacht, 0,5 ml der Suspension mit den verbliebenen 7 ml Bouillon verdünnt und die restlichen 0,5 ml auf eine Agarplatte gegeben. Die Inkubation erfolgte bei der jeweils optimalen Temperatur von 27°C für Hefen, 30°C für coryneforme Bakterien und mesophile Milchsäurebakterien und 37°C für thermophile Milchsäurebakterien. Ausgangspunkt für die weitere Kultivierung war der Reinigungsausstrich. Im Fall dass dieser nur unzureichendes Wachstum der Mikroorganismen aufwies, wurde auf die Bouillon oder die auf einer Agarplatte verteilte Zellsuspension zurückgegriffen. Zur Zurückerlangung ihrer vollen Stoffwechselaktivität wurden die Organismen anschließend ein weiteres Mal auf Agar passagiert.

### 1.1.3 Reaktivierung von Stämmen aus Glycerinstocks

In Glycerinstocks bei -70°C gelagerte Mikroorganismen wurden aus dem noch gefrorenen Stock mit einer Platinöse auf Agarmedium ausgestrichen und bei der jeweils optimalen Temperatur inkubiert (s.o.). Auch hier wurde eine weitere Passage angeschlossen.

## 1.2 Stammlagerung

Referenzstämmen sowie neue Isolate wurden in Glycerinstocks konserviert.

<u>Suspensionsmedium</u>	Natriumglutamat	10 g
	Lactose · H <sub>2</sub> O	16 g
	Agar	1 g
	Ascorbinsäure	0,1 g
	Glycerin	120 g
	Leitungswasser	ad 1000 ml

Abfüllung in Reagenzröhrchen zu 5 ml

Autoklavieren bei 121°C für 15 min.

Reichlich Zellmaterial eines frischen Massenausstriches wurden in Suspensionsmedium eingerührt und in zwei Cryo-Röhrchen abgefüllt. Nach einer Inkubation über Nacht im

Kühlschrank, bei der die Zellen Gelegenheit haben, das Glycerin und alle weiteren protektiven Substanzen aufzunehmen, wurden die Organismen bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2. FTIR-Spektroskopie

### 2.1 FTIR-Makrospektroskopie

#### 2.1.1 Probenvorbereitung und Messung

Ausgangsmaterial für die Probenaufbereitung waren maximal eine Woche alte Ausstriche, die im Fall der Milchsäurebakterien unter anaeroben Bedingungen gelagert wurden. Einige Kolonien wurden abgenommen und für Hefen auf einer Drittelplatte bzw. für coryneforme Bakterien und Milchsäurebakterien auf einer halben Platte mit einem Drigalski-Spatel verteilt. Die Inkubationsbedingungen waren wie folgt:

Hefen:  $24 \pm 0,5$  h bei  $27^{\circ}\text{C}$ , aerob

Coryneforme Bakterien:  $24 \pm 0,5$  h bei  $30^{\circ}\text{C}$ , aerob

Milchsäurebakterien:  $48 \pm 0,5$  h bei  $30^{\circ}\text{C}$  im Anaerobiertopf mit Anaerocult (Merck).

Anschließend wurde aus der Mitte des entstandenen Zellrasens für Hefen eine kleine Öse (1 mm Durchmesser), für Bakterien eine große Öse (2 mm Durchmesser) Material abgenommen und in  $100\ \mu\text{l}$  Aqua dest. suspendiert.  $35\ \mu\text{l}$  dieser Suspension wurden auf eine Probenposition des ZnSe-Probenrades aufgetragen und bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 50-60 Minuten, je nach Belegung des Probenrades, getrocknet. Die Messung erfolgte im IFS 28B Spektrometer (Bruker) mit den Messparametern  $6\ \text{cm}^{-1}$  Auflösung, 10 kHz scan speed, Apodisation Blackman-Harris 3-term und Zerofilling 4. Für jedes Spektrum wurden 32 Interferogramme gemittelt.

#### 2.1.2 Physiologische Tests zur Identifizierung von Milchsäurebakterien

##### Verwendete Medien:

APTB                      Rezept siehe oben

MRS-Glucose-Bouillon (MRSGB)

Caseinpepton	10 g
Fleischextrakt	5 g
Hefeextrakt	5 g
D(+)-Glucose · H <sub>2</sub> O	20 g
Tween 80	1 ml
di-Kaliumhydrogenphosphat	2 g
Natriumacetat · 3 H <sub>2</sub> O	5 g
Ammoniumsulfat	1 g
Magnesiumsulfat · 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
Mangansulfat · 4 H <sub>2</sub> O	50 mg
Aqua dest.	1000 ml

Einstellen des pH-Werts auf 5,5

Abfüllung in Reagenzröhrchen mit Durhamröhrchen zu je 8 ml

Autoklavieren bei 121°C für 15 min

MRS-Pentose-Bouillon (MRSPB)

Caseinpepton	10 g
Fleischextrakt	5 g
Hefeextrakt	5 g
Tween 80	1 ml
di-Kaliumhydrogenphosphat	2 g
Natriumacetat · 3 H <sub>2</sub> O	5 g
Ammoniumsulfat	1 g
Magnesiumsulfat · 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
Mangansulfat · 4 H <sub>2</sub> O	50 mg
Bromkresolpurpurlösung (0,4% w/v)	10 ml
Aqua dest.	1000 ml

Einstellen des pH-Werts auf 6,5

Abfüllung in Reagenzröhrchen zu je 9 ml

Autoklavieren bei 121°C für 15 min

Zugabe von 1 ml Pentosenlösung (sterilfiltriert) pro Röhrchen:

Ribose	10 g
Xylose	10 g
L-Arbinose	10 g
Aqua dest.	ad 100 ml

#### M17-Citrat-Bouillon (M17CB)

M17-Bouillon (Merck)	42,5 g
Diammoniumcitrat	25 g
Aqua dest.	1000 ml

Einstellen des pH-Werts auf 5,5

Abfüllung in Reagenzröhrchen mit Durhamröhrchen zu je 8 ml

Autoklavieren bei 121°C für 15 min

#### NaCl (6,5%)-Bouillon

Caseinpepton	5 g
Sojapepton	5 g
Fleischextrakt	5 g
Hefeextrakt	2,5 g
Lactose · H <sub>2</sub> O	5 g
Ascorbinsäure	0,5 g
Magnesiumsulfat · 7 H <sub>2</sub> O	0,25 g
NaCl	65 g
Aqua dest.	1000 ml

Einstellen des pH-Werts auf 6,9 ± 0,2

Abfüllung in Reagenzröhrchen zu je 8 ml

Autoklavieren bei 121°C für 15 min

Für die Identifizierung der Milchsäurebakterien war zusätzlich die Durchführung einiger physiologischer Tests notwendig. Zunächst musste mikroskopisch die Zugehörigkeit zu den Kokken oder Stäbchen festgestellt werden, wobei kokkoide Stäbchen wie *Leuconostoc* oder *Weissella* in beiden Varianten enthalten waren. Für jede dieser Gruppen waren dann folgende Eigenschaften zu bestimmen:

- Stäbchen:     Gasbildung aus Glucose in MRSGB bei 30°C  
              Säurebildung aus Pentosen in MRSPB bei 30°C
- Kokken:       Wachstum in APTB bei 45°C  
              Wachstum in NaCl (6,5%)-Bouillon bei 37°C  
              Gasbildung aus Glucose in MRSGB bei 30°C  
              Gasbildung aus Citrat in M17CB bei 30°C.

### 2.1.3 Auswertung und Identifizierung der Spektren

#### Hefen

Die Datenauswertung erfolgte nach den von Kümmerle et al. [83] festgelegten Parametern mit der Referenzdatenbank für Hefen. Es wurde die zweite Ableitung der Spektren berechnet, mit einem Neun-Punkte-Polynom geglättet und drei spektrale Fenster von 3.030-2.830  $\text{cm}^{-1}$ , 1.350-1.200  $\text{cm}^{-1}$  und 900-700  $\text{cm}^{-1}$  mit jeweils einer Gewichtung von eins und einem Replevel von 30 für die Identifizierung und Clusteranalyse herangezogen. Die maximal zulässige spektrale Distanz zwischen Referenz- und Testspektrum (entspricht der Hitqualität) war 1,0. Darüber hinaus gehende Werte indizierten mögliche Missidentifizierungen.

#### Coryneforme Bakterien

Die Auswertung erfolgte nach den Parametern von Oberreuter et al. [108] mit der Referenzdatenbank für coryneforme Bakterien und Staphylokokken. Die mit neun Punkten geglättete erste Ableitung der Spektren mit folgender Kombination spektraler Fenster und Gewichtungen wurde verwendet:

**Tabelle 2: Spektrale Fenster mit Gewichtung und Reprolevel zur Identifizierung coryneformer Bakterien.**

Spektrales Fenster	Gewichtung	Reprolevel
3.000-2.800 cm <sup>-1</sup>	0,8	3,3
1.800-1.500 cm <sup>-1</sup>	0,8	5
1.500-1.200 cm <sup>-1</sup>	0,9	20
1.200-900 cm <sup>-1</sup>	0,9	33
900-700 cm <sup>-1</sup>	0,9	116

Die maximale Hitqualität für eine valide Identifizierung betrug 1,5.

### Milchsäurebakterien

Für die Auswertung der Milchsäurebakterien wurden die Parameter der Hefen übernommen. Die Referenzdatenbank ist in insgesamt sechs Subbibliotheken unterteilt, drei für Stäbchen und drei für Kokken, wobei die Wahl der passenden Subbibliothek über die Auswertung der oben beschriebenen physiologischen Merkmale getroffen wird. Tabellen 3 und 4 fassen die Auswahlkriterien zusammen.

**Tabelle 3: Wahl der FTIR-Subbibliothek anhand physiologischer Merkmale zur Identifizierung von Milchsäurebakterien (Stäbchen und kokkoide Stäbchen)<sup>a</sup>**

Organismen	Gas aus Glucose	Säure aus Pentosen	FTIR- Subbibliothek
Obligat homofermentative Laktobazillen	-	-	MSB S2
Fakultativ heterofermentative Laktobazillen	-	+	MSB S3
Obligat heterofermentative Laktobazillen	+	+	MSB S1
<i>Leuconostoc</i>	+	(-)	MSB S1
<i>Weissella</i>	+	(-)	MSB S1

<sup>a</sup> +, positiv; -, negativ; (-) überwiegend negativ; MSB, Milchsäurebakterien; S, Stäbchen



**Tabelle 4: Wahl der FTIR-Subbibliothek anhand physiologischer Merkmale zur Identifizierung von Milchsäurebakterien (Kokken und kokkoide Stäbchen)<sup>a</sup>**

Organismen	Wachstum bei 45°C	Wachstum in 6,5% NaCl	Gas aus Glucose	Gas aus Citrat	FTIR-Subbibliothek
<i>Streptococcus thermophilus</i>	+	-	-	-	MSB K1
<i>Enterococcus</i> sp.	+	+	-	-	MSB K2
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis/cremoris</i>	-	-	-	-	MSB K2
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i>	-	-	-	+	MSB K2
<i>Leuconostoc</i> sp.	-	-	+	±	MSB K3
<i>Weissella</i> sp.	-	-	+	±	MSB K3

<sup>a</sup> +, positiv; -, negativ; ± variabel, MSB, Milchsäurebakterien; K, Kokken

## 2.2 FTIR-Mikrospektroskopie

### 2.2.1 Probenvorbereitung und Messung

Eine halbe bis eine Öse (1 mm Durchmesser) Zellmaterial einer nicht älter als eine Woche alten Ausgangskultur wurden in 100 µl Leitungswasser suspendiert und eine Verdünnungsreihe mit ebenfalls Leitungswasser angelegt. Die Suspension wurde so ausgelegt, dass nur jeweils die vierte oder fünfte Verdünnungsstufe ausplattiert werden musste. Die Inkubation erfolgte unter den nachfolgenden Bedingungen:

Hefen:	24 ± 0,5 h, 25°C, aerob
Coryneforme:	20, 30 und 48 h (jeweils ± 0,5 h), 30°C, aerob
Milchsäurebakterien:	15, 24 und 40 h (jeweils ± 0,5 h), 34°C, im Anaerobiertopf mit Anaerocult (Merck).

Zu jedem der angegebenen Zeitpunkte wurden die Mikrokolonien mit Hilfe einer Stempelvorrichtung von der Agarplatte auf ein ZnSe-Probenfenster mit 25 mm Durchmesser überführt (Abb. 7A-C). Die Messung erfolgte in Transmission am IRscope II gekoppelt an ein IFS 28B Spektrometer (beide von Bruker). Um den Einfluss der Wasserdampfabsorption auf geringem Niveau zu standardisieren, war der Objektisch des Mikroskops durch ein Kunststoffgehäuse von der Umgebungsluft getrennt (Abb. 7D). Dieses wurde mit ge-

trockener Luft gespült und die relative Feuchte des Innenraums somit auf 5-10% reguliert. Vor jeder Messung wurden die Mikrokolonien auf dem Probenträger mindestens 30 Minuten in dieser kontrollierten Atmosphäre getrocknet.

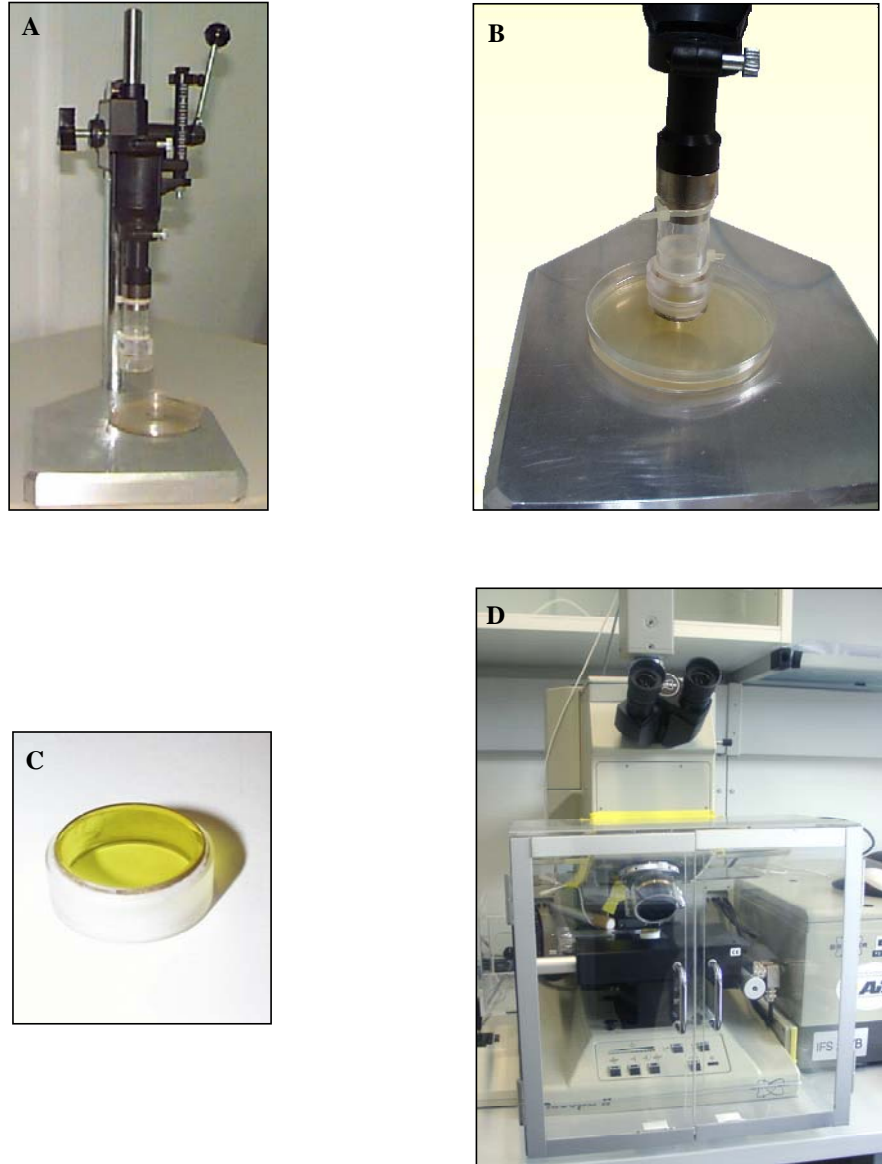


Abb. 7: Vorrichtung zum Transfer der Mikrokolonien von der Agarplatte auf den ZnSe-Probenträger (A+B), Probenträger (C) und Gehäuse zur Erzeugung einer kontrollierten Luftfeuchte (D).

Der computergesteuerte Objektisch des IRscopes ermöglichte die Erfassung der exakten Position der Mikrokolonien auf dem Probenfenster, die zunächst im visuellen Modus des

Mikroskops markiert und anschließend im Infrarotmodus mit den Einstellungen 6  $\text{cm}^{-1}$  Auflösung, 20 kHz scan speed, Apodisation Blackman-Harris 3-term und zerofilling 4 automatisiert gemessen wurden. Für jedes Spektrum wurden 128 Interferogramme gemittelt.

### 2.2.2 Auswertung der Spektren

#### Hefen

Für die Datenauswertung wurden zunächst die Parameter der FTIR-Makrospektroskopie übernommen. Später wurde als viertes spektrales Fenster der Bereich von 1.800-1.710  $\text{cm}^{-1}$  mit einer Gewichtung von eins und einem Reprolevel von 30 hinzugefügt.

#### Coryneforme Bakterien

Die Datenauswertung erfolgte analog zur FTIR-Makrospektroskopie.

#### Milchsäurebakterien

Die Identifizierung der Spektren erfolgte mit der ersten Ableitung und der Kombination von sechs spektralen Fenstern: 3.000-2.800  $\text{cm}^{-1}$ , 1.660-1.500  $\text{cm}^{-1}$ , 1.420-1.400  $\text{cm}^{-1}$ , 1.360-1.200  $\text{cm}^{-1}$ , 1.180-1.090  $\text{cm}^{-1}$  und 950-700  $\text{cm}^{-1}$  mit einer Gewichtung von eins und einem Reprolevel von 30.

### 2.2.3 Erstellung der Datenbanken

Von jedem Stamm wurden mindestens drei unabhängige Wiederholungsmessungen durchgeführt und jeweils zwischen vier und zehn Mikrokolonien gemessen. Drei repräsentative Spektren, eines von jedem Ansatz, wurden dann zu einem Mittelwertspektrum verrechnet und in die Bibliothek übernommen. Für jede der Organismengruppen wurde eine separate Datenbank erstellt, die die Mittelwertspektren aller Stempelzeitpunkte umfasste.

### 2.2.4 Validierung der Datenbanken

Das Mittelwertspektrum eines Stammes wurde aus der Bibliothek ausgeschlossen – in Fällen, wo für einen Stamm zwei Spektren abgelegt waren, wurden beide ausgeschlossen – und anschließend gegen die Datenbank mit den verbliebenen Spektren identifiziert. Wenn der erste Hit der Hitliste zu einem Mittelwertspektrum der gleichen Spezies gehörte und einen Grenzwert für die spektrale Distanz nicht überschritt, wurde das Ergebnis als korrekt auf der Speziesebene gewertet. Für den Fall, dass der erste Hit zu einem Spektrum der gleichen Gattung aber einer anderen Spezies gehörte, war die Identifizierung richtig auf der Gattungsebene. Identifizierungen mit einer Überschreitung der maximal zulässigen spektralen Distanz wurden als nicht identifiziert gezählt und Ergebnisse mit falschen Identifizierungen im ersten Hit als missidentifiziert gewertet. Der Grenzwert für die spektrale Distanz lag für Hefen und Milchsäurebakterien bei 1,0 und für coryneforme Bakterien bei 1,5.

#### Verbesserung der Identifizierung durch Erhöhung der Spektrenzahl pro Spezies

Die Anzahl der in der Datenbank abgelegten *D. hansenii*-Stämme wurde variiert. Dazu wurden Testsets mit 3, 4, 6, 9, 12, 15, 18 und 21 Stämmen in jeweils 10 verschiedenen Zufallsauswahlen der zur Verfügung stehenden 21 Stämme in die Datenbank inkludiert. Einer der Stämme wurde dann wieder ausgeschlossen und gegen die Datenbank mit den übrigen Spektren identifiziert. Dies wurde für alle Stämme eines jeden Testsets durchgeführt und die Ergebnisse anschließend gemittelt.

## 3. 16S rDNA-Sequenzierung

Eine halbe Öse (1 mm Durchmesser) mit Zellmaterial einer 48 Stunden alten Kultur wurde in 200 µl Milli Q-Wasser (Millipore-Wasser-Aufreinigungssystem, Millipore) suspendiert und mit einigen Zirkoniumsilikatperlen (0,5 mm; Roth) zweimal 45 Sekunden bei 6,5 m/sec im Ribolyser (Hybaid) lysiert. Nach 3,5 Minuten Zentrifugation bei 13.000 U/min wurde der Überstand abpipettiert. Der Reaktionsmix für die PCR bestand aus 8 µl Lysat, je 0,5 µl primer forward [5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC A-3'] (Position 8-26 im

E. coli-Numerierungssystem) und reverse [5'-CGG CTA CCT TGT TAC GAC-3'] (Position 1511-1493 im E. coli-Numerierungssystem), 25 µl Reddy-Mix (ABgene®) und 16 µl Milli Q-Wasser. Die PCR begann mit einem Denaturierungsschritt von 5 Minuten bei 95°C, gefolgt von 30 Zyklen mit 20 Sekunden Denaturierung bei 95°C, Primer-Annealing bei 55°C für 40 Sekunden und 2 Minuten DNA-Synthese bei 72°C. Eine abschließende Elongation der DNA-Fragmente von 2 Minuten bei 72°C beendete die Reaktion. Der Erfolg der durchgeführten PCR wurde mit einer Auftrennung der PCR-Produkte im Agarose-Gel überprüft. 6 µl PCR-Produkt wurden für 40 Minuten im 1%-igen Agarose-Gel bei 90 V aufgetrennt, anschließend 15 Minuten im Ethidiumbromid-Bad gefärbt und die Banden unter UV-Licht detektiert. Nach erfolgreicher PCR wurden die Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen bzw. dem GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit von Pharmacia Biosciences gereinigt und zur abschließenden Sequenzierung zur Firma SequiServe (Vaterstetten, Deutschland) eingesandt. Die Identifizierung der resultierenden Nukleotidsequenzen erfolgte über eine Datenbankrecherche mit BlastN bei NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

## 4. Populationsanalysen

### 4.1 Analyse der Oberflächenreifungsflora von Rotschmierkäse

10 g Käserinde wurden mit 90 ml 2%igem (w/v) Na-Citrat-Puffer 8 Minuten im Stomacher zerkleinert und anschließend eine Verdünnungsreihe mit  $\frac{1}{4}$  konzentrierter Ringerlösung angelegt. Um die Verdünnungsschritte möglichst klein zu halten, wurde ein Aliquot jeder Verdünnungsstufe nochmals 1:1 verdünnt. 100 µl jeder Verdünnung wurden auf CASO-Agar ausplattiert, bei 30°C inkubiert und die Mikrokolonien jeweils nach 20, 30 und 48 Stunden gestempelt. Die Kolonien auf dem Probenträger wurden erst direkt vor der Messung ca. 30 Minuten in kontrollierter Atmosphäre mit 5-10% r. F. getrocknet und nach der Messung sofort in einer Umgebung mit annähernd 100% r. F. rehydriert, um Zellschädigungen aufgrund von Austrocknung so gering wie möglich zu halten. Nach der Messung der Kolonien eines Stempelzeitpunktes erfolgte die Identifizierung der Spektren mit der Datenbank für coryneforme Bakterien und Staphylokokken und eine Auswertung der

Spektren im Dendrogramm. Aus jedem Subcluster wurden repräsentativ einige Spektren ausgewählt und die dazugehörigen Mikrokolonien mit sterilen feuchten Zahnstochern vom Stempel abgenommen und auf CASO-Agar ausgestrichen. Die Platten der hohen Verdünnungsstufen wurden nach vier Tagen Inkubation bei 30°C ins Tageslicht gestellt, um die Pigmentierung der Kolonien zu fördern. Nach weiteren drei Tagen wurden von diesen Platten ebenfalls Kolonien unterschiedlicher Morphologie und Farbe isoliert. Alle Isolate wurden mit FTIR-Makrospektroskopie gemessen und identifiziert und repräsentativ einige Isolate zusätzlich mit 16S rDNA-Sequenzierung identifiziert.

## **4.2 Analyse einer undefinierten Starterkultur für Emmentaler Käse**

Die im Glycerinstock bei -70°C konservierte Starterkultur eines Emmentaler Käses wurde einer Gesamtkeimzahlbestimmung unterzogen. Um eine Unterscheidung zwischen Stäbchen und Kokken vornehmen zu können, wurde MRS-Agar (Oxoid) für die selektive Anzucht der Stäbchen und M17-Agar (Merck) für die selektive Anzucht der Kokken gewählt. Die Inkubationstemperatur lag bei 37°C. Von Platten mit jeweils geeigneter Verdünnung wurden Kolonien gepickt, diese nochmals auf APT-Agar gereinigt und die Isolate dann mit FTIR-Makrospektroskopie identifiziert und differenziert. Anhand der erhaltenen Dendrogramme wurde die Zahl der Isolate eingeschränkt, die verbliebenen Organismen mit FTIR-Mikrospektroskopie gemessen und als Referenzen in der Datenbank hinterlegt.

Aus der laufenden Produktion des Käses wurde jeweils eine Probe vor und nach dem Pressen des Käses genommen. Davon wurden 10 g mit 90 ml 2%igem (w/v) Na-Citrat-Puffer verdünnt, fünf Minuten im Stomacher zerkleinert und dann eine Verdünnungsreihe mit  $\frac{1}{4}$  konzentrierter Ringerlösung angelegt. Wie schon bei der Untersuchung der Oberflächenreifungsfloren erfolgte auch hier eine zusätzliche Verdünnung jeder Verdünnungsstufe um den Faktor 1:1. Aufgrund der großen Zahl der Agarplatten wurde die Inkubation bei 37°C statt der für die Mikrospektroskopie üblichen 34°C vorgenommen, da für diese Temperatur ein größerer Brutschrank zur Verfügung stand. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Kolonien auf den ZnSe-Probenträger überführt und nach halb-

stündiger Trocknung in kontrollierter Atmosphäre bei 5-10% r. F. gemessen. Da ein Teil der erhaltenen Spektren der nach dem Pressen des Käses genommenen Probe mit FTIR-Mikrospektroskopie nicht identifiziert werden konnte, wurden zusätzlich insgesamt 150 Kolonien von einer Agarplatte isoliert und mit FTIR-Makrospektroskopie identifiziert.

## III. Ergebnisse

### 1. Standardisierung der Methode

Bevor mit dem Aufbau von Referenzdatenbanken begonnen werden konnte, galt es, die Parameter der Inkubation festzulegen und die Bedingungen für optimale Messergebnisse zu ermitteln. Hierzu gehören das Wachstumsmedium und die Inkubationstemperatur, welche die stoffliche Zusammensetzung der Zellen maßgeblich beeinflussen, sowie die Inkubationsdauer, die den Durchmesser und auch die Dicke der Kolonien nach dem Transfer auf das Probenfenster determiniert. Zudem musste der Einfluss der Koloniegröße und der Irisblende auf die Spektren erfasst werden. Die Erarbeitung dieser grundlegenden Parameter für die Erzielung qualitativ guter Spektren erfolgte am Beispiel der Hefen, für die anschließend als erste Organismengruppe eine Referenzdatenbank erstellt wurde.

#### 1.1 Bestimmung der optimalen Koloniegröße

Für eine spätere Identifizierung unbekannter Isolate mit einer Referenzdatenbank ist eine gute Reproduzierbarkeit der Methode Grundvoraussetzung. Ein wesentlicher Faktor hierfür ist die Koloniegröße. Zur Ermittlung der Korrelation zwischen Inkubationsdauer, Koloniedurchmesser und Reproduzierbarkeit der Messungen wurden Wachstumskurven erstellt und Kolonien unterschiedlichen Durchmessers gemessen. Abbildung 8A zeigt für sechs verschiedene Hefenspezies Wachstumsverläufe, die z.T. stark differieren. So hat *S. cerevisiae* nach 24 Stunden Inkubation auf YGC-Agar bei 25°C einen Koloniedurchmesser von mehr als 250 µm, während *Kluyveromyces marxianus* in der gleichen Zeit nur 70 µm erreicht. In Abbildung 8B ist der Einfluss der Inkubationsdauer und damit der Koloniegröße auf die Reproduzierbarkeit der Messungen am Beispiel von *S. cerevisiae* dargestellt. Kleinere Kolonien mit 50 µm Durchmesser zeigen in der Clusteranalyse große Unterschiede, die ab einer Größe von 70 µm nur noch geringfügig reduziert werden



können (Abb. 8B). Ab einem Durchmesser von 80  $\mu\text{m}$  scheint das Maximum an Reproduzierbarkeit erreicht, denn auch eine Steigerung auf 120  $\mu\text{m}$  bringt keine weitere Verbesserung.

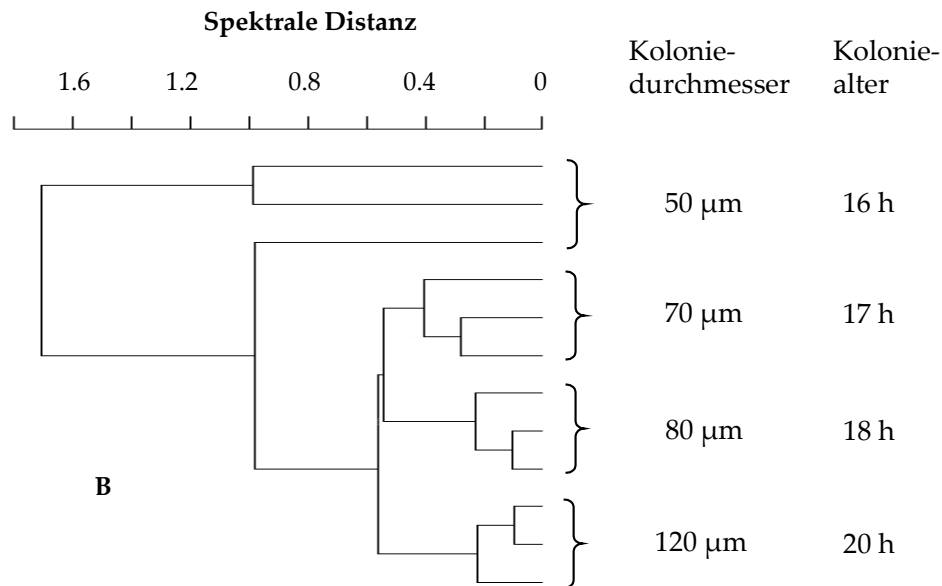
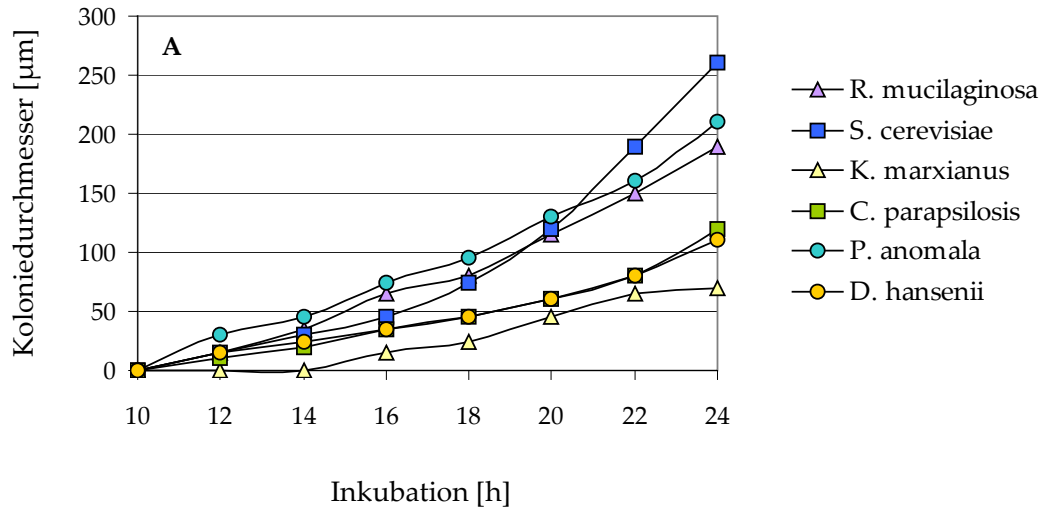


Abb. 8: Koloniedurchmesser sechs verschiedener Hefenarten ermittelt nach unterschiedlich langer Inkubation auf YGC-Agar bei 25°C (A) (für abgekürzte Gattungsnamen siehe Abkürzungsverzeichnis); Korrelation von Koloniedurchmesser und Reproduzierbarkeit der FTIR-Messungen (B). Clusteranalyse von *S. cerevisiae*-Spektren aufgenommen nach unterschiedlich langer Inkubation bei 25°C. Spektrale Fenster 3030-2830  $\text{cm}^{-1}$ , 1350-1200  $\text{cm}^{-1}$  und 900-700  $\text{cm}^{-1}$ , 2. Ableitung, Average linkage, Korrelation mit Normalisierung auf Replevel.

Das Wachstum einer Population ist nie vollkommen uniform und somit liegen zu einem bestimmten Zeitpunkt immer Kolonien unterschiedlicher Größe vor, deren Spektren jedoch gut miteinander vergleichbar sind. Abbildung 9 zeigt die Clusteranalyse von Spektren zweier unterschiedlicher *S. cerevisiae*-Stämme. Der Durchmesser der Mikrokolonien von Stamm A9763 reichte von 110 bis 180  $\mu\text{m}$ , der von Stamm W220 von 110 bis 120  $\mu\text{m}$ . Die Subcluster beider Stämme fusionieren mit Ausnahme des Spektrums SCerW220.1 ungefähr auf gleicher spektraler Distanz bei 0,12; der Koloniedurchmesser spielt demnach ab einem bestimmten Wert eine untergeordnete Rolle. Um bei großen Kolonien von 200-250  $\mu\text{m}$  oder mehr eine zu hohe Absorption außerhalb des linearen Bereiches des Detektors zu vermeiden, wurden diese nicht direkt in der Mitte der Kolonie, sondern am Rand gemessen. Somit erweist sich nur der minimal notwendige Durchmesser von 70  $\mu\text{m}$  als begrenzender Faktor für die Wahl der Koloniegröße.

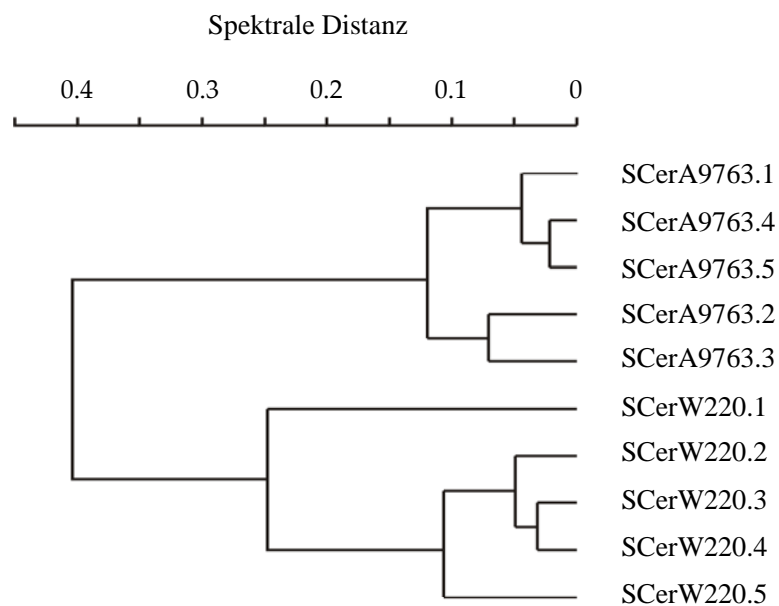


Abb. 9: Clusteranalyse von Spektren zweier unterschiedlicher *S. cerevisiae*-Stämme. Die Koloniegröße bei Stamm SCerA9763 lag zwischen 110 und 180  $\mu\text{m}$ , bei Stamm SCerW220 zwischen 110 und 120  $\mu\text{m}$ . Spektrale Fenster 3030-2830  $\text{cm}^{-1}$ , 1350-1200  $\text{cm}^{-1}$  und 900-700  $\text{cm}^{-1}$ , 2. Ableitung, Average linkage, Korrelation mit Normalisierung auf Replevel.

*K. marxianus* zeigt – wie Abbildung 8A zu entnehmen – das langsamste Wachstum und benötigt zum Erreichen einer Koloniegröße von 70  $\mu\text{m}$  bei 25°C ca. 24 Stunden. Die Inkubationsdauer für die Identifizierung von Hefen wurde demnach auf 24 Stunden festgelegt, da dies auch langsam wachsenden Spezies genügend Zeit gibt, Kolonien ausreichender Größe zu bilden. Dennoch erreichen einige Stämme die minimale Koloniegröße nicht in dieser Zeit und passen somit nicht in das vorgegebene Schema. Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf z.B. 27°C und eine damit einhergehende Beschleunigung des Wachstums macht wenig Sinn, da dann zwar die langsam wachsenden Organismen schneller wachsen würden, die wachstumsstarken Stämme allerdings auch, was die Diskrepanz der Koloniegröße zwischen diesen Organismen zusätzlich vergrößern würde. Dies hätte zur Folge, dass schnell wachsende Stämme in Bereiche kommen, in denen ihre Kolonien zu groß und damit auch zu dick sind, um noch Spektren akzeptabler Güte zu erzielen. Für die Erstellung der Datenbank wurden deshalb Referenzstämme, die ein schwaches Wachstum zeigten, entweder in Abweichung von der Methode einige wenige Stunden länger inkubiert oder von der Aufnahme in die Datenbank ausgeschlossen.

## 1.2 Einfluss der Irisblende auf die Messung

Der MCT-Detektor des IRscope II ist sehr empfindlich und liefert nur in einem begrenzten Signalbereich lineare Messergebnisse [59]. Infolgedessen wird das IR-Signal für die Messung mit einer verstellbaren Irisblende auf die zu messende Kolonie beschränkt und somit über verschiedene Größen der Blende die Intensität des Signals gesteuert. Für die Wahl der passenden Blende galt es, die Auswirkungen unterschiedlicher Blenden auf die Spektren zu erfassen. Abbildung 10 zeigt ein Dendrogramm mit Spektren ein und derselben Kolonie von *C. tropicalis* unter Verwendung unterschiedlich großer Blenden. Die Kolonie hatte einen Durchmesser von 140  $\mu\text{m}$ , so dass acht verschiedene Blenden von 20-120  $\mu\text{m}$  getestet werden konnten. Das Spektrum der kleinsten Blende mit 20  $\mu\text{m}$  fällt weit weg von allen anderen Spektren und auch das der nächstgrößeren mit 30  $\mu\text{m}$  zeigt eine deutliche Distanz. Die Blenden mit 40 und 50  $\mu\text{m}$  bilden ein separiertes Subcluster mit verhältnismäßig geringem Abstand und ab einer Größe von 60  $\mu\text{m}$  sind sich die Spektren hoch ähnlich. Da eine Vielzahl der Stämme nach 24 Stunden Inkubation

Koloniedurchmesser von 90  $\mu\text{m}$  oder mehr aufwies, wurde die Blende mit 80  $\mu\text{m}$  Durchmesser als Standardblende festgelegt, für kleinere Kolonien auf die 60  $\mu\text{m}$ -Blende zurückgegriffen und in den Fällen, wo Kolonien z. B. nicht vollständig rund waren oder Risse aufwiesen, die Blende mit 50  $\mu\text{m}$  Durchmesser verwendet.

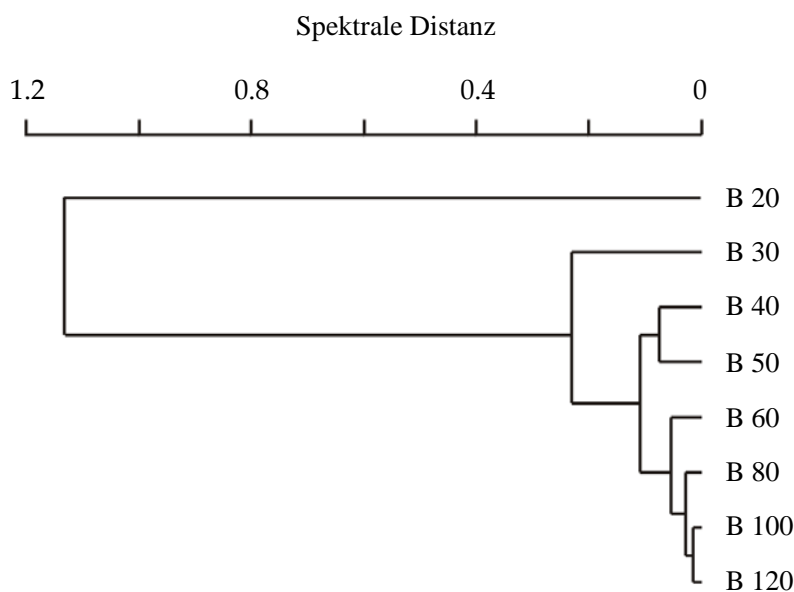


Abb. 10: Einfluss der Blendengröße auf die Reproduzierbarkeit von FTIR-Spektren. Clusteranalyse von Spektren einer 140  $\mu\text{m}$  großen *C. tropicalis*-Kolonie aufgenommen mit Blenden zwischen 20 und 120  $\mu\text{m}$  Durchmesser. Spektrale Fenster 3030-2830  $\text{cm}^{-1}$ , 1350-1200  $\text{cm}^{-1}$  und 900-700  $\text{cm}^{-1}$ , 2. Ableitung, Average linkage, Korrelation mit Normalisierung auf Replevel.

### 1.3 Einfluss der Luftfeuchte auf die Messung

Die Probenhalter werden zur Messung auf dem Objektisch positioniert und sind somit der Umgebungsluft ausgesetzt. Da diese je nach Wetterlage mehr oder weniger Feuchtigkeit enthält, war zu ermitteln, inwiefern sich unterschiedlich hohe Luftfeuchtigkeiten in den Spektren niederschlagen. Um eine kontrollierte Atmosphäre zu erzeugen, wurde der Objektisch mit einem Kunststoffgehäuse von der Umgebung getrennt, das Innere des Gehäuses mit getrockneter Luft gespült und so auf 5-10% r. F. reguliert. Abbildung 11A zeigt eine Clusteranalyse von Spektren drei verschiedener Spezies, gemessen jeweils mit und ohne kontrollierte Atmosphäre.

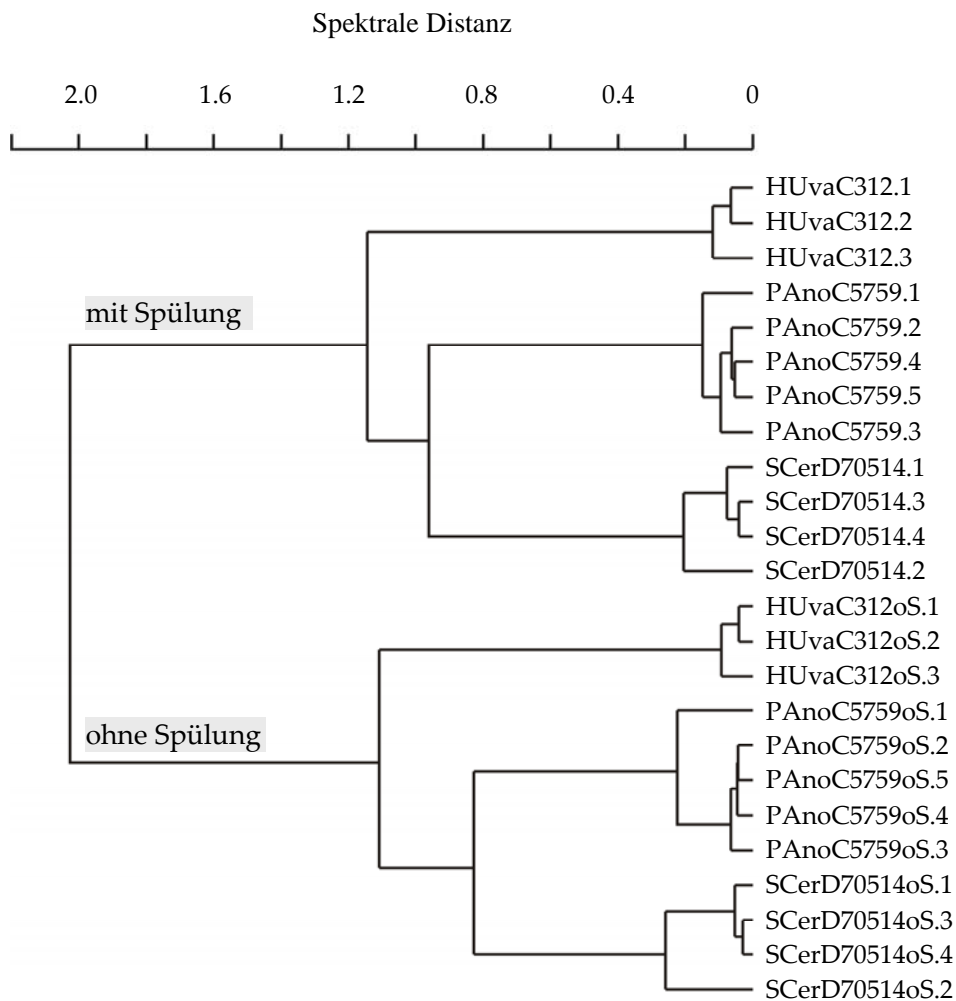


Abb. 11A: Einfluss der Luftfeuchte auf die Reproduzierbarkeit von FTIR-Spektren. Clusteranalyse von Spektren drei unterschiedlicher Hefenarten aufgenommen bei unterschiedlicher r. F. der Umgebungsluft: mit Spülung 5-10%, ohne Spülung ca. 30% r. F..

Die relative Feuchte betrug für die Messungen mit Spülung 5-10% und für die Messungen ohne Spülung ca. 30%. Die Spektren gruppieren sich im Dendrogramm nicht nach Spezieszugehörigkeit, sondern nach Höhe der Luftfeuchte und sind mit einer hohen spektralen Distanz voneinander getrennt. Wie in Abbildung 11B zu sehen ist, unterscheiden sich die ersten Ableitungen der Spektren von *S. cerevisiae*, die mit Spülung aufgenommen wurden (blau), in der Ausprägung ihrer Amplitude von denen ohne Spülung (schwarz). Im Wellenzahlbereich von 1.847-1.837  $\text{cm}^{-1}$  der ersten Ableitung wird die Wasserdampfabsorption bestimmt, die mit der Peakamplitude korreliert (Abb. 11B).

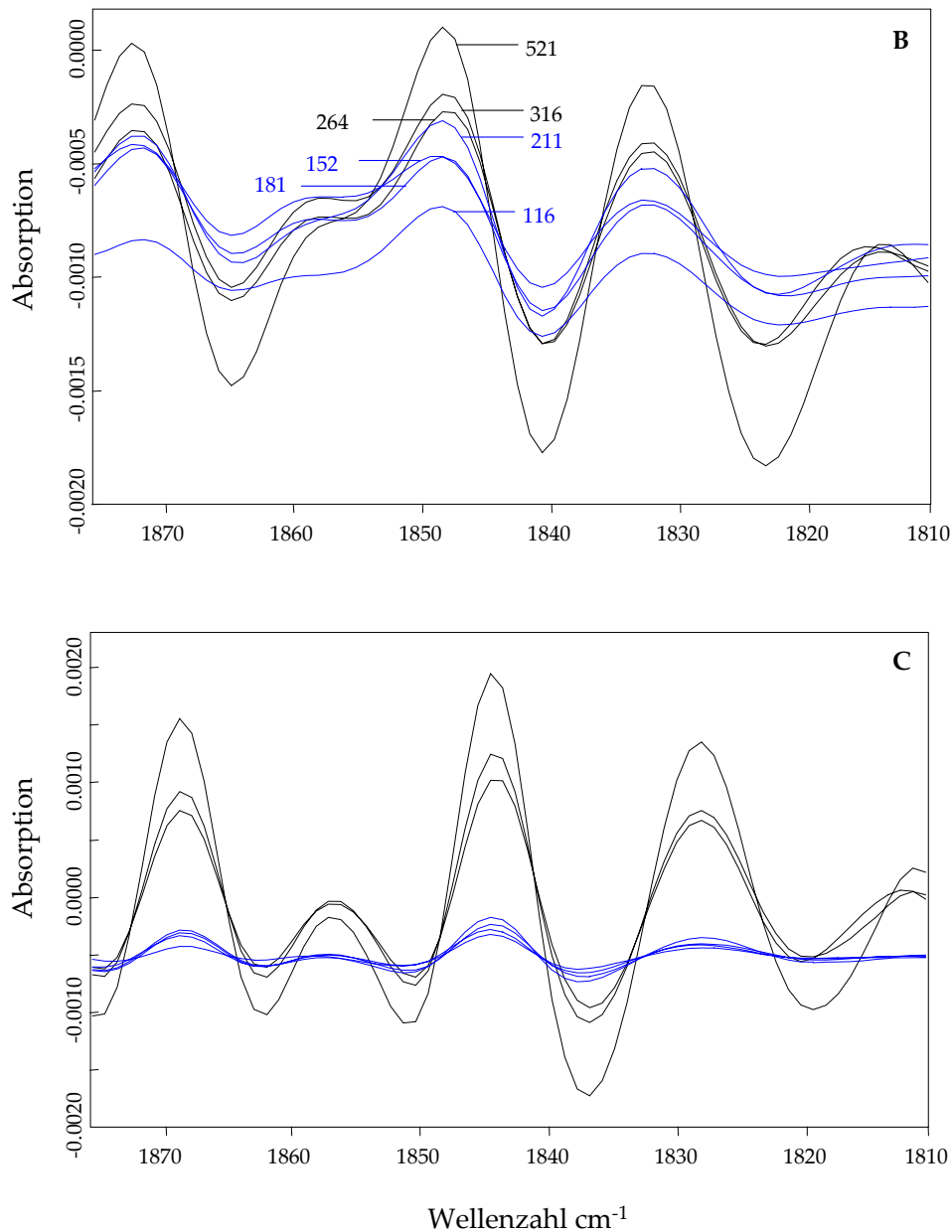


Abb. 11B+C: Vergleich der 1. (B) und 2. (C) Ableitung von Spektren im Bereich von 1875 und 1810 Wellenzahlen  $\text{cm}^{-1}$  aufgenommen mit (blau) und ohne (schwarz) Spülung des Probenraumes mit getrockneter Luft. Die in (B) angegebenen Zahlen entsprechen dem im Bereich von 1847-1837  $\text{cm}^{-1}$  gemessenen Wasserdampf.

Diese Unterschiede verstärken sich in der zweiten Ableitung, die für die Berechnung des Dendrogramms herangezogen wird, deutlich (Abb. 11C). Zusätzlich sind starke Fringes zu sehen, gekennzeichnet durch einen eckigen Kurvenverlauf in den Maxima und Minima. Um dauerhaft konstante Bedingungen und damit eine gute Reproduzierbarkeit der

Methode zu gewährleisten, wurde folglich für alle weiteren Experimente die Spülung des Probenraumes mit getrockneter Luft beibehalten.

## **2. Identifizierung von Mikroorganismen**

Nach der Festlegung von Rahmenbedingungen zur Gewährleistung reproduzierbarer Spektren in Form einer Standardisierung der Probenaufbereitung und der Messparameter erfolgte die Erarbeitung von Referenzdatenbanken und die Bestimmung der für eine zuverlässige Identifizierung optimalen Parameter.

Für eine gute und verlässliche Klassifizierung muss die Verarbeitung der im Spektrum enthaltenen Rohdaten für die jeweilige Organismengruppe bzw. Aufgabenstellung optimiert werden. Hierzu gehört unter anderem die Wahl der spektralen Bereiche, die für eine Unterscheidung den größten Beitrag leisten und auch über die Verwendung der ersten bzw. zweiten Ableitung der Spektren gilt es zu entscheiden. Die Identifizierung hängt ferner stark von der Zusammensetzung der Datenbanken ab, da sich die Anpassung von Mikroorganismen an unterschiedliche Habitate auch in der stofflichen Zusammensetzung ihrer Zellen niederschlägt. Wie Erfahrungen mit FTIR-Makrospektroskopie zeigen, können sich Stämme der gleichen Art, die aus verschiedenen Lebensmitteln oder Milieus isoliert wurden, phänotypisch verhältnismäßig stark unterscheiden. Eine Datenbank sollte demnach für eine treffsichere Identifizierung eine Vielzahl von Spektren unterschiedlicher Stämme einer Spezies umfassen.

### **2.1 Hefen**

#### **2.1.1 Entwicklung und Bewertung der Datenbank**

In die Datenbank für Hefen gingen insgesamt 84 Referenzspektren von 82 Stämmen aus 13 Spezies und neun Gattungen ein (vgl. Anhang 1), wobei v.a. die Arten berücksichtigt wurden, die erfahrungsgemäß am häufigsten als Saprophyten in Sauermilchprodukten auftreten. Für jede Spezies wurden sowohl Stämme aus offiziellen Sammlungen – u.a. die Typstämme – als auch Isolate aus dem Molkereiumfeld ausgewählt. Obwohl die Stämme

zum großen Teil ein gutes bis ausreichendes Wachstum aufwiesen, war in Einzelfällen eine längere Inkubation notwendig und einige Organismen, darunter auch der Typstamm von *S. cerevisiae*, konnten aufgrund zu geringen Wachstums nicht in der Datenbank erfasst werden. Dieses Problem trat fast ausschließlich bei offiziellen Sammlungsstämmen auf, bei institutseigenen Isolaten dagegen nur in einem Fall.

Um den Identifizierungserfolg der FTIR-Mikrospektroskopie und somit die Spezifität der Methode im Vergleich zur FTIR-Makrospektroskopie zu ermitteln, wurde aus 45 Stämmen für jedes System eine Datenbank aufgebaut und einer externen Validierung unterzogen. Die Ergebnisse in Abbildung 12 zeigen mit 67% für die Mikrospektroskopie und 65% für die Makrospektroskopie annähernd äquivalente Identifizierungsraten auf Speziesebe-  
ne und damit für beide Methoden ein ähnliches Leistungsniveau. Unterschiede zwischen beiden Methoden offenbaren sich v.a. im Anteil der aufgrund zu schlechter Hitqualität nicht identifizierten Spektren. Für die Mikrospektroskopie liegt dieser mit 2% relativ niedrig, für die Makrospektroskopie dagegen mit 13% deutlich höher.

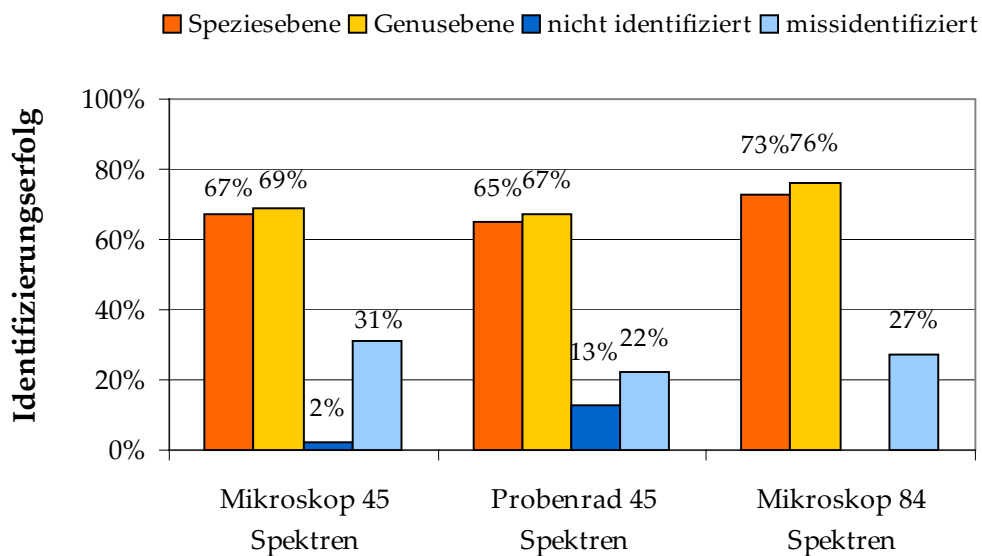


Abb. 12: Vergleich des Identifizierungserfolgs für Hefen ermittelt mit FTIR-Mikrospektroskopie (Mikroskop) und FTIR-Makrospektroskopie (Probenrad) unter Verwendung von 45 Referenzspektren und Mikrospektroskopie mit 84 Spektren in der Datenbank. Identifizierungsparameter: Spektrale Fenster 3030-2830  $\text{cm}^{-1}$ , 1350-1200  $\text{cm}^{-1}$  und 900-700  $\text{cm}^{-1}$ , 2. Ableitung, Korrelation mit Normalisierung auf Replevel.



Bei der Bewertung der Ergebnisse muss beachtet werden, dass der Erfolg stark von der Zusammensetzung der Datenbank abhängt. So fallen die Identifizierungsraten bei kleinen Datensätzen weniger gut aus, da die einzelnen Spezies mit drei bis fünf Vertretern in der Datenbank unterrepräsentiert und in ihrer Variabilität keinesfalls abgedeckt sind. Mit einer Erweiterung der Datenbank auf 84 Spektren konnte der Identifizierungserfolg der Mikrospektroskopie auf 73% gesteigert werden (Abb. 12).

Dieser Ausbau der Datenbank hat Lücken zwischen bereits enthaltenen Stämmen geschlossen und auf diese Weise die Rate der richtigen Identifizierungen gesteigert. Um diesen Effekt zu verdeutlichen wurde die Zahl der *D. hansenii*-Stämme, die aufgrund hoher Heterogenität zwischen einzelnen Formen sehr schlechte oder falsche Identifizierungen erreichen, von drei auf 21 erhöht und die durchschnittliche Identifizierung für Testsets mit 3, 5, 6, 9, 12, 15, 18, und 21 Stämmen in jeweils zehn zufallsbedingt ausgewählten Kombinationen berechnet. Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, steigt die Rate der richtigen Identifizierungen mit zunehmender Zahl der Stämme von durchschnittlich 37% auf 81%, wobei die Standardabweichungen zu Beginn sehr hoch sind, sich aber erwartungsgemäß mit Erhöhung der Spektrenschar stark verringern.

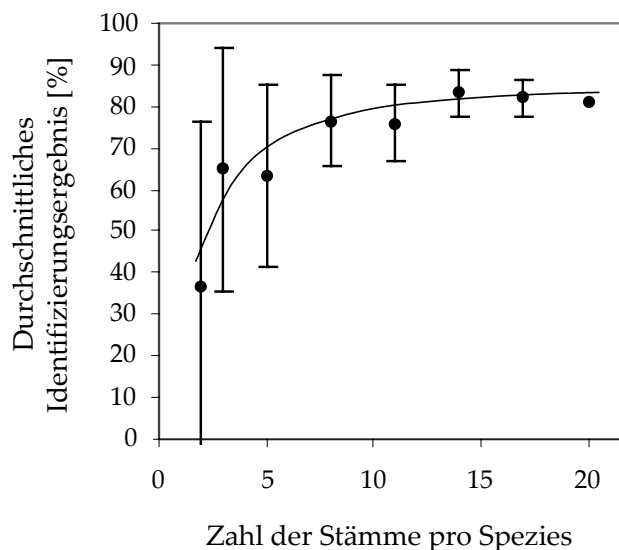


Abb. 13: Abhängigkeit des Identifizierungserfolgs von der Zahl der Referenzstämme in der Datenbank am Beispiel von *D. hansenii*. Jeder Datenpunkt steht für das durchschnittliche Identifizierungsergebnis von zehn zufallsbedingt ausgewählten Kombinationen mit 3, 4, 6, 9, 12, 15, 18 oder 21 Stämmen mit Angabe der Standardabweichung.

Die Erfassung möglichst vieler Stämme einer Art in der Referenzdatenbank wirkt sich somit außerordentlich positiv auf die erzielten Ergebnisse aus.

Bei Betrachtung der Einzelergebnisse der Validierung fällt auf, dass einige Spezies prinzipiell gut zu identifizieren sind, bei anderen hingegen Probleme auftreten. So ergeben sich bei der Typisierung von *C. intermedia*, *C. tropicalis*, *H. uvarum*, *Rhodotorula mucilaginosa* und *S. cerevisiae* keine oder nur sehr wenige Fehlidentifizierungen, bei *C. parapsilosis*, *P. anomala*, *T. delbrueckii* und v.a. *D. hansenii*, *K. marxianus* und *P. guilliermondii* dagegen relativ viele. Es kommt mit dem hier angewandten Klassifizierungssystem offensichtlich zu starken Überschneidungen dieser Arten, die durch eine andere Parameterwahl eventuell vermieden werden könnten.

Zunächst wurde statt der zweiten die erste Ableitung der Spektren für eine Identifizierung herangezogen; diese ergab allerdings statt der erhofften Verbesserung eine deutliche Verschlechterung der Ergebnisse von 73% auf 63% richtige Identifizierungen. Als Alternative wurden die Spektren bzw. deren zweite Ableitungen einer detaillierten visuellen Analyse unterzogen, bei der sich herausstellte, dass diese Arten im Amidbereich von 1.800-1.710  $\text{cm}^{-1}$  z.T. deutliche Unterschiede aufzeigen. In Abbildung 14 sind die Ableitungen von *D. hansenii* WSYC 491 und *P. guilliermondii* CBS 2030 T dargestellt, die mit der bisherigen Parameterkombination kaum zu unterscheiden waren und Fehlidentifizierungen verursachten. Beide sind sich hochähnlich, jedoch zeigt *D. hansenii* bei 1.753 und 1.720  $\text{cm}^{-1}$  jeweils einen zusätzlichen Peak, wo bei *P. guilliermondii* ein Plateau bzw. nur die Andeutung eines Peaks zu beobachten ist. Diese beiden zusätzlichen Unterschiede ermöglichen nun eine bessere Differenzierung, die zumindest bei *D. hansenii* WSYC 491 in einer richtigen Identifizierung resultiert. Eine Validierung der Bibliothek mit den um diesen Bereich erweiterten spektralen Fenstern verbesserte den Identifizierungserfolg um 7% auf 80%.

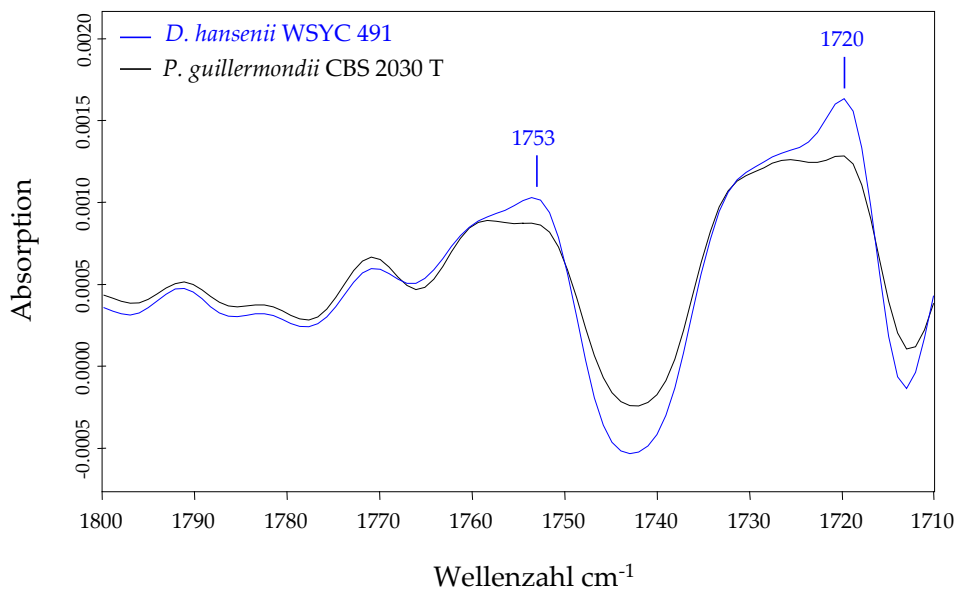


Abb. 14: Vergleich der 2. Ableitung von *D. hansenii* WSYC 491 und *P. guillermondii* CBS 2030 T im Bereich von 1800-1710 Wellenzahlen cm<sup>-1</sup>. Gekennzeichnet sind zwei Unterschiede bei 1753 cm<sup>-1</sup> und 1720 cm<sup>-1</sup>.

### 2.1.2 Typisierung von Hefen auf Stammniveau

Neun Stämme der Art *S. cerevisiae* und 21 der Art *D. hansenii* wurden einer Identifizierung auf Stammebene unterzogen, um die Möglichkeiten einer Stammtypisierung und damit die Spezifität der FTIR-Mikrospektroskopie zu evaluieren. Abbildung 15 zeigt jeweils drei Wiederholungsmessungen sechs verschiedener Stämme von *D. hansenii* und *S. cerevisiae*. In jedem Fall bilden unabhängige Wiederholungsmessungen eines Stammes ein Subcluster, das sich klar von Subclustern anderer Stämme aus gleicher oder fremder Spezies abhebt. Für jeden Stamm dieser beiden Arten, der in der Datenbank enthalten war, wurde eine vierte unabhängige Wiederholungsmessung durchgeführt und die resultierenden Spektren gegen die Bibliothek identifiziert. Es ergab sich mit 92% für *S. cerevisiae* und 91% für *D. hansenii* jeweils eine sehr hohe Quote richtiger Identifizierungen.

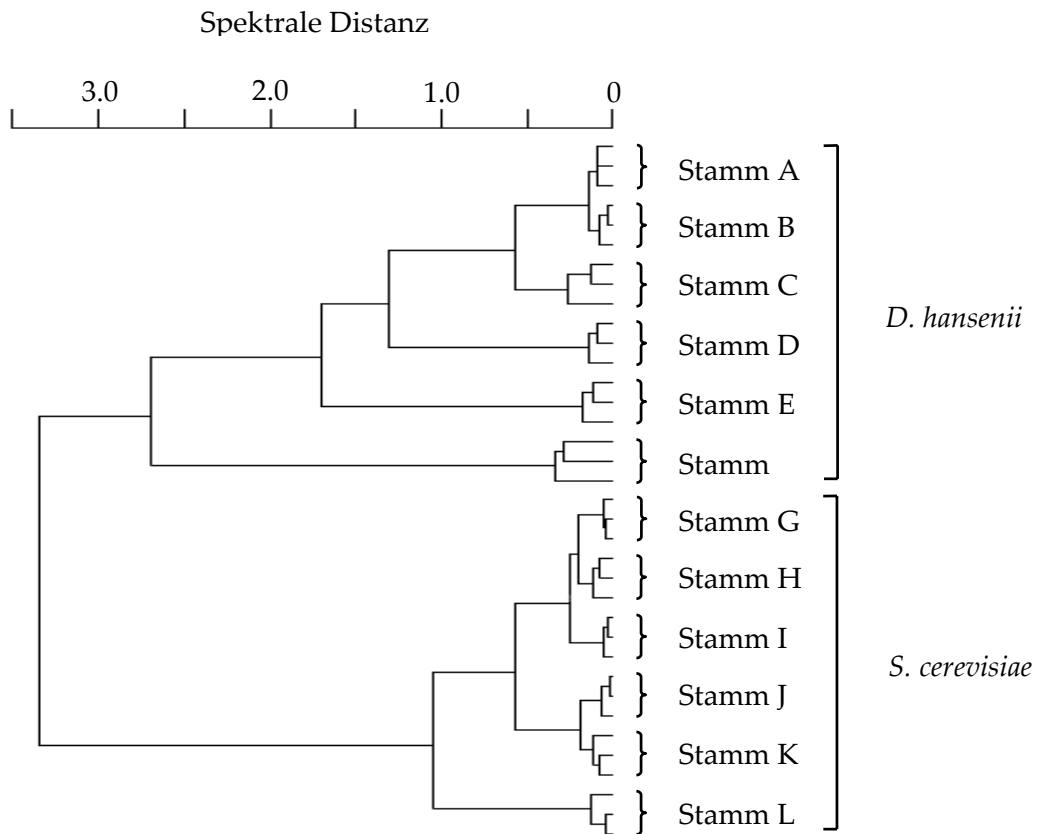


Abb. 15: Clusteranalyse von drei unabhängigen Wiederholungsmessungen jeweils sechs unterschiedlicher *D. hansenii*- und *S. cerevisiae*-Stämme. Spektrale Fenster 3030-2830  $\text{cm}^{-1}$ , 1350-1200  $\text{cm}^{-1}$  und 900-700  $\text{cm}^{-1}$ , 2. Ableitung, Average linkage, Korrelation mit Normalisierung auf Replevel.

## 2.2. Coryneforme Bakterien

Als zweite Organismengruppe wurden die coryneformen Bakterien bearbeitet, die im Lebensmittel als Reifungsorganismen für Rotschmierkäse eine herausragende Stellung einnehmen.

### 2.2.1 Kultivierung und Transferzeitpunkte

Ausgehend von den Erfahrungen bei der Entwicklung der Hefenbibliothek sollte für die Aufnahme qualitativ guter Spektren der Koloniedurchmesser mindestens 70  $\mu\text{m}$  betragen. Dieses konnte für den Großteil der coryneformen Stämme bestätigt werden.

Abbildung 16 zeigt die Koloniegroße einiger Organismen der Gattungen *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, und *Corynebacterium* nach unterschiedlich langer Inkubation bei 30°C auf CASO-Agar. Aufgrund der hohen Diversität der Wachstumsgeschwindigkeiten war es nicht möglich, einen für alle Stämme gültigen Zeitpunkt für den Transfer der Mikrokolonien auf den Probenträger zu bestimmen, stattdessen wurden die drei Zeitpunkte 20, 30 und 48 Stunden gewählt.

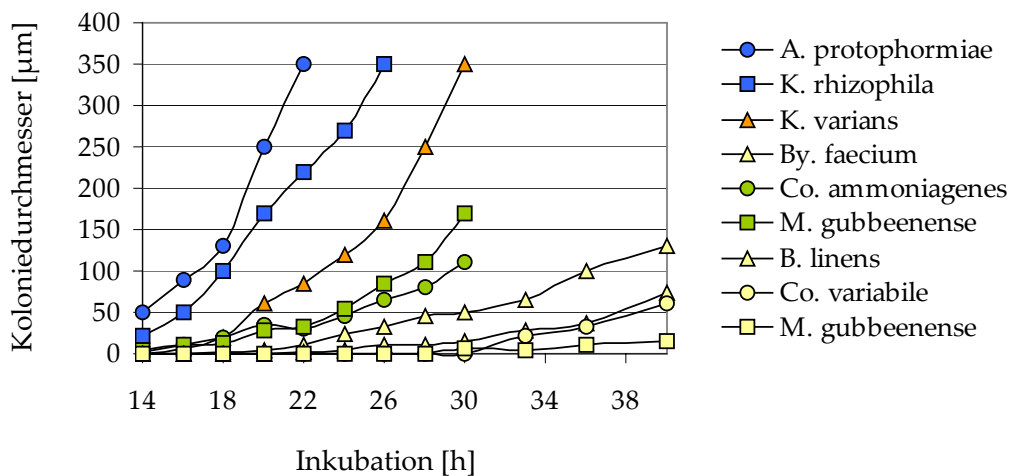


Abb. 16: Koloniedurchmesser neun verschiedener coryneformer Stämme ermittelt nach unterschiedlich langer Inkubation auf CASO-Agar bei 30°C (für abgekürzte Gattungsnamen siehe Abkürzungsverzeichnis). Die Zuordnung zu den drei Zeitpunkten für den Kolonietransfer ist farblich markiert: blau: 20 h, grün: 30 h, orange: 20 und 30 h, gelb: 48 h.

Diese decken sowohl die schnell (blau) als auch die langsamer (gelb) wachsenden Arten ab und liegen zudem günstig für praktische Anwendungen der Methode, da bei einem Start der Inkubation um ca. 12.00 Uhr alle Zeitpunkte für den Kolonietransfer zwischen 8.00 und 18.00 Uhr liegen. Stämme, die zu zwei Zeitpunkten geeignete Koloniegroßen erreichten, wurden an beiden Zeitpunkten gestempelt und mit zwei Spektren in der Datenbank abgelegt. Für die in Abbildung 16 dargestellten Stämme trifft dies auf *Kocuria varians* zu (orange). Zwar liegt der dargestellte Wert bei 20 Stunden Inkubation unter 70 µm, er repräsentiert jedoch nicht den maximal erreichten Durchmesser zu diesem Zeitpunkt, sondern den des überwiegenden Teils der Kolonien. Ein geringer Teil der Kolonien ist auch hier schon 70 µm oder größer und wurde in der Datenbank erfasst.

### 2.2.2 Entwicklung und Bewertung der Datenbank

In die Datenbank wurden insgesamt 82 Spektren aus 17 Spezies und neun Gattungen aufgenommen (vgl. Anhang 2). Sie gehörten zu 65 Stämmen, von denen 17 mit jeweils zwei Spektren in der Bibliothek vertreten sind. Für jede Spezies wurden Stämme aus offiziellen Sammlungen inklusive der Typstämme aufgenommen und mit von der Oberfläche von Käsen isolierten und identifizierten Bakterien ergänzt. Da ältere Kulturen coryneformer Organismen im mikroskopischen Bild häufig eine kokkoide Zellform aufweisen und aufgrund dessen eine Verwechslungsgefahr mit Staphylokokken besteht, wurden auch zwei Arten der Gattung *Staphylococcus* in die Datenbank eingeschlossen. Einige Stämme, unter ihnen auch der Typstamm von *B. linens*, konnten nicht berücksichtigt werden, da sie ein zu geringes Wachstum aufwiesen, als dass sie nach 48 Stunden Inkubation ausreichend große Koloniedurchmesser erreicht hätten. Zudem hafteten die Kolonien eines Stammes von *Rathayibacter tritici* so stark an der Agaroberfläche, dass es nicht möglich war, sie auf den ZnSe-Kristall zu überführen.

Zur Wahl der optimalen Parameter für die Datenverarbeitung und zur gleichzeitigen Evaluierung des Identifizierungserfolges galt es zunächst, eine Modelldatenbank mit 58 Referenzspektren von 49 Stämmen aus 14 Spezies unter Anwendung verschiedener Kombinationen von erster oder zweiter Ableitung und unterschiedlichen spektralen Fenstern zu testen. Die erste Fensterkombination mit drei Bereichen von  $3.030\text{-}2.830\text{ cm}^{-1}$ ,  $1.350\text{-}1.200\text{ cm}^{-1}$  und  $900\text{-}700\text{ cm}^{-1}$  wurde von der Identifizierung der Hefen adaptiert [83], die zweite mit fünf Bereichen von  $3.000\text{-}2.800\text{ cm}^{-1}$ ,  $1.800\text{-}1.500\text{ cm}^{-1}$ ,  $1.500\text{-}1.200\text{ cm}^{-1}$ ,  $1.200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$  und  $900\text{-}700\text{ cm}^{-1}$  von der Identifizierung der coryneformen Bakterien mit FTIR-Makrospektroskopie [108]. In Abbildung 17 ist der durchschnittliche Identifizierungserfolg für zwei dieser Varianten dargestellt. Die zweite Ableitung mit drei spektralen Fenstern ergab 60% richtige Identifizierungen auf Speziesebene und die Kombination von erster Ableitung mit den fünf Fenstern und der Gewichtung der Coryneformenidentifizierung erzielte mit 67% richtigen Identifizierungen die besten Ergebnisse. Diese Parameterkombination wurde als Standardmethode festgelegt, obgleich das Ergebnis nicht zufrieden stellend ist.

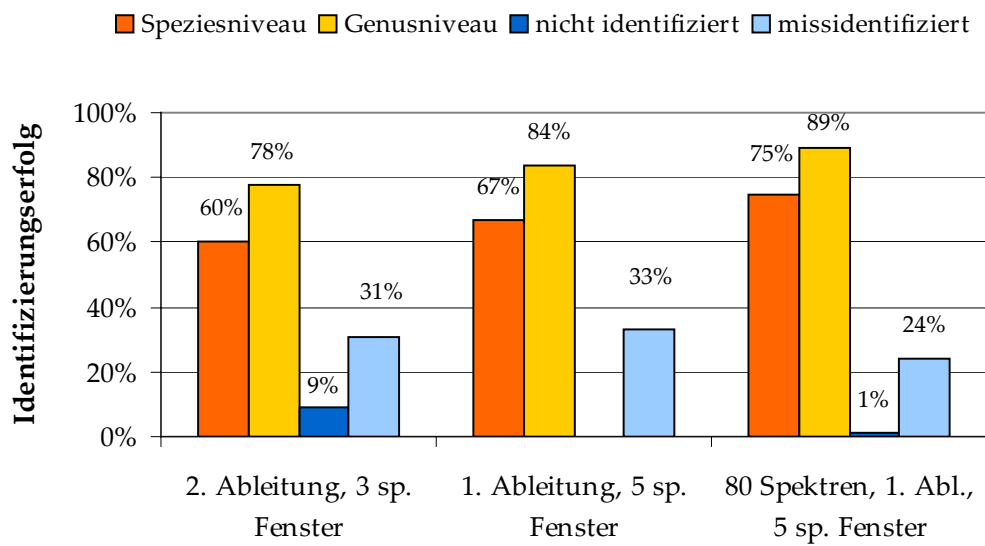


Abb. 17: Vergleich des Identifizierungserfolgs für coryneforme Bakterien ermittelt mit unterschiedlichen Kombinationen von Ableitung und spektralen Fenstern. Identifizierungsparameter: 3 spektrale Fenster nach Kümmerle et al. [83], 5 spektrale Fenster nach Oberreuter et al. [108], Korrelation mit Normalisierung auf Replevel. Die Ergebnisse der linken und mittleren Variante basieren auf 58 Spektren, die der rechten auf 80 Spektren.

Die Quote der Identifizierungen auf Genusebene von 84% zeigt, dass die Hälfte der falschen Identifizierungen auf Gattungsebene die richtige Klassifizierung ergaben, eine ausreichende Trennung der einzelnen Spezies jedoch nicht erfolgte. Eine Erweiterung der Datenbank auf 80 Spektren von 64 Stämmen aus 16 Spezies verbesserte den Identifizierungserfolg auf Speziesebene auf 75% (Abb. 17), verschiedene Änderungen der spektralen Fenster jedoch brachten keine Verbesserung der Ergebnisse. Die Art *Corynebacterium casei* war mit lediglich einem Stamm zu zwei Zeitpunkten in der Datenbank vertreten und wurde deshalb von der Auswertung ausgeschlossen, da sie zwangsläufig nur durch sich selbst identifiziert werden konnte.

## 2.3 Milchsäurebakterien

### 2.3.1 Kultivierung und Transferzeitpunkte

Das dritte Taxon, für das eine Referenzdatenbank erstellt werden sollte, waren die Milchsäurebakterien, die in mesophile und thermophile Organismen unterteilt werden. Aufgrund dieser Tatsache war zu erwarten, dass sich die Erfassung vieler für die Produktion

von Lebensmitteln relevanter Spezies in einem Protokoll nicht unproblematisch gestalten wird. Dennoch wurde im Hinblick auf eine möglichst gute Praktikabilität und später durchzuführende Populationsanalysen der Versuch unternommen, eine Trennung der Organismen in verschiedene Protokolle mit unterschiedlichen Inkubationstemperaturen oder Wachstumsmedien zu vermeiden.

Die Anzucht der Organismen erfolgte auf APT-Agar (Merck), auf dem sowohl die stäbchenförmigen als auch die kokkoiden Milchsäurebakterien sehr gut wachsen. Die Wahl der Temperatur fiel zunächst auf 30°C, um auch *Leuconostoc* mit einem Temperatur-optimum von 20 bis 30°C gute Bedingungen zu bieten. Die Wachstumskurven in Abbildung 18 zeigen ein stark unterschiedliches Wachstum der verschiedenen Spezies auf APT-Agar bei 30°C, dennoch erreicht ein großer Teil der getesteten Stämme ausreichende Koloniegößen innerhalb von 15 bis 20 Stunden.

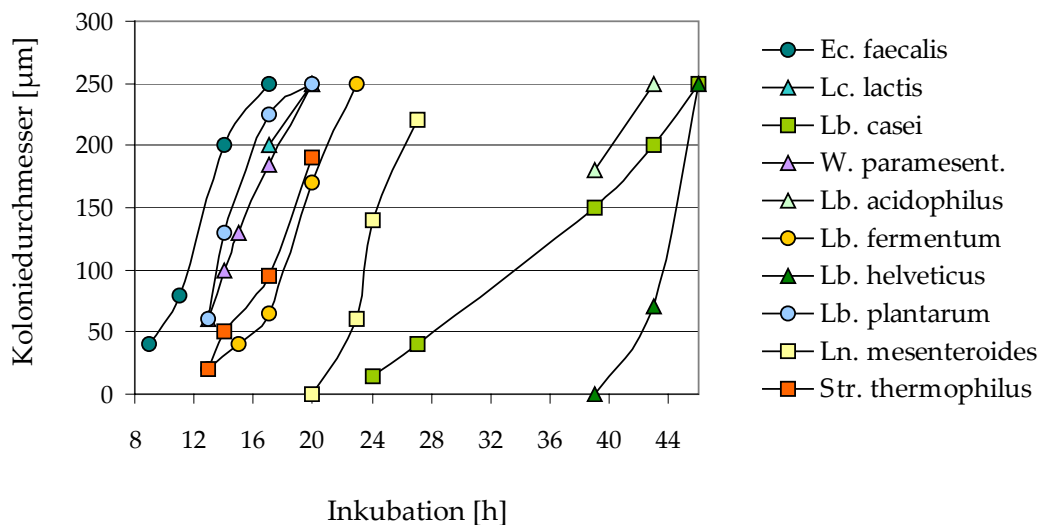


Abb. 18: Koloniedurchmesser zehn verschiedener Milchsäurebakterien ermittelt nach unterschiedlich langer Inkubation auf APT-Agar bei 30°C (für abgekürzte Gattungsnamen siehe Abkürzungsverzeichnis).

Einige Vertreter der thermophilen Fraktion wie *Lb. delbrueckii* wachsen jedoch bei 30°C nur sehr langsam bis gar nicht und sind somit in der Darstellung nicht erfasst. Infolgedessen wurde die Inkubationstemperatur schrittweise erhöht, um das Wachstum der thermophilen Organismen zu stimulieren, die mesophilen – im Besonderen *Leuconostoc mesen-*



*teroides* – jedoch nicht an die Grenze ihrer Belastbarkeit zu bringen. Bei 34°C zeigten beide Gruppen ausreichendes Wachstum, wobei v.a. kokkoide Organismen wie *Enterococcus faecalis*, *Lc. lactis* oder *Weissella paramesenteroides* nach 15 Stunden Koloniegrößen von 100 µm oder mehr erreichten. Dennoch waren neben dem Zeitpunkt bei 15 Stunden noch zwei weitere Transferzeitpunkte nach 24 und 40 Stunden notwendig. Dies lag neben der langsameren Wachstumsgeschwindigkeit einiger Stämme auch im Adhäsionsverhalten der Kolonien bestimmter Arten wie *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus* und *Lb. delbrueckii* zum ZnSe-Probenfenster begründet. Obwohl die Kolonien auf der Agarplatte nach 24 Stunden bereits ausreichend große Durchmesser erreicht hatten, blieben die obersten Zellschichten nur bruchstückhaft oder gar nicht am ZnSe haften (Abb. 19). Nach längerer Inkubation resultierten einige Stämme in stark löchrigen Kolonieabdrücken, die nur im Zentrum eine geschlossene Zellfläche aufwiesen, andere blieben dagegen relativ gut am Probenfenster haften. So erklärt sich auch die Wachstumskurve von *Lb. acidophilus* in Abbildung 18. Bei einigen Stämmen war jedoch auch nach 40 Stunden Inkubation kein Transfer von der Platte auf den Probenträger möglich, weshalb diese nicht in die Datenbank aufgenommen werden konnten.

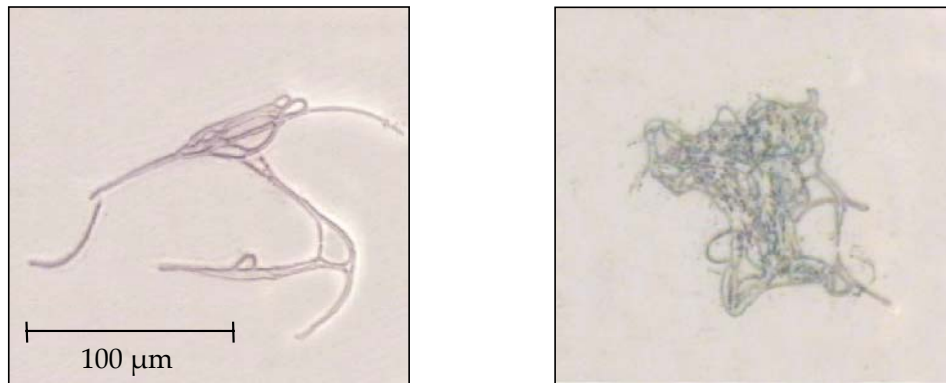


Abb. 19: Unvollständige Kolonieabdrücke von *Lb. delbrueckii* nach dem Transfer auf den ZnSe-Probenhalter.

### 2.3.2 Entwicklung und Bewertung der Datenbank

Insgesamt wurden 82 Spektren von 77 Stämmen aus 19 Spezies und fünf Gattungen in die Referenzdatenbank aufgenommen, wobei die Arten *Lb. delbrueckii* und *Lc. lactis* mit je-

weils drei Subspezies vertreten waren (vgl. Anhang 3). Mit Ausnahme der Spezies *Lc. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetyllactis* waren alle Arten mit ihrem Typstamm repräsentiert und wurden – wo möglich – mit weiteren Stämmen aus offiziellen Stammsammlungen und Isolaten aus Lebensmitteln ergänzt. Für die sechs Arten *Lb. curvatus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. reuteri*, *W. confusa*, *W. paramesenteroides* und *W. viridescens* waren neben den Typstämmen keine weiteren Vertreter verfügbar. Diese Arten sind folglich mit nur jeweils einem Stamm in der Datenbank abgelegt und können bei einer externen Validierung zwangsläufig nicht identifiziert werden, weshalb sie bei der Ermittlung des Identifizierungserfolges keine Berücksichtigung fanden.

Nach einer visuellen Analyse der Spektren verschiedener Spezies erfolgte die Festlegung von sechs spektralen Fenstern von 3.000-2.800  $\text{cm}^{-1}$ , 1.660-1.500  $\text{cm}^{-1}$ , 1.420-1.400  $\text{cm}^{-1}$ , 1.360-1.200  $\text{cm}^{-1}$ , 1.180-1.090  $\text{cm}^{-1}$  und 950-700  $\text{cm}^{-1}$  für die Identifizierung (Abb. 20).

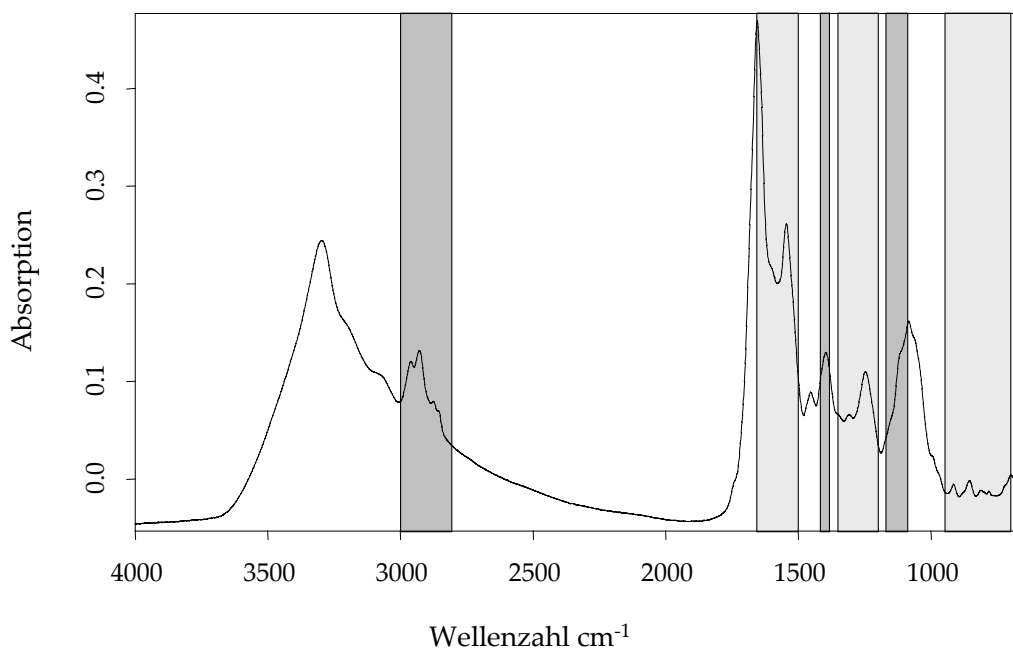


Abb. 20: Spektrum von *Lb. delbrueckii* mit Kennzeichnung der für die Identifizierung von Milchsäurebakterien selektierten Wellenzahlbereiche 3.000-2.800  $\text{cm}^{-1}$ , 1.660-1.500  $\text{cm}^{-1}$ , 1.420-1.400  $\text{cm}^{-1}$ , 1.360-1.200  $\text{cm}^{-1}$ , 1.180-1.090  $\text{cm}^{-1}$  und 950-700  $\text{cm}^{-1}$ .

Diese wurden dann in Kombination mit der ersten oder zweiten Ableitung unter Verwendung von 44 Referenzspektren von 40 Stämmen und zehn Spezies auf ihren Identifi-

zierungserfolg getestet. Die erste Ableitung stellte sich wie schon bei den coryneformen Bakterien als bessere Alternative heraus und war mit 73% richtigen Identifizierungen auf Speziesebene der zweiten Ableitung mit 57% deutlich überlegen (Daten nicht gezeigt). Auf Gattungsniveau konnten zudem 87% der Spektren richtig klassifiziert werden. Verschiedene Variationen der gewählten spektralen Fenster führten zu keinen Verbesserungen in der Identifizierungsrate und auch ein Ausbau der Datenbank auf 76 Spektren von 71 Stämmen aus 13 Spezies brachte nur geringfügige Fortschritte (Abb. 21A). In Abbildung 21A werden die Ergebnisse für die Stäbchen respektive die Kokken gesondert aufgeführt, wobei alle Arten der Gattung *Lactobacillus* den Stäbchen und alle übrigen Arten den Kokken zugeordnet wurden. Zudem ist neben den Identifizierungsergebnissen für die Spezies- und Gattungsebene auch der Identifizierungserfolg auf Subspeziesebene für die Arten *Lb. delbrueckii* und *Lc. lactis* dargestellt, der für beide Gruppen 50% beträgt. Deutlichere Unterschiede zeigen sich in der Identifizierungsrate auf Speziesebene, die mit 93% für die Kokken um genau 30% höher liegt als für die Stäbchen. Die Identifizierungen auf Gattungsebene sind mit 96% für beide Gruppen äquivalent.

Bei genauerer Betrachtung der falsch identifizierten Spektren fällt auf, dass annähernd 40% der Fehlidentifizierungen bei *Lb. casei* und *Lb. paracasei* auftreten. So werden alle fünf Stämme von *Lb. casei* als *Lb. paracasei* identifiziert und umgekehrt zwei *Lb. paracasei* als *Lb. casei*; eine korrekte Trennung beider Arten mit den hier angewandten Parametern scheint folglich nicht möglich zu sein. Diese Problematik beschränkt sich allerdings nicht nur auf FTIR-Mikrospektroskopie, sondern wird bereits seit längerer Zeit kontrovers diskutiert. So forderten Dellaglio et al. 2002 die Vereinigung der Stämme von *Lb. casei* und *Lb. paracasei* unter dem Namen *Lb. casei* und die Ablehnung des Namens *Lb. paracasei* [40]. Vor diesem Hintergrund wurden die Stämme dieser beiden Spezies in der Referenzdatenbank unter dem Namen *Lb. casei* zusammengefasst und auf diese Weise die Rate der richtigen Identifizierungen von 74% auf 83% gesteigert (Abb. 21B).

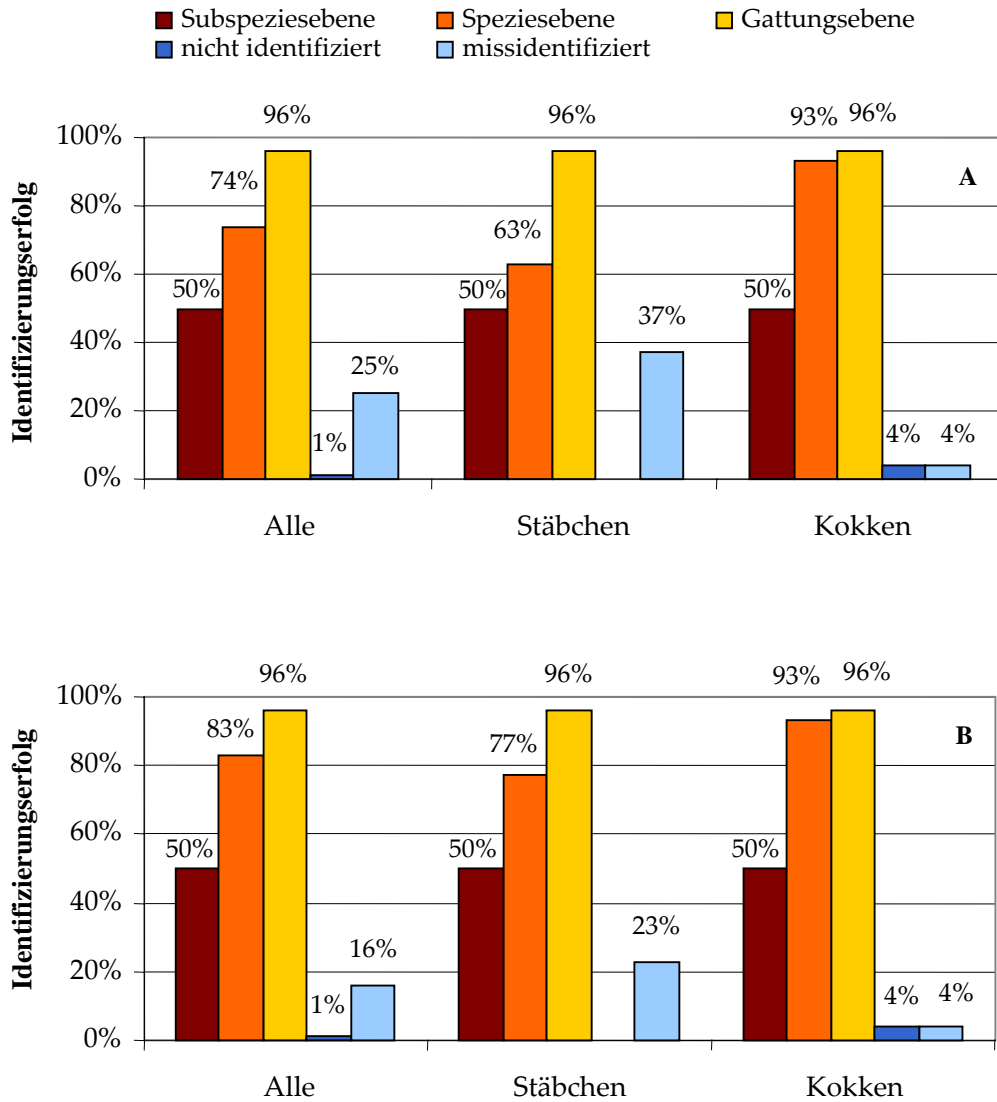


Abb. 21: Identifizierungserfolg für Milchsäurebakterien vor (A) und nach Integration der Stämme von *Lb. paracasei* in die Art *Lb. casei* (B); links für die gesamte Datenbank und rechts aufgeschlüsselt nach Stäbchen und Kokken. Die Stämme der drei Subspezies von *Lb. delbrueckii* und *Lc. lactis* wurden auch auf Subspeziesebene identifiziert. Identifizierungsparameter: Spektrale Fenster 3.000-2.800  $\text{cm}^{-1}$ , 1.660-1.500  $\text{cm}^{-1}$ , 1.420-1.400  $\text{cm}^{-1}$ , 1.360-1.200  $\text{cm}^{-1}$ , 1.180-1.090  $\text{cm}^{-1}$  und 950-700  $\text{cm}^{-1}$ , 1. Ableitung, Korrelation mit Normalisierung auf Reprolevel.

### 3. Populationsanalysen mit FTIR-Mikrospektroskopie

Die Tatsache, Mikroorganismen mit FTIR-Mikrospektroskopie ohne vorherige Isolation aus einer Probe über die Messung von Mikrokolonien identifizieren zu können, eröffnet die Möglichkeit, mikrobielle Populationen auch in quantitativer Hinsicht zu analysieren. Der hohe Automatisierungsgrad der Methode gestattet zudem die Generierung großer Datenmengen in sehr kurzer Zeit, was die Anwendung dieser Technik auf eine Analyse technologisch wichtiger mikrobieller Konsortien, deren Kontrolle mit alternativen Methoden sehr aufwendig wäre, nahe legt. In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Populationen untersucht: zwei Reifungskonsortien von oberflächengereiftem Käse und eine undefinierte Starterkultur für Emmentaler Käse.

#### 3.1 Analyse der Reifungsflora von Vorarlberger Bergkäse

Die Oberflächenreifungsflora eines Vorarlberger Bergkäses, ein Hartkäse, sollte analysiert werden und gleichzeitig als Praxistest für die erarbeitete Datenbank für coryneforme Bakterien und Staphylokokken dienen, die zum Stand der Untersuchung 65 Referenzspektren umfasste. Die Gesamtkeimzahl der Flora betrug  $3,5 \times 10^8$  Kbe/cm<sup>2</sup> Rinde. Analog zu den gewählten Transferzeitpunkten für die Erstellung der Datenbank erfolgte auch die Analyse der Käseflora zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Insgesamt wurden 1098 Spektren aufgenommen, von denen 82 nach visueller Kontrolle aufgrund zu geringer Qualität von der Auswertung ausgeschlossen werden mussten. Die verbliebenen 1015 Spektren – 584 nach 20 Stunden, 211 nach 30 Stunden und 220 nach 48 Stunden – wurden mit der Datenbank für coryneforme Bakterien und Staphylokokken identifiziert und die Korrektheit dieser Identifizierungen mit 213 Isolaten überprüft, die mit FTIR-Makrospektroskopie und exemplarisch mit 16S rDNA-Sequenzierung identifiziert wurden.

Abbildung 22 zeigt die Clusteranalyse aller 220 nach 48 Stunden aufgenommenen Spektren. Insgesamt wurden sechs verschiedene Spezies in der Flora detektiert und nur fünf der 1015 Spektren konnten nicht identifiziert werden. *Staphylococcus equorum* war mit

25,5% in der Flora repräsentiert, *Co. casei* mit 32,3%, *Co. variabile* mit 8,2%, *Arthrobacter casei* mit 11,4%, *Brachybacterium alimentarium* mit 2,7% und *B. linens* mit 17,7%.

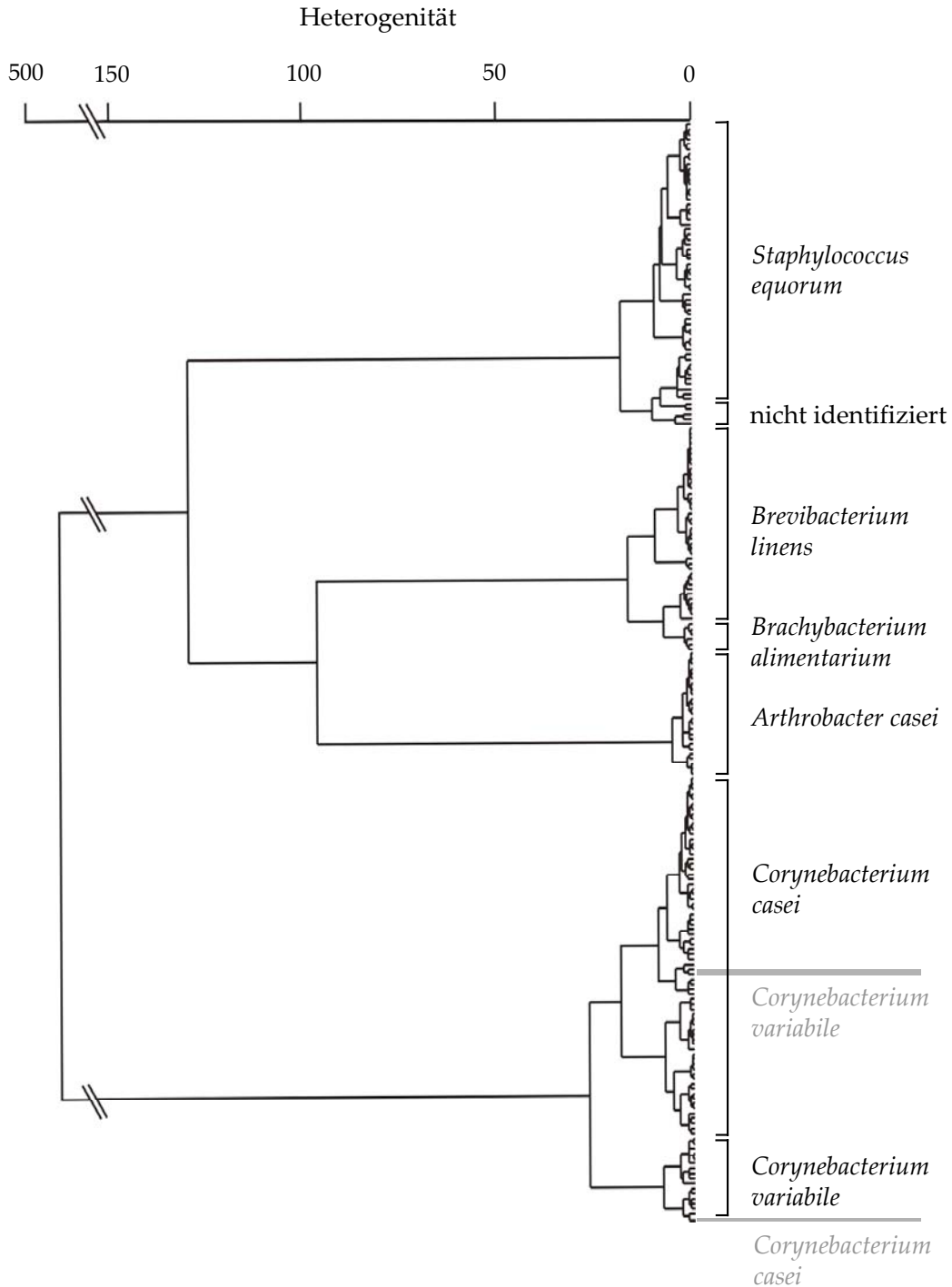


Abb. 22: Zusammensetzung der Oberflächenreifungsflora von Vorarlberger Bergkäse ermittelt nach 48 h Inkubation. Die Identifizierung der Spektren jedes Clusters ist in schwarz angegeben; falsch gruppierte Spektren sind grau gekennzeichnet. Identifizierungsparameter: nach Oberreuter et al. [108], Ward's Algorithmus.

Mit Ausnahme von *A. casei* konnten alle Identifizierungen der FTIR-Mikrospektroskopie mit FTIR-Makrospektroskopie und 16S rDNA-Sequenzierung bestätigt werden. Die Spektren von *A. casei* wurden als zu einer Art zugehörig gefunden, da sie in der Clusteranalyse ein klar separiertes Subcluster formten (Abb. 22), konnten allerdings mit FTIR-Mikrospektroskopie nicht identifiziert werden, da diese Spezies nicht in der Datenbank vertreten war. Die korrekte Identifizierung erfolgte hier mit 16S rDNA-Sequenzierung. Die Identifizierung der 16S-Sequenzen von *A. casei* über eine Datenbankrecherche bei NCBI ergab eine hundertprozentige Ähnlichkeit zu zwei Sequenzen (Accession no. AJ535636 und AJ535637), die als neue Spezies mit dem Namen *A. casei* sp. nov. vorgeschlagen werden. Eine Beschreibung dieser Spezies ist bis dato nicht veröffentlicht, dennoch wird die Bezeichnung *A. casei* im Folgenden beibehalten. Die Identifizierung der Spektren von *Co. casei* mit beiden Spektroskopie-Methoden war zweideutig: Sie wurden entweder als *Co. ammoniagenes* oder *Co. casei* identifiziert, die exakte Identifizierung musste hier also über 16S-Sequenzierung erfolgen.

Gemäß der unterschiedlichen Wachstumsraten coryneformer Organismen (vgl. Kap. 2.2.1 des Ergebnisteils) variierte die ermittelte Zusammensetzung der Population je nach Transferzeitpunkt. Staphylokokken wachsen sehr schnell und waren die einzigen nach 20 Stunden Inkubation detektierbaren Organismen. Auf eine Identifizierung auf Speziesebene wurde hier wie auch nach 30 Stunden verzichtet, ein Großteil der Kolonien kann jedoch *St. equorum* zugeordnet werden. Der Anteil der Staphylokokken reduzierte sich nach 30 Stunden Inkubation auf 84,3%, wo zudem bereits das Vorkommen langsamer wachsender Arten wie *Co. casei* mit 13,8%, *A. casei* mit 1,4% und *By. alimentarium* mit 0,5% verzeichnet werden konnte. Nach 48 Stunden wurden schließlich auch sehr langsam wachsende Spezies wie *Co. variabile* und *B. linens* detektiert. Die Zusammensetzung des Reifungskonsortiums wurde somit erst nach 48 Stunden Inkubation der Organismen in vollem Umfang erfasst und die Zusammensetzung der Flora demzufolge auf Basis der zu diesem Zeitpunkt aufgenommenen Spektren errechnet. Schnell wachsende Mikroorganismen wie die Staphylokokken, die in der Regel nur einen geringen Anteil an der Flora haben, können dagegen nach 20 bzw. 30 Stunden im Detail analysiert werden, da hier die übrige Flora kaum vertreten ist.

### 3.2 Analyse der Reifungsflora von Appenzeller Käse

Nach der Erweiterung der Datenbank für coryneforme Bakterien und Staphylokokken auf 82 Spektren wurde eine weitere Analyse eines Käsureifungskonsortiums, diesmal von Appenzeller Käse, durchgeführt. Der Versuchsaufbau war gleich der vorangegangenen Analyse, jedoch wurde in diesem Fall die Käseprobe halbiert und die Analyse einmal wiederholt. Die ermittelten Gesamtkeimzahlen lagen bei  $1,4 \times 10^9$  KbE/cm<sup>2</sup> bzw.  $3,3 \times 10^8$  KbE/cm<sup>2</sup>.

Im ersten Ansatz wurden insgesamt 1078, im zweiten 1109 Spektren aufgenommen, von denen jeweils 21 bzw. elf aufgrund schlechter Qualität von der Auswertung ausgeschlossen wurden. In Tabelle 5 ist die Zusammensetzung der Flora, ermittelt nach 48 Stunden Inkubation, für beide Analysen dargestellt.

**Tabelle 5: Zusammensetzung der Oberflächenflora von Appenzeller Käse<sup>a</sup>**

Spezies	AZ I		AZ II		Mittel [%]
	Spektren	%	Spektren	%	
<i>St. equorum</i>	14	3,6	19	5,4	4,5
<i>Ec. faecalis</i>	2	0,5	1	0,3	0,4
<i>Co. casei</i>	242	62,9	213	61,0	62,0
<i>A. casei</i>	90	23,4	80	22,9	23,2
n. id. coryneforme Spezies <sup>b</sup>	24	6,2	17	4,9	5,6
<i>B. linens</i>	7	1,8	6	1,7	1,8
<i>M. gubbeenense</i>	0	0,0	3	0,9	0,5
nicht identifiziert	6	1,6	10	2,9	2,3
gesamt	385	100	349	100	100

<sup>a</sup> AZ, Appenzeller Käse; I, erste Analyse; II, zweite Analyse

<sup>b</sup> n. id., nicht identifizierte

Sie war aus sieben verschiedenen Spezies zusammengesetzt, von denen *Co. casei* mit einem Anteil von durchschnittlich 62% klar dominierte. Weiterhin waren *A. casei* mit 23,2%, *St. equorum* mit 4,5%, *B. linens* mit 1,8%, *Microbacterium gubbeenense* mit 0,5%, *Enterococcus faecalis* mit 0,4% und eine nicht identifizierte Spezies mit 5,6% vertreten. Die Identifizie-



rung aller Spezies über FTIR-Mikrospektroskopie konnte mit Ausnahme von *M. gubbeenense* mit 16S rDNA-Sequenzierung bestätigt werden. Aufgrund des geringen Vorkommens – diese Art wurde nur im zweiten Ansatz detektiert – konnten von *M. gubbeenense* keine Kolonien isoliert werden, die Identifizierung mittels Mikrospektroskopie war jedoch eindeutig.

Die 16S rDNA-Sequenzen von sechs Isolaten zeigten eine hundertprozentige Ähnlichkeit zu einer neuen Subspezies von *St. equorum*, genannt *St. equorum* ssp. *linens*, die ebenfalls von der Oberfläche eines Rotschmierekäses isoliert wurde [112]. Bei der Analyse der Oberflächenreifungsflora von Appenzeller Käse konnte auch *A. casei* mit FTIR-Mikrospektroskopie identifiziert werden, da Isolate der vorangegangenen Analyse des Vorarlberger Bergkäses in die Datenbank aufgenommen worden waren und als Referenzen dienten. Die Identifizierung von *Co. casei* gestaltete sich wie bereits oben ausgeführt schwierig, und *Ec. faecalis* konnte mit FTIR-Mikrospektroskopie nicht identifiziert werden, da er zu den Milchsäurebakterien zählt und somit nicht in der Datenbank für coryneforme Bakterien enthalten war. Die letztendliche Identifizierung beider Arten erfolgte mit 16S rDNA-Sequenzierung. Eine in der Flora detektierte Spezies jedoch konnte weder mit einer der beiden Spektroskopiemethoden noch mit 16S-Sequenzierung identifiziert werden. Sie ist grampositiv, Katalase-positiv, bildet keine Sporen und zeigt eine unregelmäßige Zellform mit „snapping divisions“, wie sie für coryneforme Bakterien charakteristisch sind.

Wie schon bei der Untersuchung des Vorarlberger Bergkäses erwähnt, ist die Detektion der in der Flora vorkommenden Spezies abhängig vom Zeitpunkt des Kolonietransfers von der Agarplatte auf den ZnSe-Probensträger, was auch in dieser Analyse deutlich wurde. Die Zusammensetzung der Flora des Appenzeller Käses ermittelt im ersten und zweiten Ansatz war sehr ähnlich (Tab. 5), die Anteile der unterschiedlichen Spezies zu den beiden ersten Zeitpunkten nach 20 und 30 Stunden zeigten jedoch starke Unterschiede (Tab. 6). Während *Co. casei* im ersten Ansatz nach 20 Stunden mit knapp 17% vertreten war, konnte es im zweiten Ansatz zu diesem Zeitpunkt nicht detektiert werden. Auch der Anteil an *Ec. faecalis* und nicht identifizierten Spektren war deutlich geringer. Entsprechend höher fiel das Vorkommen von *St. equorum* aus. Nach 30 Stunden begannen sich

die Verhältnisse anzugleichen, waren jedoch immer noch deutlich verschieden, und nach 48 Stunden wiesen beide Ansätze nur noch geringe Differenzen auf.

**Tabelle 6: Zusammensetzung der Oberflächenflora von Appenzeller Käse [%] ermittelt nach unterschiedlich langer Inkubation der Organismen<sup>a</sup>**

Spezies	20 h		30 h		48 h	
	AZ I	AZ II	AZ I	AZ II	AZ I	AZ II
<i>St. equorum</i>	57,9	94,7	12,8	29,1	3,6	5,4
<i>Ec. faecalis</i>	14,5	2,9	2,4	0,5	0,5	0,3
<i>Co. casei</i>	16,8	0	75,5	65,1	62,9	61,0
<i>A. casei</i>	0	0	7,5	4,5	23,4	22,9
n. id. coryneforme Spezies	0	0	0,8	0,5	6,2	4,9
<i>B. linens</i>	0	0	0	0	1,8	1,7
<i>M. gubbeenense</i>	0	0	0	0	0	0,9
nicht identifiziert	10,7	2,4	1,0	0,3	1,6	2,9
gesamt	100	100	100	100	100	100

<sup>a</sup> AZ, Appenzeller Käse; I, erste Analyse; II, zweite Analyse

### 3.3 Analyse einer undefinierten Starterkultur für Emmentaler Käse

Die undefinierte Starterkultur für die Herstellung von Emmentaler Käse und zwei Proben aus dem Anfangsstadium der Emmentaler-Produktion wurden auf ihre Zusammensetzung untersucht. Im Besonderen sollte die Frage geklärt werden, ob sich die eingesetzte Kultur aus verschiedenen Stämmen zusammensetzt und ob diese sich während der Säuerung unterschiedlich entwickeln. Zudem galt es zu ermitteln, ob Organismen, die nicht Bestandteil der Starterkultur waren, im Käse detektiert werden können.

### 3.3.1 Analyse der Starterkultur

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl auf MRS-Agar ergab  $5,9 \times 10^7$  KbE/ml Stock und auf M17-Agar  $7,6 \times 10^8$  KbE/ml Stock. Von beiden Medien wurden jeweils 30 Kolonien gepickt und mit FTIR-Makrospektroskopie identifiziert. Alle 30 Isolate von MRS-Agar sowie fünf Isolate von M17-Agar gehörten zur Art *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* und die restlichen 25 Isolate von M17-Agar zu *Streptococcus thermophilus*. Nach der ersten FTIR-Messung wurde die Zahl der Isolate für *Lb. delbrueckii* auf zehn und für *Str. thermophilus* auf acht reduziert, mit denen dann weitere Messungen durchgeführt wurden, um eine Differenzierung auf Stammebene vorzunehmen.

Parallel wurden diese 18 Isolate mit FTIR-Mikrospektroskopie gemessen. Als Zeitpunkt für den Kolonietransfer erschien die Wahl von 24 Stunden Inkubation sinnvoll. Nach 15 Stunden hatten zwar sowohl die Kokken als auch die Stäbchen ausreichend große Kolonien gebildet, diese ließen sich aber im Fall der Stäbchen zu diesem Zeitpunkt nicht oder nur bruchstückhaft auf das ZnSe-Fenster überführen. Die Differenzierung der Isolate in unterschiedliche Stämme ergab, dass die Starterflora vermutlich aus jeweils zwei Stämmen von *Str. thermophilus* und *Lb. delbrueckii* bestand, die Zuordnung der einzelnen Isolate zu den Stämmen für beide angewandten Spektroskopiemethoden jedoch nicht einheitlich ausfiel. Wie Abbildung 23 zu entnehmen ist, bilden die Isolate K4, K6, K12-1 und K15 einen Stamm von *Str. thermophilus* und K5, K9, K12-2 und K14 einen zweiten Stamm, wenn mit FTIR-Makrospektroskopie gemessen wird. Erfolgt die Messung mit FTIR-Mikrospektroskopie, clustert K4 zum zweiten Stamm und dafür K12-2 zum ersten. Bei *Lb. delbrueckii* bilden die Isolate St2 und St16 jeweils ein separates Cluster im Fall der Messung mit Makrospektroskopie, aber bei Messung mit Mikrospektroskopie sind es die Isolate St2 und St21, die ein gemeinsames Cluster formen.

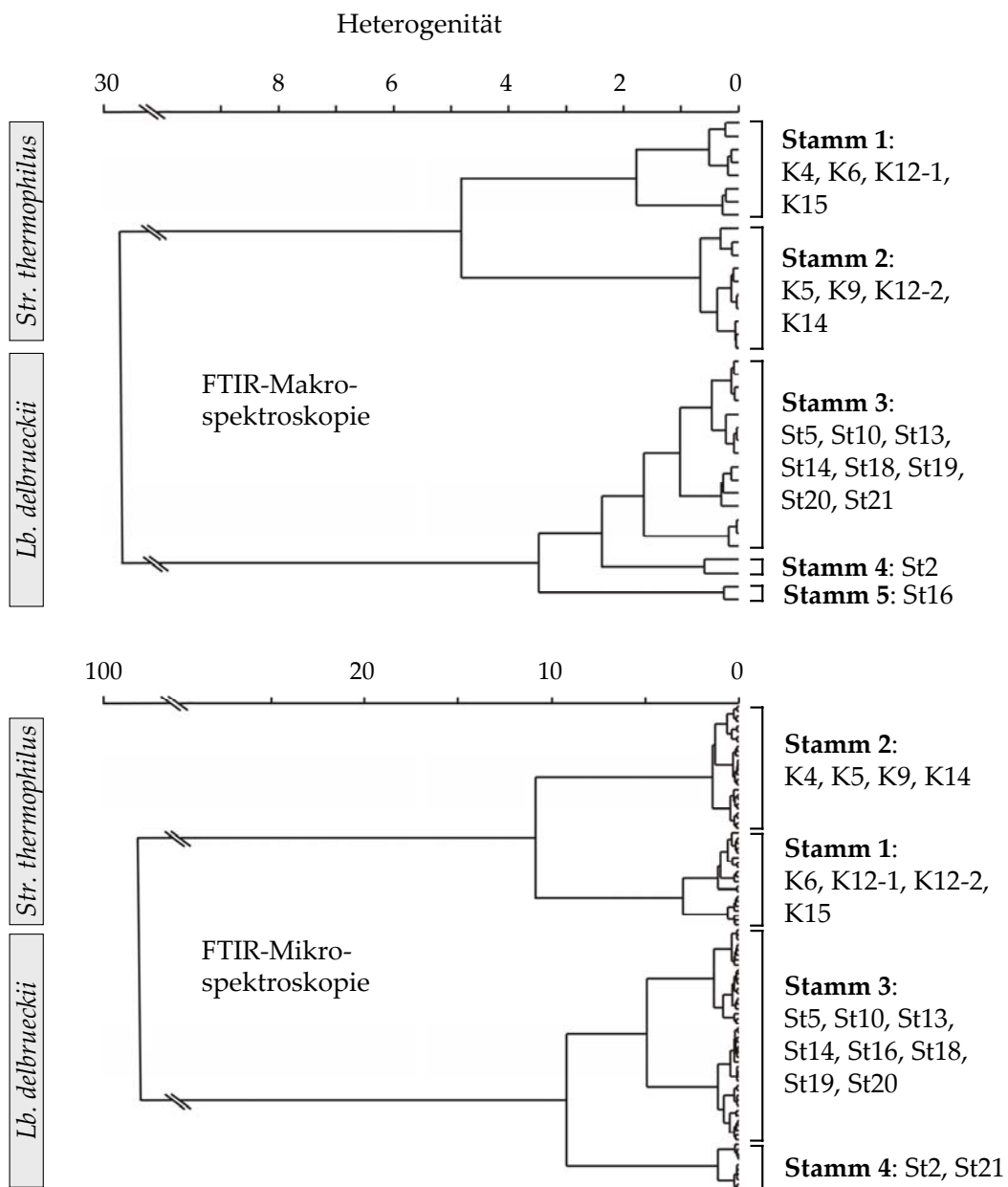


Abb. 23: Zusammensetzung der undefinierten Starterkultur eines Emmentaler Käses untersucht mit FTIR-Makro- und Mikrospektroskopie. Spektrale Fenster  $3.000-2.800\text{ cm}^{-1}$ ,  $1.660-1.500\text{ cm}^{-1}$ ,  $1.420-1.400\text{ cm}^{-1}$ ,  $1.360-1.200\text{ cm}^{-1}$ ,  $1.180-1.090\text{ cm}^{-1}$  und  $950-700\text{ cm}^{-1}$ , 1. Ableitung, Korrelation mit Normalisierung auf Reprolevel, Ward's Algorithmus.

Erschwert wurde die Unterteilung der Isolate von *Lb. delbrueckii* in einzelne Stämme durch die Tatsache, dass der Starter mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem Phagen befallen war. In Abbildung 24A ist ein mikroskopisches Bild eines *Lb. delbrueckii*-Isolates zu sehen, auf dem neben intakten Zellen auch die Hüllen bzw. Zellreste lysierter Zellen zu sehen sind. Der Phagenbefall manifestierte sich bei der Anzucht der Organismen für die

Messung mit FTIR-Makrospektroskopie in unterschiedlich stark ausgeprägten klaren Zonen innerhalb des Zellrasens, in denen z.T. Kolonien resistenter Klone lagen (Abb. 22B), und beeinträchtigte die Reproduzierbarkeit der Wiederholungsmessungen.

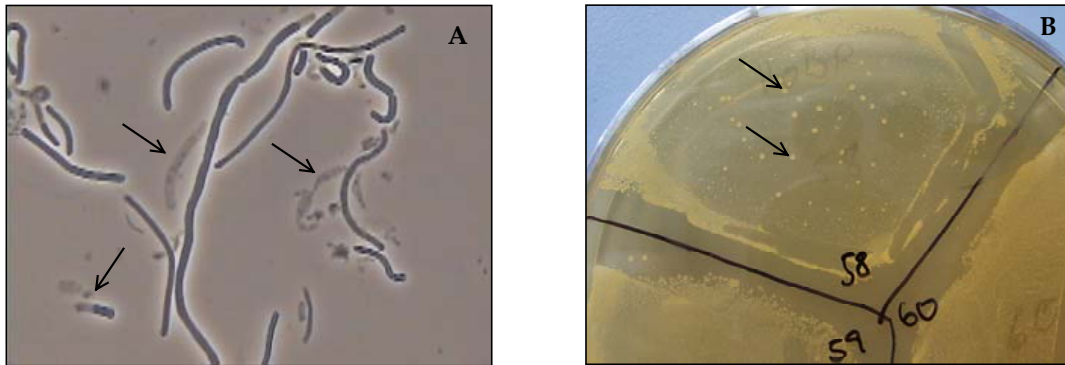


Abb. 24: *Lb. delbrueckii* isoliert aus der undefinierten Starterkultur des Emmentaler Käses. Mikroskopisches Bild mit Hüllen lysierter Zellen (Pfeile) (A) und Agarplatte mit für die Messung mit FTIR-Makrospektroskopie kultivierten Isolaten (B). Zu sehen ist ein ehemals konfluenter Rasen, der bis auf die Randpartie aufgeklart ist. In der aufgeklärten Zone sind Kolonien einiger resistenter Klone zu erkennen (Pfeile).

Die Agarplatten zur Messung mit FTIR-Mikrospektroskopie wiesen rein optisch keine Auffälligkeiten auf; hier kann nur spekuliert werden, ob die Abweichung einiger Spektren auf das Vorhandensein eines Phagen zurückzuführen ist. Da die Populationsanalysen der Käseproben mit FTIR-Mikrospektroskopie erfolgten, wurde für die Auswertung die mit Mikrospektroskopie erzielte Stammeinteilung zugrunde gelegt und eine Auswahl von sechs Referenzspektren für jedes Isolat in der Datenbank hinterlegt.

### 3.3.2 Analyse des Quarks vor dem Pressen

Die erste Analyse des Käses erfolgte nach dem Formen des Käsebruchs, jedoch noch vor dem Pressen. Zwei Stunden zuvor war die Kesselmilch mit der Starterkultur beimpft worden, gefolgt von ca. einer halben Stunde Vorreifung der Milch vor der Labzugabe. Die ermittelte Keimzahl lag bei  $3,1 \times 10^6$  KbE/g auf APT-Agar und bei  $3,9 \times 10^5$  KbE/g auf MRS-Agar, die Zahl der Stäbchen betrug demnach also nur ca. 13% der Gesamtflora.

270 Kolonien wurden mit FTIR-Mikrospektroskopie gemessen, von denen 86% als *Str. thermophilus* und 14% als *Lb. delbrueckii* identifiziert wurden. Die Spektren von *Str. thermophilus* bildeten in der Clusteranalyse zwei klar voneinander separierte Cluster (Abb. 25), von denen eines – in Abbildung 25 als Stamm B bezeichnet – dem bereits in der Starterkultur detektierten Stamm 1 zuzuordnen war und einen Anteil von 36% an der Flora hatte.

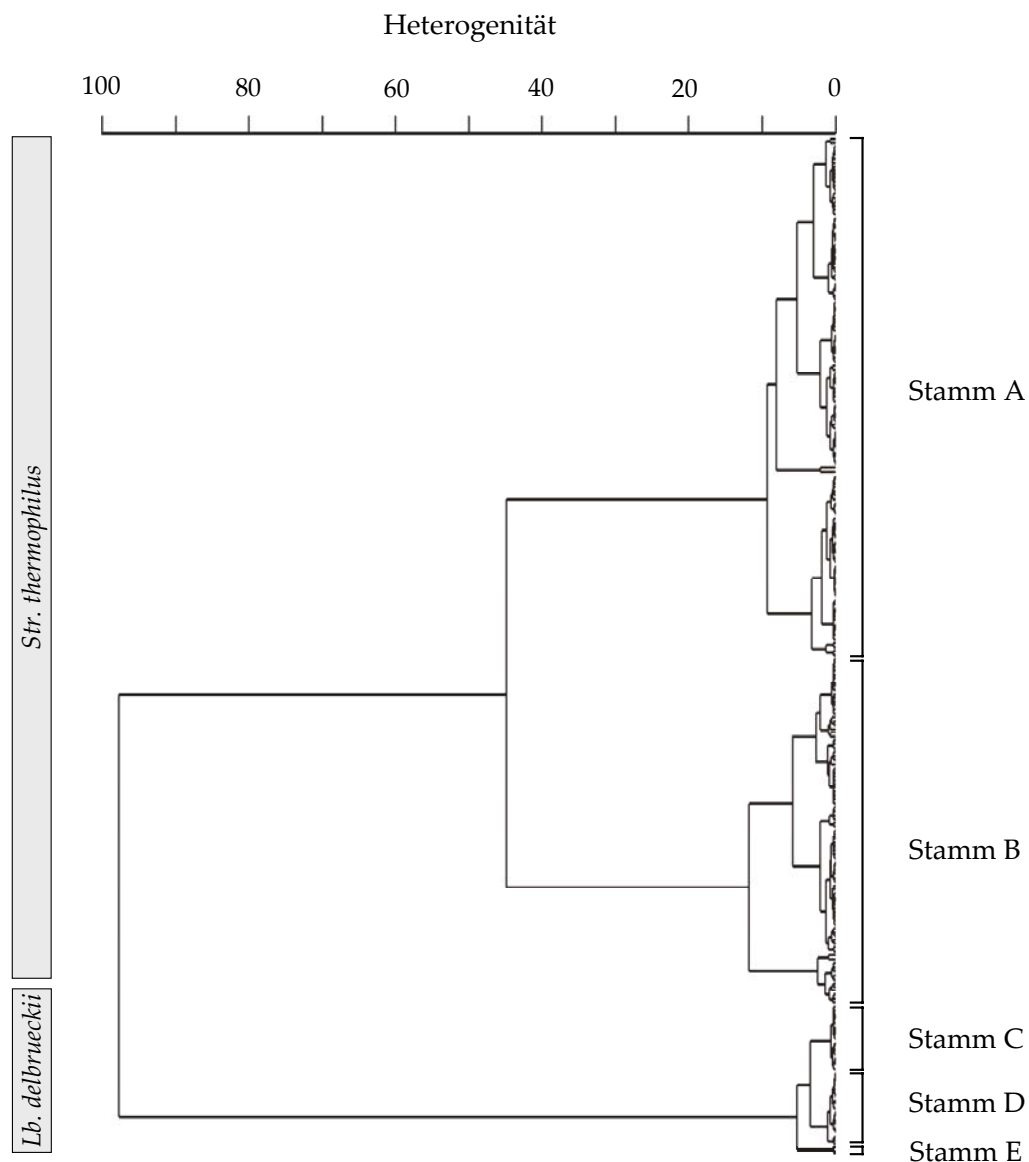


Abb. 25: Zusammensetzung der Flora im Quark vor dem Pressen. Stamm A: *Str. thermophilus*, entstammt nicht dem Starter; Stamm B: *Str. thermophilus*, entspricht Stamm 1 aus dem Starter; Stamm C: *Lb. delbrueckii*, entspricht Stamm 3 aus dem Starter; Stamm D: *Lb. delbrueckii*, entspricht Stamm 4 aus dem Starter. Spektrale Fenster 3.000-2.800  $\text{cm}^{-1}$ , 1.660-1.500  $\text{cm}^{-1}$ , 1.420-1.400  $\text{cm}^{-1}$ , 1.360-1.200  $\text{cm}^{-1}$ , 1.180-1.090  $\text{cm}^{-1}$  und 950-700  $\text{cm}^{-1}$ , 1. Ableitung, Korrelation mit Normalisierung auf Replevel, Ward's Algorithmus.

Die Spektren des anderen Clusters – bezeichnet als Stamm A – wurden hingegen durch keinen der zuvor aus der Starterflora isolierten, sondern durch weitere in der Datenbank vorhandene Stämme identifiziert. Der Anteil dieses Stammes an der Flora betrug 50%. Stamm 2 aus der Starterkultur konnte nicht detektiert werden. Die Spektren von *Lb. delbrueckii* clusterten enger als die von *Str. thermophilus*, konnten jedoch anhand der Identifizierungen in drei verschiedene Stämme differenziert werden. Stamm C in Abbildung 25 entsprach Stamm 3 aus der Starterkultur und hatte 6% Anteil an der Population. Stamm D entsprach Stamm 4 und war mit 7% an der Flora beteiligt und die Spektren von Stamm E mit 1% Anteil an der Flora konnten keinem bereits bekannten Stamm eindeutig zugeordnet werden.

### 3.3.3 Analyse des Quarks nach dem Pressen

Nach dem Formen wird die Käsemasse gepresst, was im Fall des untersuchten Emmentalers ca. 19 Stunden dauerte. Nach Beendigung des Pressens, aber noch vor dem Salzbad, wurde die zweite Probe genommen. Während des Pressens fand die Säuerung statt, so dass der pH-Wert des Quarks von 6,65 vor dem Pressen auf 5,05 nach dem Pressen sank. Die Keimzahl betrug  $6,1 \times 10^8$  KbE/g auf APT-Agar und  $5,7 \times 10^8$  KbE/g auf MRS-Agar; die Flora war somit nahezu ausschließlich aus Stäbchen zusammengesetzt.

Für die Populationsanalyse wurden alle Mikrokolonien einer Agarplatte der Verdünnungsstufe  $5 \times 10^{-6}$  abgestempelt und mit FTIR-Mikrospektroskopie gemessen. Insgesamt waren dies 197 Kolonien, was umgerechnet  $4 \times 10^7$  KbE/g entspricht und folglich eine ganze Log-Einheit unter dem bei der Auszählung der Platten ermittelten Wert liegt. Beim Kolonietransfer war bereits rein optisch zu beobachten, dass ein großer Teil der Kolonien noch relativ klein war und nur ein Bruchteil der auf der Agarplatte vorhandenen Mikrokolonien auf den Probenträger überführt werden konnte. Aus diesem Grund wurden von einer Parallelplatte zufallsbedingt 90 Kolonien gepickt und mit FTIR-Makrospektroskopie ohne Ausnahme als *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* identifiziert.

Abbildung 26 zeigt die Zusammensetzung der Flora, wie sie mit FTIR-Mikrospektroskopie ermittelt wurde. 1% der Spektren wurde als *Str. thermophilus* Stamm A identifiziert und 77% als *Lb. delbrueckii*.

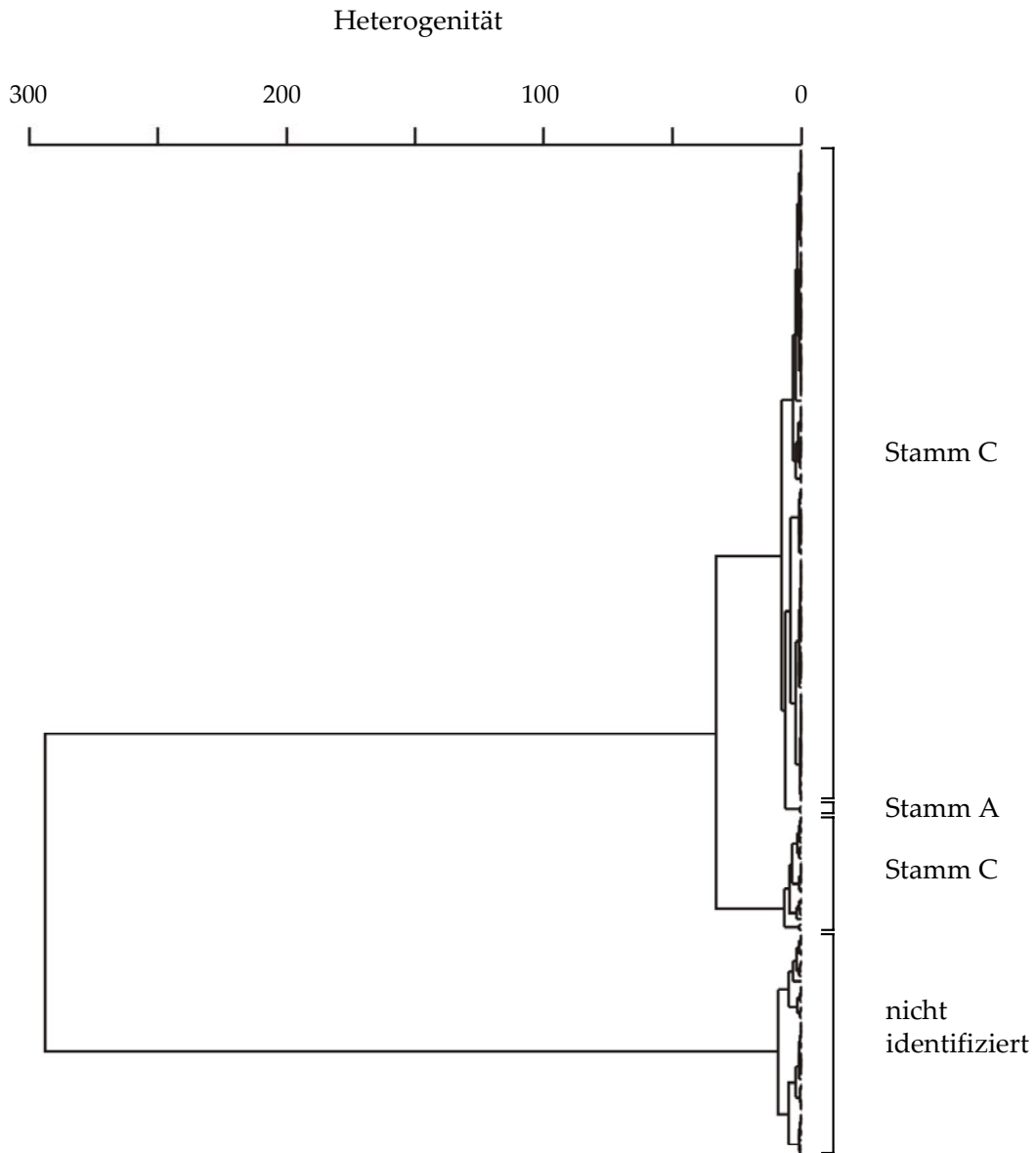


Abb. 26: Zusammensetzung der Flora im Quark nach dem Pressen. Stamm A: *Str. thermophilus*, entstammt nicht dem Starter; Stamm C: *Lb. delbrueckii*, entspricht Stamm 3 aus dem Starter. Spektrale Fenster 3.000-2.800  $\text{cm}^{-1}$ , 1.660-1.500  $\text{cm}^{-1}$ , 1.420-1.400  $\text{cm}^{-1}$ , 1.360-1.200  $\text{cm}^{-1}$ , 1.180-1.090  $\text{cm}^{-1}$  und 950-700  $\text{cm}^{-1}$ , 1. Ableitung, Korrelation mit Normalisierung auf Replevel, Ward's Algorithmus.



Die Spektren von *Lb. delbrueckii* konnten in diesem Fall Stamm 3 der Starterkultur zugeordnet werden; Stamm 4 wurde nicht mehr detektiert. 22% der Spektren konnten mit der vorhandenen Datenbank keiner Spezies zugeordnet werden, da die Identifizierungen eine eindeutig zu schlechte Hitqualität aufwiesen, um gewertet zu werden. Das Cluster dieser Spektren zeigt in Abbildung 26 zudem eine sehr große Distanz zu den übrigen Spektren. Es muss jedoch beachtet werden, dass nur etwa 10% der auf der Agarplatte vorhandenen Kolonien überhaupt am Probenträger haften geblieben waren und die mit FTIR-Mikrospektroskopie erfassten Verhältnisse aufgrund dessen nicht die tatsächliche Verteilung widerspiegeln. Die Identifizierung der 90 Organismen, die von einer Agarplatte isoliert und anschließend mit FTIR-Makrospektroskopie gemessen wurden, ergab zu 100% *Lb. delbrueckii*. Dies bedeutet, dass auch die nicht am ZnSe adhäsieren Kolonien zu *Lb. delbrueckii* gehören, der Anteil von *Str. thermophilus* und der nicht identifizierbaren Spezies demnach nur etwa ein Zehntel dessen beträgt, was mit FTIR-Mikrospektroskopie ermittelt wurde. In Abbildung 27 ist die Zusammensetzung der Flora vor und nach dem Pressen unter Berücksichtigung dieser Änderung noch einmal zusammengefasst. *Lb. delbrueckii* stellt somit etwa 98% der Flora.

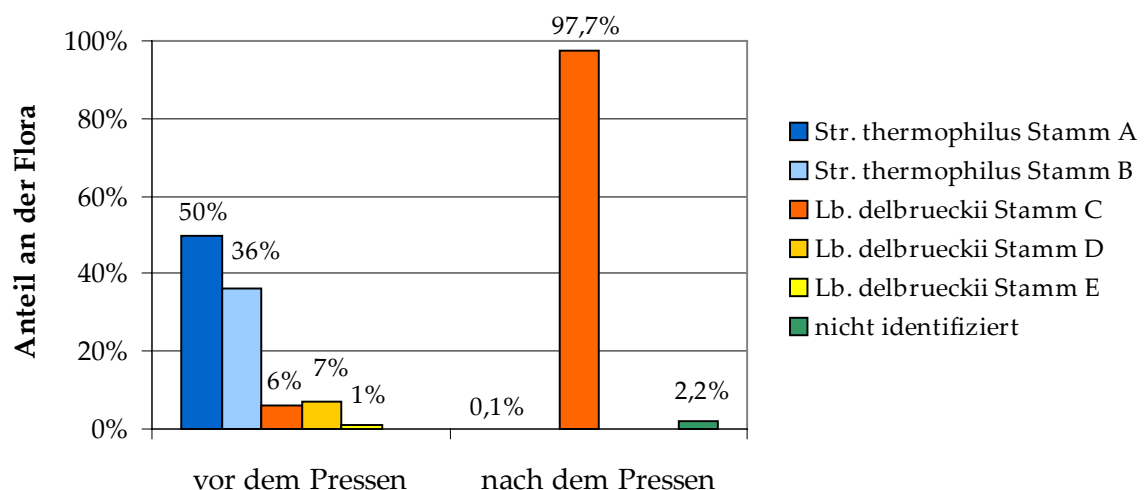


Abb. 27: Veränderung der Florazusammensetzung im Quark während des Pressens. Die Zahlen der Zusammensetzung nach dem Pressen beinhalten bereits die Korrektur der über FTIR-Mikrospektroskopie ermittelten Werte mit den Ergebnissen der Identifizierung der Isolate mit FTIR-Makrospektroskopie.

---

Da beim Kolonietransfer v.a. die größeren Kolonien auf das ZnSe-Fenster überführt worden waren, wurden zur Detektion der 22% mit Mikrospektroskopie nicht identifizierbaren Spezies gezielt 60 größere Kolonien von der Agarplatte gepickt und mit FTIR-Makrospektroskopie identifiziert. Auch hier ergab sich, wie schon bei den 90 zuvor isolierten Organismen, zu 100% eine Identifizierung als *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*.

## IV. Diskussion

### 1. Spektrenqualität und Reproduzierbarkeit der FTIR-Messungen

Gute Reproduzierbarkeit ist eine unabdingbare Grundvoraussetzung für die Anwendung jeder Methode, im Besonderen jedoch für die Identifizierung von Mikroorganismen mit FTIR-Mikrospektroskopie, die über den Abgleich von Spektren mit Referenzen einer Datenbank erfolgt. Aufgrund der starken Abhängigkeit der Zusammensetzung bakterieller Zellen und Hefen von Inkubationsparametern wie Medium oder Temperatur ist eine strikte Standardisierung des gesamten Protokolls vonnöten. Neben kultivierungsbedingten Abweichungen wird die Reproduzierbarkeit jedoch auch von der Qualität der aufgenommenen Spektren beeinflusst, die wiederum in engem Zusammenhang mit dem S/N-Verhältnis und der Wasserdampfabsorption steht.

#### 1.1 Einfluss der Koloniegröße

Der Durchmesser der Mikrokolonien auf dem Stempel nimmt hauptsächlich im unteren Größenbereich Einfluss auf die Qualität der resultierenden Spektren. Für den überwiegenden Teil der bearbeiteten Hefen und Bakterien haben sich 70  $\mu\text{m}$  als minimaler Koloniedurchmesser erwiesen, wobei hier aber noch keine optimalen Ergebnisse erzielt werden. Für viele Stämme sind 80-100  $\mu\text{m}$  notwendig, um eine optimale Reproduzierbarkeit der Spektren zu gewährleisten, während bei einigen Organismen, und zwar hauptsächlich bei jenen, die sehr transparente Kolonien bilden, hier der minimale Durchmesser liegt. Die Abhängigkeit der Spektrenqualität von der Koloniegröße liegt im S/N-Verhältnis begründet, das das Verhältnis von Probensignal zu Hintergrundrauschen darstellt. Bei niedrigem S/N-Verhältnis überlagert das Hintergrundrauschen die eigentlichen Banden des Spektrums je nach Höhe des Signals mehr oder weniger stark und erschwert somit eine sinnvolle Auswertung der Daten. Kleine Kolonien erzielen nur ein

geringes Signal, was in Abbildung 8B für die Spektren der Kolonien mit 50  $\mu\text{m}$  Durchmesser der Fall ist und in Abbildung 9 für das Spektrum ScerW220.1, was dessen Abweichung trotz scheinbar ausreichender Koloniegröße erklärt. Mit zunehmendem Koloniedurchmesser steigt das Signal, was das S/N-Verhältnis und somit auch die Reproduzierbarkeit verbessert (Abb. 8B), da nun fast ausschließlich stammtypische Merkmale die Distanzen der Spektren untereinander bedingen.

## 1.2 Einfluss der Irisblende

Ein weiterer die Reproduzierbarkeit von Spektren beeinflussender Faktor ist die Größe der Irisblende, die den Infrarotstrahl auf die zu messende Kolonie beschränkt. Obwohl optisch kaum Unterschiede ins Auge fallen (Daten nicht gezeigt), weisen die Spektren, die unter Verwendung kleiner Blenden mit 20 bzw. 30  $\mu\text{m}$  Durchmesser aufgenommen wurden, im Dendrogramm relativ große Abweichungen zu Spektren, deren Aufnahme mit größerer Blende erfolgte auf (Abb. 10). Analog zu kleinen Koloniedurchmessern liegen auch hier die großen Distanzen in einem niedrigen S/N-Verhältnis begründet, das sich mit größer werdenden Blenden von 236/113 für 20  $\mu\text{m}$  auf 665/175 für 80  $\mu\text{m}$  verbessert und somit die Beeinflussung der Spektren durch die Blende auf ein Minimum begrenzt.

## 1.3 Einfluss der Luftfeuchte

Einen deutlich stärkeren Effekt als ein niedriges S/N-Verhältnis ruft eine hohe Luftfeuchtigkeit hervor. Die Absorption des Wasserdampfes schlägt sich besonders im Wellenzahlbereich von 2.000-1.280  $\text{cm}^{-1}$  des Spektrums nieder [61] und überlagert die eigentlich charakteristischen Banden. Dies beeinflusst die Klassifizierung von Spektren in solchem Ausmaß, dass eine Zuordnung zur korrekten Spezies nicht mehr möglich ist (Abb. 11A). Zudem bedeutet ein verstärktes Fringing, verursacht durch gesteigerte Streuung des Infrarotlichts, einen weiteren Qualitätsverlust bei den Spektren. Eine strikte Standardisierung der Luftfeuchte auf 5-10% über eine Spülung sowohl des Spektrometers als auch des Probenraumes war somit unumgänglich.

## 1.4 Einfluss der Kolonieheterogenität

Neben der Spektrenqualität ist die Heterogenität innerhalb einzelner Kolonien ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die Reproduzierbarkeit von Spektren nehmen kann. Orsini et al. [111] stellten Unterschiede zwischen Peripherie und Zentrum einer 300  $\mu\text{m}$  großen *C. albicans*-Kolonie fest und auch Choo-Smith et al. [25] konnten für *Escherichia coli* und *C. albicans* zeigen, dass zwischen Spektren, die in der Peripherie und im Zentrum einer 100  $\mu\text{m}$  großen Kolonie aufgenommen wurden, Differenzen bestehen. So bildeten Spektren von zwölf Stunden alten *E. coli*-Kolonien zweier unterschiedlicher Stämme aufgenommen am Rand und im Zentrum der Kolonien im Dendrogramm keine klar von einander separierten stammspezifischen Cluster wie es für sechs Stunden alte Kolonien der Fall war. Die Autoren empfehlen daher, für den Aufbau von Referenzdatenbanken kleine Kolonien zu vermessen. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch im Hinblick auf größtmögliche Praktikabilität kein Koloniedurchmesser für die Messung festgelegt, sondern die Inkubationsdauer standardisiert. Um trotzdem den Einfluss der Kolonieheterogenität gering zu halten, wurde der Messpunkt für kleinere Kolonien bei langsam wachsenden Stämmen immer im Zentrum und für größere Kolonien bei schnell wachsenden Stämmen immer am Rand der Kolonie gewählt. Zudem waren die Wellenzahlbereiche, in denen die Unterschiede nach Choo-Smith et al. [25] hauptsächlich auftraten von der Auswertung der Spektren weitgehend ausgeschlossen. Die guten Ergebnisse bei der Stammidentifizierung von *S. cerevisiae* und *D. hansenii* bestätigen, dass der Einfluss der Kolonieheterogenität weitgehend ausgeschlossen werden konnte.

## 2. Identifizierung von Mikroorganismen

Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurden für drei unterschiedliche taxonomische Gruppen von Mikroorganismen Datenbanken mit Referenzspektren erstellt und jeweils die ausschlaggebenden Parameter für die Identifizierung optimiert. Hierzu gehörte neben der Wahl der geeigneten Ableitung der Spektren auch die Ermittlung der am stärksten diskriminierenden spektralen Bereiche, die für die Identifizierung verwendet werden. Es ist anzumerken, dass es sich in der vorliegenden Arbeit um den bislang ersten

Versuch handelt, lebensmittelasoziierte Mikroorganismen mit FTIR-Mikrospektroskopie zu identifizieren, und demnach ein Vergleich der Daten im Folgenden – soweit nicht anders erwähnt – nur mit Arbeiten über die herkömmliche FTIR-Makrospektroskopie erfolgen kann.

## 2.1 Hefen

### 2.1.1 Identifizierung von Hefen mit FTIR-Spektroskopie

In die Datenbank für Hefen wurden insgesamt 82 Stämme aus 13 Spezies aufgenommen, was durchschnittlich 6,3 Stämmen pro Spezies entspricht. Bei der Optimierung der Parameter für die Auswertung und Identifizierung der Spektren war die zweite der ersten Ableitung deutlich überlegen und eine Erweiterung der von Kümmerle et al. [83] vorgeschlagenen spektralen Fenster von  $3.030\text{-}2.830\text{ cm}^{-1}$ ,  $1.350\text{-}1.200\text{ cm}^{-1}$  und  $900\text{-}700\text{ cm}^{-1}$  um den Bereich von  $1.800\text{-}1.710\text{ cm}^{-1}$  sinnvoll. Mit der so gewählten Parameterkombination konnten 80% richtige Identifizierungen auf Speziesebene erzielt werden, im Gegensatz zu 73% bei Verwendung der Fenster nach Kümmerle et al. Dies unterstreicht, wie wichtig die richtige Wahl der Spektrenbereiche für eine zuverlässige Identifizierung ist. Eine Typisierung von 21 Stämmen der Art *D. hansenii* und neun der Art *S. cerevisiae* auf Stammniveau ergab 91% bzw. 92% richtige Zuordnungen.

Der Tatsache Rechnung tragend, dass in der vorliegenden Arbeit die Parameterselektion auf die Identifizierung einer Vielzahl von Arten und Gattungen hin optimiert werden sollte und zudem die Datenbank von limitierter Tiefe ist, sind die erzielten 80% richtiger Identifizierungen ein gutes Ergebnis. Schwierigkeiten bei der Identifizierung treten nicht speziell bei einzelnen Spezies auf, sondern verteilen sich verhältnismäßig gleichmäßig auf neun der 13 Arten. Jedoch ist auffällig, dass im Besonderen Stämme aus offiziellen Referenzsammlungen wie dem Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) oder der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) schwierig zu identifizieren waren. So wurden 15 von insgesamt 49 offiziellen Referenzstämmen falsch identifiziert (31%), dagegen jedoch nur zwei von 33 institutseigenen Isolaten (6%). Ein möglicher Grund hierfür mag in der langen Kultivierung offizieller Stämme unter Labor-

bedingungen liegen. Möglicherweise verlieren Mikroorganismen unter diesen standardisierten Bedingungen arttypische Merkmale, degenerieren und entfernen sich somit phänotypisch immer weiter von anderen Mitgliedern ihrer Art. Besonders deutlich wurde dies am Typstamm für *S. cerevisiae* – eine an und für sich schnell wachsende Art –, der ein derart verlangsamtes Wachstum aufwies, dass er nicht in der Referenzdatenbank abgelegt werden konnte. Für die Sicherung bestmöglicher Anwendbarkeit der Datenbank ist demnach die Aufnahme von aktuellen Isolaten als Referenzen unabdingbar.

Hefen sind bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen mit FTIR-Spektroskopie untersucht worden, jedoch mit einer Ausnahme nicht unter Verwendung einer umfangreichen Datenbank mit Referenzspektren. Tabelle 7 vergleicht u.a. drei der im Folgenden erwähnten Arbeiten in der Übersicht. Kümmerle et al. [83] haben bislang als einzige über die umfassende Identifizierung einer Vielzahl von Hefenspezies berichtet. Sie etablierten eine Datenbank mit 332 Referenzspektren, mit deren Hilfe 717 Isolate aus dem Molkereiumfeld zu 97,5% korrekt identifiziert werden konnten. Es handelte sich hierbei folglich nicht wie in der vorliegenden Arbeit um eine rein statistische Bewertung der Datenbank, sondern um einen Praxistest, bei dem ca. 60% der Isolate zu den fünf am häufigsten vorkommenden Spezies von insgesamt 36 gehörten, was den Identifizierungserfolg ohne Zweifel positiv beeinflusst haben dürfte. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse des Vergleichs beider Spektroskopiemethoden (vgl. Abb. 12) belegen die gleichwertige Leistungsfähigkeit von FTIR-Makro- und Mikrospektroskopie.

**Tabelle 7: Identifizierung von Hefen mit unterschiedlichen Methoden**

Identifizierungssystem	Identifizierungserfolg [%]		
	klinisch	Lebensmittel	Referenz
FTIR-Mikrospektroskopie		80	<sup>a</sup>
FTIR-Makrospektroskopie		97	[83] <sup>b</sup>
	100		[140] <sup>c</sup>
Raman-Spektroskopie	97		[94] <sup>d</sup>
API 20C (Aux)		12	[5]
		~35	[141]
	90		[113]
	99		[132]
	83		[149]
API YEAST-IDENT		< 20	[141]
RapID Yeast Plus		33	[5]
	97		[100]
	96		[149]
API ID 32C		53	[118]
	86		[113]
MicroScan		40	[39]
	97		[132]
SIM		55-70	[141]
Barnett		74	[5]
Kreger-van Rij		~80	[141]

<sup>a</sup> vorliegende Arbeit, 82 Referenzstämme aus 13 Spezies

<sup>b</sup> 322 Referenzstämme aus 73 Spezies

<sup>c</sup> 81 Referenzstämme aus 2 Spezies

<sup>d</sup> 42 Referenzstämme aus 5 Spezies

Weitere Arbeiten über die Identifizierung bzw. Klassifizierung von Hefen mit FTIR-Makrospektroskopie konzentrierten sich auf die Differenzierung einiger weniger Spezies [138, 140] oder aber verschiedener Stämme der gleichen Art [121, 127, 139]. Die Parameterselektion erfolgte dabei jeweils optimiert auf das entsprechende Problem. So erreichten Tintelnot et al. [140] unter Verwendung der zweiten Ableitung und fünf verschiedener spektraler Fenster eine deutliche Trennung der eng verwandten *Candida*-Arten *C. albicans* und *C. dubliniensis* in der Clusteranalyse und konnten zudem 30 Stämme beider Arten mit



einem aus 81 Stämmen aufgebauten und trainierten künstlichen neuronalen Netzwerk zu 100% richtig identifizieren. Sandt et al. [121] dagegen untersuchten die Differenzierungsmöglichkeit verschiedener klinischer Isolate der Spezies *C. albicans* unter dem Aspekt potentieller Kreuzinfektionen auf Intensivstationen. Ihnen gelang unter Verwendung der zweiten Ableitung und annähernd des gesamten Spektrenbereiches in der Clusteranalyse eine nahezu vollständige Trennung von 79 Isolaten in patientenspezifische Gruppen und eine Bestätigung ihrer Ergebnisse mit RAPD-Analysen.

Einen Ansatz zur Identifizierung von Hefen über die Messung von Mikrokolonien bieten Maquelin et al. [94], die in ihrer Arbeit 42 Stämme aus fünf Spezies der Gattung *Candida* unter Verwendung von Raman-Mikrospektroskopie identifizierten. Bei dieser Technik werden die Mikrokolonien auf der Agarplatte belassen und mit einem Raman-Mikrospektrometer in Reflexion gemessen. Auch Maquelin et al. wählten eine hierarchisch strukturierte Identifizierung – kombiniert zudem mit principal component analysis (PCA) und linear discriminant analysis (LDA), zwei statistischen Verfahren der Datenauswertung – und erreichten 97% korrekte Identifizierungen.

### **2.1.2 Identifizierung von Hefen mit physiologischen und molekularbiologischen Methoden**

Ein Blick in die Literatur über alternative Verfahren zur routinemäßigen Identifizierung von Hefen im Lebensmittelbereich zeigt, dass Quoten von annähernd 80% nur mit verhältnismäßig hohem Aufwand zu erreichen sind (Tab. 7). Kommerziell zu erwerbende Kits auf Basis physiologischer Reaktionen erzielen schlechte Ergebnisse von weniger als 20% für API YEAST IDENT [141], 12-35% für API 20C [5, 141], 33% für RapID Yeast Plus [5], 53 für API ATB 32C [118] und 40% für das MicroScan-System [39]. Dies ist nicht besonders überraschend, da diese Systeme primär für den Einsatz in der klinischen Mikrobiologie entwickelt wurden und dort auch sehr gute Ergebnisse erzielen [100, 113, 132, 149]. Ihre Anwendung auf lebensmittelassoziierte Hefen ist allerdings problematisch, da sowohl die Zusammensetzung der Datenbank als auch der Reaktionen dieser Kits nicht dem Spektrum der im Lebensmittelbereich vorkommenden Spezies gerecht wird. Deutlich bessere Ergebnisse von 74%, ca. 80% bzw. 55-70% sind zu erzielen, wenn klassische

Methoden nach Barnett et al. [7], Kreger-van Rij [82] oder die „simplified identification method“ (SIM) von Deak et al. [38] angewandt werden [5, 141]. Nachteilig wirkt sich hier jedoch der hohe Zeit- und Materialbedarf aus, denn es werden an die 100 verschiedene Merkmale getestet [7, 82] und die genaue Bestimmung von Wachstumscharakteristika kann mehrere Wochen beanspruchen.

Neben der Bestimmung physiologischer Charakteristika steht eine Reihe weiterer Methoden zur Identifizierung von Hefen zur Wahl. Pyrolysis mass spectrometry (PyMS) ist ebenso wie FTIR-Spektroskopie eine Technik, mit der ein Fingerabdruck des gesamten Organismus erstellt wird. Nach thermischer Degradierung komplexer Zellbestandteile in kleinere Fragmente werden diese über ein Massenspektrometer aufgetrennt und ergeben charakteristische Spektren [53], die zur Differenzierung von Arten [138] oder Stämmen [139] genutzt werden können. Die Analyse des Fettsäureprofils von Hefen kann ebenfalls zur Identifizierung von Hefenspezies eingesetzt werden [45], wenn auch davon auszugehen ist, dass zwischen einzelnen Spezies Überlappungen auftreten können [6]. Bestimmungsmethoden auf Basis genetischer Merkmale bieten zwar zuverlässige Ergebnisse, da sie kultivierungsbedingten Einflüssen gegenüber unempfindlich sind, werden in der Lebensmittelmikrobiologie jedoch selten bis gar nicht eingesetzt, weil sie z.T. sehr aufwendig oder kostenintensiv sind und gut geschultes Personal erfordern. Dennoch soll im Folgenden ein kurzer Überblick über die wichtigsten Verfahren gegeben werden. Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP), also das Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen und anschließender Auftrennung der Fragmente, findet verbreitet Anwendung bei der Identifizierung von Hefen [44, 48, 88, 147], ist jedoch abhängig von der Erstellung von Referenzmustern und der Wahl der richtigen Restriktionsenzyme. Temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) und denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) sind vergleichbare Methoden, die eine Unterscheidung verschiedener Spezies aufgrund unterschiedlicher Migration eines amplifizierten Genabschnitts im Polyacrylamidgel bedingt durch verschiedene Schmelzpunkte der DNA ermöglichen [27, 66, 98]. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-Analyse ermittelt sehr spezifische Bandenmuster mit Zufallsprimern amplifizierter DNA und wird sowohl zur Identifizierung von Hefen als auch zu deren Typisierung auf Stammebene eingesetzt [3, 96, 121,

147]. Eine gezielte Detektion bestimmter Arten direkt in der Probenmatrix und deren gleichzeitige Quantifizierung bietet die *In-situ*-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden [29, 81, 110, 131]. Es erfolgt hierbei jedoch nur ein Nachweis der Art, nach der gezielt gesucht wird. Die zuverlässigste Möglichkeit der Identifizierung von Hefen ist die Sequenzierung der ribosomalen DNA, für deren automatisierte Durchführung ein kommerziell zu erwerbendes Kit existiert [63]. Dieses ist wie die meisten Systeme auf die Identifizierung klinisch relevanter Hefen ausgelegt und erzielt in diesem Bereich mit 94% richtigen Identifizierungen gute Ergebnisse. Einen Überblick über die Anwendung der Sequenzierung in der molekularen Taxonomie geben Valente et al. [144].

## 2.2 Coryneforme Bakterien

### 2.2.1 Identifizierung coryneformer Bakterien mit FTIR-Spektroskopie

Die in dieser Arbeit erstellte Datenbank für coryneforme Bakterien umfasst 65 Stämme aus 17 Spezies, von denen 64 aus 16 Spezies für die Validierung der Datenbank herangezogen wurden; jede Art ist folglich mit durchschnittlich 4 Stämmen repräsentiert. Für die Identifizierung haben sich die von Oberreuter et al. [108] übernommenen Parameter als optimale Kombination herausgestellt, deren Ergebnis von 75% richtigen Identifizierungen auf Speziesebene durch keine Variation von Ableitung oder spektralen Fenstern verbessert werden konnte.

Bislang sind über die Identifizierung coryneformer Bakterien mit FTIR-Makrospektroskopie nur wenige Arbeiten publiziert. Arbeiten, in denen der Identifizierungserfolg der Methode ermittelt wurde, sind im Vergleich zur FTIR-Mikrospektroskopie sowie physiologischen und molekularbiologischen Methoden in Tabelle 8 zusammengestellt. Behrendt et al. [9] untersuchten grasassoziierte Mikroorganismen der Familie *Microbacteriaceae* und verwendeten die erste Ableitung, jedoch nur zwei spektrale Fenster von 1.201 bis 900 und 901 bis 699  $\text{cm}^{-1}$ . Für sie stand nicht eine Identifizierung, sondern die Klassifizierung und Untersuchung der Diversität von Isolaten und Referenzstämmen der Gattungen *Curtobacterium*, *Clavibacter* und *Rathayibacter* in Kombination mit molekularbiologischen und physiologischen Methoden im Vordergrund. Haag et al. [62] haben einen Versuch

der Charakterisierung und Identifizierung von 46 Stämmen aus 41 Spezies der Ordnung *Actinomycetales* unternommen und hierfür die erste Ableitung und drei spektrale Fenster von 1.500-1.200 , 1.200-900 und 906-700  $\text{cm}^{-1}$  mit der Gewichtung 1:1:2 verwendet. Eine von ihnen durchgeführte interne Validierung der Datenbank ergab 89% richtige Identifizierungen. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Mikrospektroskopie ist jedoch nicht möglich, weil es sich bei Haag et al. nur um die Ermittlung der Wiederfundrate bereits in der Bibliothek enthaltener Stämme und nicht um eine Identifizierung der Datenbank unbekannter Stämme handelte.

**Tabelle 8: Identifizierung coryneformer Bakterien mit unterschiedlichen Methoden**

Identifizierungssystem	Identifizierungserfolg [%]		
	klinisch	Lebensmittel	Referenz
FTIR-Mikrospektroskopie		75	<sup>a</sup>
FTIR-Makrospektroskopie		87	[108] <sup>b</sup>
		89 <sup>c</sup>	[62] <sup>d</sup>
RapID CB Plus	81		[54]
API Coryne	89		[55]
MicroSeq	67		[135]

<sup>a</sup> vorliegende Arbeit, 64 Referenzstämmen aus 16 Spezies

<sup>b</sup> 544 Referenzstämmen aus 54 Spezies

<sup>c</sup> grasassoziierte Mikroorganismen

<sup>d</sup> 46 Referenzstämmen aus 41 Spezies, nur interne Validierung

Da für die Validierung der hier vorgestellten Datenbanken das Vorgehen nach Oberreuter et al. [108] adaptiert wurde, können die Ergebnisse beider Arbeiten gut miteinander verglichen werden. Oberreuter et al. [108] haben für FTIR-Makrospektroskopie eine umfassende Datenbank mit Referenzspektren aufgebaut, die insgesamt 730 Spektren coryneformer Bakterien und verwandter Arten enthielt und bereits in zwei Arbeiten zur Identifizierung coryneformer Isolate von Käse angewandt wurde [93, 107]. 544 der 730 Stämme gehörten zu 54 Arten, die mit drei oder mehr Spektren in der Datenbank vertreten waren. Mit diesen erfolgte eine externe Validierung der Datenbank, bei der 87% der Spektren korrekt auf der Speziesebene identifiziert werden konnten. Zudem wurde die Rate der richtigen Identifizierungen für jede Spezies in Abhängigkeit der Zahl ihrer Refe-

renzspektren – gleich dem Muster in Abbildung 13 – ermittelt. Angesichts der Tatsache, dass annähernd zehn Spektren pro Art Bestandteil der Datenbank von Oberreuter et al. waren, sind die erzielten 75% richtiger Identifizierungen der vorliegenden Arbeit, die mit nur vier Stämmen pro Spezies erreicht wurden, als gutes Resultat einzuordnen. Oberreuter et al. schlussfolgern aus ihren Werten: „In order to obtain an identification at the species level with a reasonable probability, each species should be represented by an approximate number of five to ten strains in the database.“ [108]. Diese Aussage wird von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bestätigt. Bei der Identifizierung ergaben sich vor allen Dingen bei den Arten *By. tyrofermentans*, *Ko. rhizophila*, *R. tritici*, *St. equorum* und *St. xylosus*, die zum überwiegenden Teil aus Mangel an Referenzstämmen nur mit wenigen Spektren vertreten waren, Schwierigkeiten. Spezies mit mehr Repräsentanten wie *A. nicotianae*, *B. linens*, *Co. ammoniagenes*, *Co. variabile* und *M. gubbeenense* dagegen wurden sehr gut identifiziert.

### **2.2.2 Identifizierung coryneformer Bakterien mit physiologischen und molekularbiologischen Methoden**

Ein Vergleich der Identifizierung lebensmittelrelevanter coryneformer Bakterien durch FTIR-Mikrospektroskopie mit anderen auf routinemäßiger Basis anzuwendenden Techniken ist aufgrund mangelnder Daten in der Literatur nicht möglich, doch liegen Daten über die Identifizierung klinisch relevanter Arten vor. Es existieren verschiedene kommerziell zu erwerbende Verfahren (Tab. 8) wie das RapID CB Plus System der Firma Remel Inc., der API Coryne von BioMerieux und das MicroSeq 500 von Perkin Elmer, die jedoch ausschließlich auf die Identifizierung coryneformer Bakterien im medizinischen Bereich ausgerichtet sind. Aufgrund der tief greifenden Änderungen in der Klassifizierung coryneformer Bakterien [133], wird im Folgenden nur Literatur neueren Datums dargestellt. Funke et al. haben sowohl das RapID CB Plus System [54] als auch den erweiterten API Coryne in Kombination mit der Datenbankversion 2.0 [55] auf die Erzielung valider Ergebnisse bei der Identifizierung klinisch relevanter coryneformer Bakterien getestet. Ihre Ergebnisse sind mit 81% für das RapID CB Plus System und 91% für den API Coryne besser als die für die Mikrospektroskopie, jedoch wurde nicht immer

bis auf Speziesebene differenziert. So erfolgt beispielsweise mit RapID CB Plus [54] die Identifizierung von Organismen der Gattungen *Microbacterium*, *Oerskovia* und *Rothia* und mit API Coryne [55] der Gattungen *Microbacterium*, *Gordona* und *Rhodococcus* nur auf Gattungsniveau. Dennoch scheinen diese beiden Systeme dem MicroSeq-System von Perkin-Elmer überlegen zu sein, denn dieses erzielte in einer Studie von Tang et al. [135] mit 67% lediglich eine mittelmäßige Quote an richtigen Identifizierungen. Zwar werden mit MicroSeq die im klinischen Bereich besonders wichtigen Spezies *Co. diphtheriae* und *Co. jeikeium* zu jeweils 100% richtig identifiziert, alle anderen getesteten Arten der Gattung *Corynebacterium* jedoch nur zu 50%.

Zu alternativen Methoden der Identifizierung coryneformer Bakterien gehören die Analyse der zellulären Fettsäuren und der Mykolsäuren [11, 36], die insbesondere vor dem Boom der molekularbiologischen Methoden Anwendung fanden, jedoch auch heute noch eingesetzt werden [17]. Als weitere physikochemische Methode steht die Analyse von PyMS-Spektren für die Klassifizierung von Actinomyceten zur Verfügung [17, 122]. Auch molekularbiologische Techniken finden Anwendung, aber in deutlich geringerem Umfang als für andere Taxa. Hou et al. [69] haben über die Identifizierung von Spezies der Gattung *Corynebacterium* mit spezifischen Sonden berichtet und Felske et al. [50] TGGE zur Identifizierung eingesetzt. Amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) wird vornehmlich zur Differenzierung eher kleinerer Gruppen von coryneformen Bakterien eingesetzt [1, 68], kann allerdings auch bei entsprechend vorhandenen Referenzen zur Identifizierung genutzt werden [146]. Die am weitesten verbreitete Methode zur Identifizierung coryneformer Mikroorganismen ist jedoch die 16S rDNA-Sequenzierung, auf deren Basis Stackebrandt et al. [133] eine völlig neue Klassifizierung der Actinomyceten unter Schaffung der neuen Klasse *Actinobacteria* vorgeschlagen haben. Aufgrund der hohen Diskrepanz zwischen phylogenetischer Verwandtschaft und morphologisch-physiologischer Diversität unter den Actinomyceten erfolgt die taxonomische Klassifizierung bei Stackebrandt et al. ausschließlich über Homologien der 16S rDNA.

## 2.3 Milchsäurebakterien

### 2.3.1 Identifizierung von Milchsäurebakterien mit FTIR-Spektroskopie

Die Referenzdatenbank für Milchsäurebakterien umfasste 77 Stämme aus 19 Spezies. Von diesen wurden für die Validierung der Datenbank jedoch nur 71 Stämme aus 13 Spezies verwendet, da sechs Arten lediglich mit jeweils einem Stamm repräsentiert waren und deshalb nicht in die Bewertung einbezogen wurden. Als optimale Parameterkombination für die Identifizierung hat sich die erste Ableitung mit sechs spektralen Fenstern herausgestellt, die 74% richtige Identifizierungen auf Speziesebene erzielte (Abb. 21A), wobei sich 40% der falschen Identifizierungen allein zwischen den beiden Spezies *Lb. casei* und *Lb. paracasei* ergaben. Beide Arten sind sehr eng miteinander verwandt und über ihre taxonomische Stellung und die des Typstammes von *Lb. casei* ATCC 393<sup>T</sup> wird seit nunmehr annähernd 30 Jahren diskutiert. Eine gute Zusammenstellung der Arbeiten zu diesem Thema findet sich bei Dellaglio et al. [40]. Collins et al. [28] beschrieben 1989 *Lb. paracasei* aufgrund geringer DNA-Homologie zum Typstamm *Lb. casei* ATCC 393<sup>T</sup> als neue Spezies, übersahen dabei aber, dass sich *Lb. casei* ATCC 393<sup>T</sup> bereits kurz nach seiner Benennung zum Typstamm als nicht repräsentativ für die Spezies *Lb. casei* herausgestellt hatte [40]. Zahlreiche Veröffentlichungen der folgenden Jahre haben diese Indizien bestätigt und zudem gezeigt, dass andere Stämme von *Lb. casei* sehr starke Ähnlichkeit zu Stämmen von *Lb. paracasei* haben [43, 101, 142]. 2002 forderten Dellaglio et al. [40] zum wiederholten Mal eine Zusammenlegung beider Spezies unter dem Namen *Lb. casei* und die Benennung eines anderen Vertreters dieser Spezies als neuen Typstamm. Aufgrund dieser Situation wurden die FTIR-Spektren der Stämme von *Lb. paracasei* in die Art *Lb. casei* integriert, die Zahl der Spezies in der Datenbank somit auf 12 reduziert und eine erneute Validierung der Datenbank durchgeführt. Diese resultierte in einer Identifizierungsquote von 83% auf Speziesebene, wobei 77% der Stäbchen und 93% der Kokken richtig klassifiziert wurden (Abb. 21B).

Schwierigkeiten bei der Identifizierung ergaben sich zwischen *Lb. acidophilus*, *Lb. crispatus*, *Lb. helveticus* und *Lb. delbrueckii*, die alle zur Gruppe der obligat homofermentativen Milchsäurebakterien gehören und knapp 60% der Fehlidentifizierungen auf sich vereinen.

Problematisch im Besonderen ist *Lb. crispatus*, dessen Spektren zu 75% durch *Lb. acidophilus* missidentifiziert werden. Beide Spezies sind eng miteinander verwandt; die Stämme der früheren Subgruppe A2 [74] von *Lb. acidophilus* wurden aufgrund hundertprozentiger DNA-Homologie zu *Lb. crispatus* transferiert [23]. Phänotypisch gesehen sind beide Arten nur schwer zu unterscheiden [134] und auch mit molekularbiologischen Methoden ist eine Differenzierung von Arten der *Lb. acidophilus*-Gruppe mitunter nicht möglich. So können Ogier et al. [109] *Lb. acidophilus*, *Lb. amylovorus*, *Lb. crispatus*, *Lb. gallinarum* und *Lb. helveticus* mit TTGE nicht voneinander trennen und auch Meroth et al. [99] benötigen für die Differenzierung von *Lb. acidophilus* und *Lb. crispatus* mit DGGE ein zusätzliches, spezifisches Primerpaar. *Lb. helveticus* ist ebenfalls eng mit *Lb. acidophilus* und *Lb. crispatus* verwandt [126, 134]. Die Differenzierung von Spezies mit hohem Verwandtschaftsgrad über FTIR-Mikrospektroskopie stellt sich schwierig dar, da eine Adaption der spektralen Fenster auf dieses spezielle Problem und eine damit einhergehende Verbesserung der Ergebnisse nicht geschehen kann, ohne an einer anderen Stelle der Datenbank Einbußen im Identifizierungserfolg hinnehmen zu müssen. Gleiches gilt auch für die Differenzierung der unterschiedlichen Subspezies von *Lb. delbrueckii* und *Lc. lactis*. Die Identifizierungsrate ist bei beiden Spezies mit 50% nicht zufrieden stellend, doch verlangt eine derart empfindliche Differenzierung nach einer ausgefeilten Parameterselktion, die in einer univariaten Methode, wie sie hier angewandt wird, nicht zu leisten ist.

Eine korrekte Identifizierung von *Lb. fermentum* mit FTIR-Mikrospektroskopie konnte nicht erzielt werden, da diese Art lediglich mit zwei Spektren in der Datenbank vertreten ist. Dies gilt zwar auch für *Lb. brevis*, doch werden hier beide Spektren korrekt klassifiziert. Möglicherweise spielt es für die Identifizierung eine Rolle, welcher Herkunft die Referenzstämme sind, die im Fall von *Lb. brevis* beide von der DSMZ stammen, wohingegen bei *Lb. fermentum* ein Stamm der DSMZ und ein Isolat aus dem Molkereiumfeld in der Bibliothek abgelegt sind. Amiel et al. [2] hatten bei der Identifizierung von Wildisolaten mit einer ausschließlich aus offiziellen Referenzstämmen zusammengesetzten Datenbank ebenfalls unverkennbar Schwierigkeiten, denn nur 69% ihrer Isolate konnten korrekt klassifiziert werden.



Bereits 1994 haben Curk et al. [34] über die Identifizierung von Lactobazillen mit FTIR-Makrospektroskopie berichtet. Nach dem Aufbau einer Datenbank aus 53 offiziellen Referenzstämmen, die zu 13 Spezies gehörten, ermittelten sie die Wiederfundrate der verwendeten Stämme in einer internen Validierung. Sie verwendeten die erste Ableitung und den Spektrenbereich von  $1.500-700\text{ cm}^{-1}$  und konnten 91% der Spektren dem korrekten Stamm und 94% der richtigen Spezies zuordnen. Ein direkter Vergleich dieser Zahlen mit der hier vorliegenden Arbeit ist jedoch nicht möglich, da es sich um zwei unterschiedliche Ansätze der Validierung handelt. So muss bei externen Validierungen, wie sie beim Testen der Bibliotheken für die Mikrospektroskopie angewandt wurden, generell mit schlechteren Ergebnissen gerechnet werden, da die zu identifizierenden Stämme der Datenbank unbekannt sind.

Eine zweite Studie über die Identifizierung von Milchsäurebakterien mit FTIR-Makrospektroskopie wurde von Amiel et al. [2] durchgeführt. 28 Typstämmen aus 22 Spezies dienten als Referenzen, die zur Identifizierung von 17 weiteren offiziellen Stämmen und 48 Wildisolaten herangezogen wurden. Die Identifizierung erfolgte hierarchisch zunächst auf Gattungsebene, dann auf Speziesebene und schlussendlich für die Subspezies von *Lb. delbrueckii*, *Lc. lactis* und *Ln. mesenteroides* auf Subspeziesebene. Die 17 offiziellen Stämme, zugehörig zu fünf Arten, konnten zu 100% richtig auf Speziesebene und zu 86% auf Subspeziesebene identifiziert werden, die 48 Wildisolate zu 69% auf Speziesebene. Einschränkung ist zu bemerken, dass die Kultivierung der Organismen dieser Studie nicht einheitlich, sondern unter insgesamt fünf verschiedenen Bedingungen erfolgte. Es wurden zwei verschiedene Medien und drei Temperaturen verwendet, wobei mit Ausnahme von *Leuconostoc* und *Weissella*, die eine Gruppe bildeten, jede Gattung unter anderen Bedingungen kultiviert wurde. Bei *Lactobacillus* wurde zudem zwischen mesophilen und thermophilen Organismen differenziert. Diese unterschiedlichen Vorgehensweisen in der Probenvorbereitung erleichtern selbstverständlich die Identifizierung, da sich zu den speziesspezifischen Unterschieden die durch abweichende Kultivierung verursachten Differenzierungsmöglichkeiten addieren. Curk et al. [34] haben gezeigt, dass starke Variationen in der Inkubationstemperatur bei Spektren von *Lactobacillus* z.T. zu größeren Distanzen führen können als sie zwischen unterschiedlichen Spezies existieren, die Er-

gebnisse der Arbeit von Amiel et al. können demzufolge nur als bedingt aussagekräftig gewertet werden. Die Vorgehensweise eignet sich zudem nur sehr eingeschränkt für die Identifizierung unbekannter Isolate, da bereits vor der Messung mit FTIR-Spektroskopie eine Vordifferenzierung der Organismen vorgenommen werden muss, um sie den richtigen Inkubationsbedingungen zuzuordnen. Nichtsdestotrotz sind die erzielten 86% richtiger Identifizierungen auf dem Subspeziesniveau deutlich höher als in der hier vorliegenden Arbeit. Dies könnte in der angewandten Vorgehensweise der Identifizierung begründet liegen. Zum einen haben Curk et al. eine hierarchische Klassifizierung verwendet und zum anderen wurden mit der Discriminant Analysis Method (DAM) und der Search Standards Method (SSM) zwei statistische Verfahren verwendet. Mit diesen erfolgte eine spezifische Optimierung der Parameter für die Klassifizierung auf der jeweiligen Hierarchiestufe. Dennoch konnten bei der Identifizierung der Wildisolate nur 69% der richtigen Spezies zugeordnet werden, ein Ergebnis, das deutlich unter dem der Mikrospektroskopie liegt.

### **2.3.2 Identifizierung von Milchsäurebakterien mit physiologischen und molekularbiologischen Methoden**

Die klassische Identifizierung von Milchsäurebakterien erfolgt über die Bestimmung morphologischer und physiologischer Charakteristika [42, 67, 77, 136], die partiell über kommerziell zu erwerbende Kits wie API 50 CH (bioMerieux) abgedeckt werden können. In den letzten Jahren wurde jedoch verstärkt auf molekularbiologische Methoden zurückgegriffen, von denen im Folgenden die wichtigsten angesprochen werden sollen. *In-situ*-Hybridisierung [12, 47] kann direkt im Lebensmittel angewandt werden und bietet den Vorteil, dass im Zuge der Identifizierung auch eine Quantifizierung erfolgen kann. Allerdings können nur jene Organismen detektiert werden, nach denen mit spezifischen Sonden explizit gesucht wird. Wenn eine Quantifizierung nicht erforderlich ist, kann zur gezielten Detektion bestimmter Organismen auch eine PCR-Reaktion mit spezifischen Primern eingesetzt werden [41, 124]. Bei Verwendung unspezifischer Primer wie bei rep-PCR [37, 57] oder Zufallsprimer bei RAPD [4, 30] werden sehr spezifische Muster erzielt, deren Diskriminierungsfähigkeit über die Speziesebene hinausgeht und eine Typisierung

auf Stammebene erlaubt. Eine Identifizierung von Milchsäurebakterien auf Speziesebene ohne vorherige Isolierung der Organismen aus einer Probe kann mit DGGE oder TTGE erreicht werden [99, 109, 148]; auch die Klassifizierung über Restriktionsmuster findet breite Anwendung [41, 73, 116].

## 2.4 Optimierung der Identifizierung

Die in dieser Arbeit erarbeiteten Referenzdatenbanken für die Identifizierung von Hefen, coryneformen Bakterien und Milchsäurebakterien haben in erster Linie Modellcharakter, da sie nur eine sehr begrenzte Zahl an Arten und Stämmen umfassen. Tabelle 9 fasst die Zusammensetzung der Bibliotheken mit Angabe ihres Identifizierungserfolges noch einmal zusammen.

**Tabelle 9: Zusammensetzung der Referenzdatenbanken für die Validierung und erzielter Identifizierungserfolg**

	Hefen	cor. Bakterien	Milchsäurebakterien		
			gesamt	Stäbchen	Kokken
Gattungen	9	9	5	1	4
Spezies	13	16	12	8	4
Stämme	82	64	71	45	26
Stämme/Spezies	6,3	4	5,9	5,6	6,5
Identifizierungserfolg	80%	75%	83%	77%	93%

Der erzielte Identifizierungserfolg zwischen 75 und 83% ist für die gegebene Größe der Datenbanken ein gutes Ergebnis, jedoch scheint das Potential der Technik noch keinesfalls voll ausgereizt zu sein. Durchschnittlich sind für jede Art zwischen vier und 6,5 Stämme abgelegt (Tab. 9), was sich z. T. im unteren Bereich dessen bewegt, was Oberreuter et al. [108] für eine verlässliche Identifizierung empfehlen, z. T. jedoch noch darunter liegt. Eine Erweiterung der Bibliotheken unter Einbeziehung zusätzlicher Stämme für jede Art kann hier weitere Verbesserungen bringen. Dieser Trend wurde bereits während des Aufbaus der Datenbanken beobachtet und zudem bei der Erhöhung der Zahl der Spektren für *D. hansenii* explizit getestet (vgl. Kap. 2.1.1 des Ergebnisteils). Dort hat sich gezeigt, dass

eine Erhöhung der Spektrenzahl vor allem dann große Fortschritte bringt, wenn erst wenige Spektren der Art vorhanden sind. Ab einer Spektrenzahl von ca. zehn pro Spezies sind die Steigerungen deutlich geringer und ab ca. 15 Spektren ist kaum noch eine Verbesserung der Ergebnisse festzustellen. Die Fehlidentifizierungen entfallen hier ausschließlich auf offizielle Referenzstämme der CBS oder DSMZ, deren Problematik bereits in Kapitel 2.1.1 der Diskussion behandelt wurde. Für eine weitere Verbesserung der Identifizierungsergebnisse verspricht eine Änderung der Spektrenauswertung statt der Aufnahme weiterer Stämme in die Datenbank vermutlich mehr Erfolg.

Eine relativ einfache Möglichkeit ist hier der Ersatz von Mittelwertspektren durch Einzelspektren unterschiedlicher Wiederholungsmessungen. So liegen für jeden Stamm mehrere leicht abweichende Spektren vor, was die Wahrscheinlichkeit für Fehlidentifizierungen aufgrund von Varianzen in der Probenpräparation reduziert. Wesentlich aufwendiger gestaltet sich dagegen die Anwendung multivariater Statistik für die Spektrenidentifizierung. Das in der vorliegenden Arbeit angewandte Prinzip der Auswertung ist univariat, greift also nur auf eine Größe – in diesem Fall die errechnete spektrale Distanz zwischen den Spektren – zurück. Diese setzt sich aus den über das gesamte Spektrum verteilten Differenzen zusammen [104]; eine Auflösung in einzelne Wellenzahlbereiche findet nicht statt und ein Teil der im Spektrum enthaltenen Informationen geht somit wieder verloren. Bei multivariaten Verfahren der Statistik hingegen beruht die Identifizierung auf mehreren Variablen, die im Fall der Auswertung von FTIR-Spektren der Absorption bei einer bestimmten Wellenzahl entsprechen. Bei der PCA, einer häufig verwandten Methode, werden beispielsweise gezielt die Variablen extrahiert, die die größtmögliche Varianz erklären. Timmins et al. [138] haben PCA für die Differenzierung sehr eng verwandter *Candida*-Arten eingesetzt und eine nahezu hundertprozentige Trennung erreicht. Auch Amiel et al. [2] haben mit DAM und SSM zwei statistische Verfahren zur Identifizierung von Milchsäurebakterien verwendet (vgl. Kap. 2.3.1 der Diskussion). Ein weiterer Schritt zur Optimierung der Datenauswertung kann die Verwendung überwachter Klassifizierungssysteme sein. Hier wird das entwickelte Identifizierungsschema mit einem Validierungsdatensatz überprüft und anhand der erzielten Ergebnisse weiter optimiert. Maquelin et al. [95] haben unter Verwendung der LDA und künstlichen neuronalen Netzen

(kNN) ein Klassifizierungsschema für klinisch relevante Pathogene der Gattungen *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Streptococcus* und *Candida* aufgebaut und erzielen bei der Auswertung von Raman-Spektren mit LDA 92% richtige Identifizierungen und von FTIR-Spektren mit kNN sogar 98%.

Die von Maquelin et al. [95] verwendeten kNNs sind Modelle, die – sehr vereinfacht – dem Zentralen Nervensystem nachempfunden und in der Lage sind, einen Lernprozess zu durchlaufen, im Rahmen dessen die Differenzierung von FTIR-Spektren anhand vorgegebener Datensätze optimiert wird. Bei Kombination verschiedener kNNs zu einer hierarchischen Struktur mit jeweils auf die gegebene Stufe der Klassifizierung abgestimmten Parametern lässt sich ein Klassifizierungsschema aufbauen, mit dem auch spezielle Probleme, die v.a. in viele verschiedene Spezies umfassenden Datenbanken auftauchen, zielgerichtet gelöst werden können. Abbildung 28 zeigt schematisch ein hierarchisches Klassifizierungssystem zusammengesetzt aus mehreren kNNs zur Identifizierung von Spektren verschiedener Gattungen.

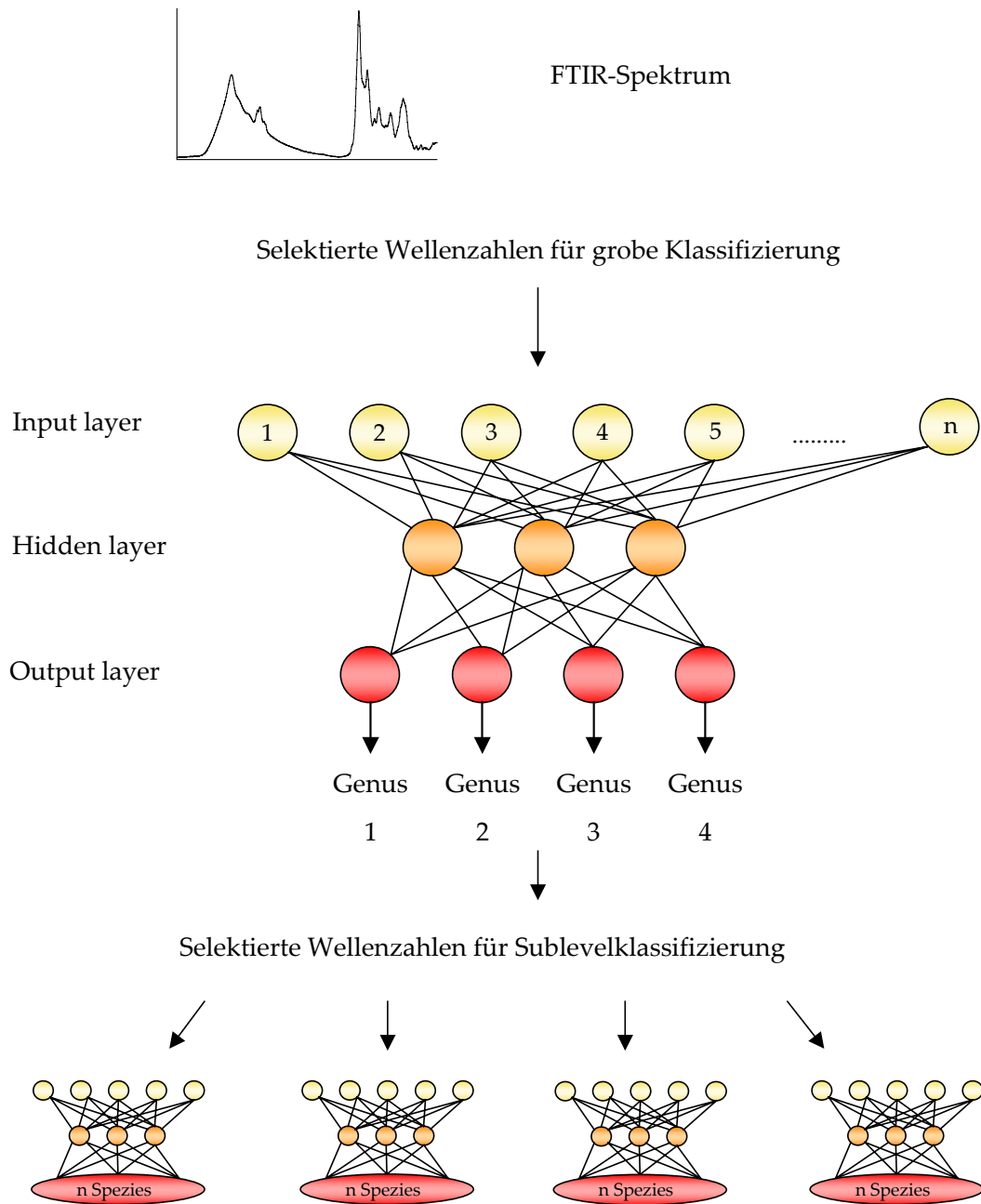


Abb. 28: Schematische Darstellung des Aufbaus eines hierarchisch strukturierten kNN nach Schmitt & Udelhoven [128].

### 3. Populationsanalysen

#### 3.1 Vorarlberger Bergkäse

Die Analyse des Reifungskonsortiums eines Vorarlberger Bergkäses diente als erster Praxistest für die Datenbank für coryneforme Bakterien und Staphylokokken. Mehr als 1000 Spektren wurden identifiziert und die sechs Spezies *St. equorum*, *Co. casei*, *Co. variabile*, *A. casei*, *B. linens* und *By. alimentarium* konnten detektiert werden, von denen mit Ausnahme von *A. casei* Referenzen in der Datenbank hinterlegt waren. Die Identifizierungen von *St. equorum*, *Co. variabile*, *B. linens* und *By. alimentarium* waren eindeutig, *Co. casei* jedoch wurde entweder als *Co. casei* oder *Co. ammoniagenes* identifiziert. Dies dürfte zum einen daran liegen, dass beide Arten sehr eng verwandt sind – sie haben eine Sequenzähnlichkeit von 98% – und phänotypisch nur über drei Reaktionen differenziert werden können [18], zum anderen aber auch daran, dass *Co. casei* lediglich durch ein Spektrum in der Datenbank repräsentiert war. Die Identifizierung von *A. casei* war problematisch, da diese Art nicht in der Bibliothek vertreten war. Die Identifizierungen der Spektren stellten eine Mischung aus *By. faecium*, *By. conglomeratum*, *Micrococcus luteus* oder *A. nicotianae* dar und wiesen zudem schlechte Hitqualitäten auf. Diese beiden Tatsachen waren deutliche Hinweise darauf, dass es in der Datenbank kein Pendant zu den zu klassifizierenden Spektren gab, was durch die Identifizierung als *A. casei* per 16S rDNA-Sequenzierung bestätigt wurde.

Neben der Identifizierung jedes einzelnen Spektrums kann die Zugehörigkeit der Spektren zu bestimmten Arten auch über eine Clusteranalyse ermittelt werden, wie es in Abbildung 22 dargestellt ist. Die Spektren jeder Spezies bilden ein Subcluster und sind mit Ausnahme von *By. alimentarium* klar von den übrigen Spezies separiert. Die Identifizierung einiger weniger Spektren aus jedem Cluster reicht hier aus und kann auf den Rest der Spektren eines Clusters extrapoliert werden. Allerdings sind in Abbildung 22 drei Spektren nicht richtig gruppiert. Zwei Spektren von *Co. variabile* fallen in das Cluster von *Co. casei* und umgekehrt ein Spektrum von *Co. casei* in das von *Co. variabile*. Nichtsdestotrotz sind die Identifizierungen dieser Spektren eindeutig. Zudem wurde die Mikrokolonie des betroffenen *Co. casei*-Spektrums vom ZnSe-Kristall isoliert und die Identifizierung

mit FTIR-Makrospektroskopie verifiziert. Das unkorrekte Gruppieren von Spektren scheint demnach durch die Berechnung des Dendrogramms verursacht zu sein. Dies wird durch die Anwendung eines anderen Algorithmus für die Kalkulation bestätigt. Bei Verwendung von Average Linkage statt Ward's Algorithmus (Abb. 29) sind die beiden *Co. variable*-Spektren dem richtigen Subcluster zugeordnet, ein drittes Spektrum von *Co. variable* und das *Co. casei*-Spektrum jedoch nicht. Zudem sind vier Spektren von *B. linens*, eines von *St. equorum* und zwei der nicht identifizierten Spektren abweichend gruppiert. Somit muss bei der Darstellung der Zusammensetzung einer Flora im Dendrogramm berücksichtigt werden, dass – abhängig vom verwendeten Algorithmus – in Einzelfällen die Klassifizierung von Spektren nach der Clusteranalyse nicht der wahren Identität entspricht, das Bild im Großen und Ganzen jedoch zutreffend ist.

Die in der Flora detektierten Spezies sind gängige Reifungsorganismen für Rotschmierkäse und ihr Anteil an der Flora sowie die ermittelte Gesamtkeimzahl von  $3,5 \times 10^8$  KbE/cm<sup>2</sup> liegen ebenfalls im Bereich dessen, was bereits in anderen Arbeiten publiziert wurde [14, 18, 20, 22, 93, 107, 129, 143]. Für *A. casei* liegen verständlicher Weise keine Daten vor, doch stammen die beiden bei EMBL abgelegten Sequenzen von Isolaten, die ebenfalls von einem Käse isoliert wurden. Allein der Anteil von *St. equorum* an der Population ist mit 25% erheblich höher als die bislang in der Literatur berichteten 0,1-5% [14, 20]. Diese Daten gehen allerdings auf Analysen von Tilsiter oder ähnlichen Käsen zurück, die zu den Schnittkäsen gehören; Bergkäse zählt jedoch zu den Hartkäsen. Der Wassergehalt in der fettfreien Käsemasse liegt bei Bergkäse mit 52,5-53,5% unter dem für Tilsiter mit 56-60% [76] und könnte für *St. equorum*, der in den meisten Fällen über die salzhaltige Schmierlake auf den Käse gelangt [14], einen Selektionsvorteil bedeuten.



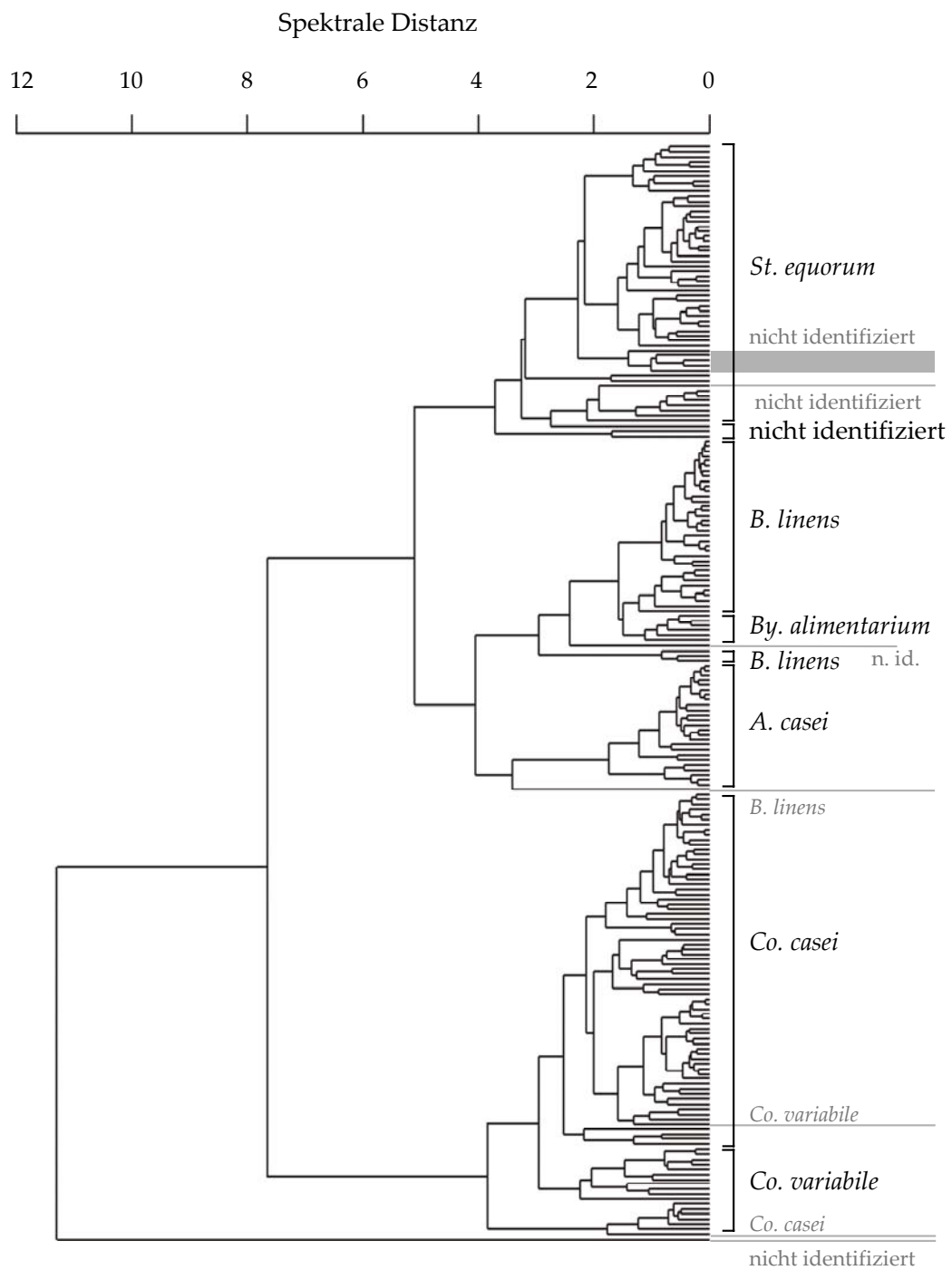


Abb. 29: Zusammensetzung der Oberflächenreifungsflora von Vorarlberger Bergkäse ermittelt nach 48 h Inkubation. Die Identifizierung der Spektren jedes Clusters ist in schwarz angegeben; falsch gruppierte Spektren sind grau gekennzeichnet. Identifizierungsparameter nach Oberreuter et al. [108], Average linkage, Korrelation mit Normalisierung auf Reprolevel.

### 3.2 Appenzeller Käse

In der zweiten Populationsanalyse wurde das Reifungskonsortium eines Appenzeller Käses in einem Doppelansatz untersucht. Beide Male wurden mehr als 1000 Spektren aufgenommen und insgesamt die sechs Spezies *St. equorum*, *Co. casei*, *A. casei*, *B. linens*, *M. gubbeenense* und *Ec. faecalis* sowie eine nicht identifizierbare coryneforme Art detektiert. Die fünf erstgenannten Arten waren Bestandteil der Referenzdatenbank, die beiden letzteren nicht. Die Spektren der nicht identifizierten Spezies wurden – ähnlich wie die von *A. casei* bei der Untersuchung des Vorarlberger Bergkäses – keiner Spezies zugeordnet und wiesen schlechte Hitqualitäten auf. Da auch eine Analyse der 16S rDNA-Sequenz keine akzeptablen Ähnlichkeiten zu anderen Organismen ergab, ist davon auszugehen, dass es sich um eine noch nicht beschriebene Spezies handelt. Die Spektren von *Ec. faecalis* waren eindeutig nicht identifizierbar, da alle Ergebnisse sehr schlechte Hitqualitäten aufwiesen und die Identifizierung von *Co. casei* gestaltete sich, wie schon oben beschrieben, aufgrund der Ähnlichkeit zu *Co. ammoniagenes* schwierig.

Die Ergebnisse beider Ansätze der Floraanalyse des Appenzeller Käses sind mit maximal 1,9% Abweichung im Fall von *Co. casei* (vgl. Tab. 6) sehr ähnlich und dokumentieren die gute Reproduzierbarkeit der Methode. Die wiederholte Detektion von Spezies mit geringem Anteil an der Flora – wie im Fall von *Ec. faecalis* – belegen zudem eine hohe Sensitivität. Betrachtet man die Wahrscheinlichkeit des Nachweises einer Spezies aus rein statistischer Sicht, so liegt diese bei einer Stichprobe von 300 gemessenen Kolonien für eine Art mit 1% Anteil an der Population bei 95% und für eine Art mit 0,5% Anteil bei 78%.

Die Differenzen im Vorkommen von *Co. casei*, *St. equorum* und *M. gubbeenense* könnten durch Inhomogenitäten innerhalb der Flora bedingt sein. So stammten im ersten Ansatz 44% der Käserinde von der Seite des KäselaiBes und 56% von der Unterseite, im zweiten Ansatz hingegen 57% von der Seite und nur 43% von der Unterseite. Die Unterseite des LaiBes ist der Umgebungsluft weniger stark ausgesetzt und demnach nicht ganz so ausgetrocknet wie die Seitenflächen. Diese Bedingungen sind vorteilhaft für die dort existierenden Mikroorganismen – bestätigt zudem von der annähernd eine Log-Einheit höheren Keimzahl – und könnten für leichte Veränderungen in der Florazusammensetzung verursachend sein. Die relativ großen Unterschiede zwischen beiden Analysen zu den Zeit-

punkten nach 20 und 30 Stunden Inkubation (vgl. Tab. 7) könnten ebenfalls damit in Zusammenhang stehen. Da zum Ende der Analyse annähernd gleiche Anteile der Organismen festgestellt wurden, ist es wahrscheinlich, dass die Differenzen zu Beginn von einer verlängerten lag-Phase der Bakterien im zweiten Ansatz ausgehen. Für Staphylokokken sind 20 Stunden Inkubation vollkommen ausreichend zur Bildung genügend großer Mikrokolonien; ein etwas verzögertes Wachstum zu Beginn der Inkubation spielt somit keine Rolle für die Detektion. Für *Co. casei* und *Ec. faecalis*, der aerob nicht so gut wächst wie unter mikroaerophilen Bedingungen, scheint diese Zeitdauer im ersten Ansatz gerade ausgereicht zu haben, Kolonien geeigneter Größe zu bilden, im zweiten dagegen nicht. So ließe sich erklären, dass im ersten Ansatz knapp 17% der nach 20 Stunden aufgenommenen Spektren *Co. casei* zugeordnet werden, im zweiten Ansatz hingegen nicht ein einziges. Die Zusammensetzung der Reifungsflora des Appenzellers birgt mit Ausnahme der nicht identifizierbaren Spezies keine Überraschungen. Alle nachgewiesenen Organismen, für die bereits eine valide Beschreibung vorliegt, sind typisch für Rotschmierkäse [14, 18-20, 22, 93, 107, 112, 143] und auch die Gesamtkeimzahl liegt mit  $1,4 \times 10^9$  bzw.  $3,3 \times 10^8$  KbE/cm<sup>2</sup> im Bereich des Üblichen. *Ec. faecalis* als sauerstofftolerantes Mitglied der Milchsäurebakterien gehört zwar nicht zur Oberflächenreifungsflora, wurde aber vermutlich detektiert, weil die Schmiere nicht vom Käse abgekratzt, sondern die Rinde abgeschnitten wurde und somit ein geringer Teil der Käsemasse mit in die Analyse einging. Obwohl *Ec. faecalis* opportunistisch pathogen ist, zählt er zur endogenen Flora von Käse und trägt zur Reifung und Aromaentwicklung bei [52].

### 3.3 Emmentaler Käse

#### 3.3.1 Analyse der eingesetzten Starterkultur

Die Identifizierung und Klassifizierung der 60 aus der Starterkultur isolierten Organismen mit FTIR-Makrospektroskopie und FTIR-Mikrospektroskopie ergab, dass die Kultur vermutlich aus zwei Stämmen von *Str. thermophilus* und zwei bis drei Stämmen von *Lb. delbrueckii* bestand. Eine endgültige Aussage über die Zahl der Stämme und die Zugehörigkeit der einzelnen Isolate zu diesen kann allerdings nicht gemacht werden, da die

erzielten Ergebnisse beider Spektroskopiemethoden nicht hundertprozentig übereinstimmen. So gehören die Isolate K4 und K12-2 von *Str. thermophilus* je nach angewandter Methode zu einem anderen Stamm. Im Fall von *Lb. delbrueckii* scheint die Flora, wenn mit FTIR-Makrospektroskopie gemessen wird, aus drei statt zwei Stämmen zusammengesetzt zu sein. Zudem ist hier auch die Zuordnung der Isolate St16 und St21 zu den einzelnen Stämmen abweichend.

Die Ursachen für diese Unterschiede liegen vermutlich in den unterschiedlichen Parametern der Inkubation und dem damit einhergehenden veränderten physiologischen Status der Zellen. So wurde für eine Messung mit FTIR-Makrospektroskopie 48 Stunden bei 30°C und mit Mikrospektroskopie 24 Stunden bei 34°C bebrütet. Zudem werden mit Mikrospektroskopie prinzipiell isoliert liegende Einzelkolonien gemessen, im Fall der Makrospektroskopie jedoch ein homogener Zellrasen. Ohne Verwendung einer Referenzmethode wie RAPD zur Überprüfung der Stammzugehörigkeit, wie es beispielsweise Sandt et al. [121] für die Typisierung von *C. albicans*-Stämmen gemacht haben, kann keine Entscheidung über die letztendliche Einteilung der Isolate getroffen werden. Wichtig in diesem Zusammenhang wäre eine Differenzierung der spektralen Unterschiede in kulturbedingte Varianz und stammtypische Merkmale, um auf dieser Grundlage die Wahl der für eine Klassifizierung verwendeten spektralen Fenster zu modifizieren und kulturbedingte Differenzen aus der Auswertung auszuschließen. Erschwerend kommt bei der Stammeinteilung von *Lb. delbrueckii* hinzu, dass die Kultur höchstwahrscheinlich von einem Phagen befallen war, was die Reproduzierbarkeit der Messungen stark eingeschränkt und eventuell stammtypische Merkmale überlagert hat.

### 3.3.2 Analyse der Flora im Käse

Die vor dem Pressen in der Käsemasse vorhandene Flora wurde von *Str. thermophilus* dominiert, der 86% der Population stellte und in zwei Stämme unterschieden werden konnte; *Lb. delbrueckii* hatte 14% Anteil an der Population und konnte in drei Stämme differenziert werden (Abb. 25). Nach dem Pressen repräsentierte *Lb. delbrueckii* mit etwa 98% den Großteil der Flora, *Str. thermophilus* war lediglich noch mit 0,1% vertreten und 2,2%

der Organismen konnten nicht identifiziert werden (Abb. 26). *Str. thermophilus* und die unbekannte Art stellten zwar 1% bzw. 22% der Spektren, doch wurden beim Kolonietransfer nur etwa 10% der Kolonien von der Agarplatte auf den ZnSe-Probenhalter überführt. Da 150 von der Platte isolierte Organismen mit FTIR-Makrospektroskopie als *Lb. delbrueckii* identifiziert wurden, war der Anteil von *Str. thermophilus* und der nicht identifizierten Art an der Flora etwa um den Faktor zehn geringer und der Anteil von *Lb. delbrueckii* entsprechend höher (vgl. Abb. 27).

Die hohe spektrale Distanz der nicht identifizierbaren Spektren zu den übrigen Clustern in Abbildung 26 legt den Schluss nahe, dass es sich um eine nur entfernt verwandte Spezies, wenn nicht gar um eine andere Gattung handeln müsste. Rein statistisch gesehen hätten unter den 150 (90 + 60) von der Agarplatte isolierten und mit FTIR-Makrospektroskopie identifizierten Organismen drei Vertreter dieser nicht identifizierbaren Art sein müssen und die Wahrscheinlichkeit, eine Art mit 2,2% Anteil an der Population bei einer Stichprobe von 150 Organismen nicht zu detektieren, liegt nach der Poisson-Verteilung bei nur 3,7%. Die Identifizierung der Isolate mit FTIR-Makrospektroskopie ergab jedoch ausnahmslos eine Identifizierung als *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*. Es besteht somit eine marginale Möglichkeit, dass die Art aufgrund ihres geringen Vorkommens bei der Isolierung nicht detektiert wurde; es kann jedoch auch darüber spekuliert werden, ob Veränderungen der Zellzusammensetzung aufgrund der Proliferation des Phagen zu den starken Abweichungen in den Spektren geführt haben.

Die starke Verschiebung der Floraverhältnisse während der Säuerung von einer *Str. thermophilus*-Dominanz zu der mehr als deutlichen *Lb. delbrueckii*-Dominanz ist ausgesprochen auffällig und kann durch ein simples Überwachsen von *Str. thermophilus* durch *Lb. delbrueckii* nicht erklärt werden. Die absolute Keimzahl von *Str. thermophilus* vor dem Pressen – errechnet aus der Gesamtkeimzahl und dem Anteil von *Str. thermophilus* an der Flora – betrug etwa  $3 \times 10^6$  KbE/g, nach dem Pressen jedoch nur noch etwa  $6 \times 10^5$  KbE/g. Sie ist also um den Faktor fünf gesunken, obwohl eigentlich Wachstum hätte stattfinden sollen. Die Ursache zu diesem Rückgang liegt vermutlich in einer Autolyse der Organismen. Husson-Kao et al. [71] haben gezeigt, dass im Medium zur Neige gehende Lactose bei einigen *Str. thermophilus*-Stämmen eine massive Autolyse auslöste, die innerhalb we-

niger Stunden zu einem Rückgang der optischen Dichte auf nahezu Null führte. *Str. thermophilus* kann von den in der Lactose enthaltenen Zuckern nur Glucose verwerten; Galactose wird nicht verstoffwechselt, sondern zurück ins Medium sekretiert [24]. Nach Abbau der Lactose und Verwertung der Glucose steht ihm also keine Kohlenstoffquelle mehr zur Verfügung. Da bei der Produktion von Emmentaler innerhalb der ersten vier bis fünf Stunden des Pressens die vorhandene Lactose fast vollständig abgebaut wird [24], könnte eine hierdurch ausgelöste Autolyse in den verbleibenden 14-15 Stunden des Pressens die Keimzahl von *Str. thermophilus* stark verringert haben.

Der Vergleich der Flora im Käse mit der Starterkultur hat gezeigt, dass nicht nur die Entwicklung der verschiedenen Stämme einer Art während der Produktion unterschiedlich gut war, sondern außerdem Organismen nachgewiesen werden konnten, die nicht in der Ausgangskultur enthalten waren. So wurde bereits vor dem Pressen – also ca. 2 Stunden nach dem Beimpfen der Kesselmilch – nur noch ein *Str. thermophilus*-Stamm mit der Kultur in Verbindung gebracht, der zweite Stamm war in der Flora nicht mehr detektierbar. An seine Stelle trat ein anderer Stamm, dessen Herkunft ungeklärt ist. Möglicherweise war auch er in der Starterkultur enthalten, wurde aber aufgrund zu geringer Zellzahl nicht erfasst, da im Fall der Kokken nur eine Stichprobe von 25 Isolaten untersucht wurde. Er könnte auch während der Anzucht der Betriebskultur, die über eine Stammkultur aus dem gefrorenen Stock gezogen wird, in die Flora gelangt sein und sich bereits in der Betriebskultur etabliert haben, mit der dann die Kesselmilch beimpft wurde. Die Stamm- und Betriebskultur wurden im vorliegenden Fall jedoch nicht analysiert. Da der untersuchte Emmentaler nicht aus Rohmilch, sondern aus pasteurisierter Milch hergestellt wird, scheidet die Rohmilchflora als Kontaminationsquelle aus.

Im Fall der Laktobazillen war nach dem Pressen nur noch Stamm 3 im Käse nachweisbar. Das Cluster in Abbildung 26 ist geteilt, 65% der Spektren bilden das größere, 12% das kleinere, mit deutlichem Abstand distanzierte Cluster. Dazwischen liegen die zwei Spektren von *Str. thermophilus*. Die Identifizierung der Spektren des kleineren Clusters ergab ebenfalls eine Zugehörigkeit zu *Lb. delbrueckii* Stamm 3, wenn auch mit schlechterer Hitqualität. Die Ursache könnte in dem Befall der Kultur mit einem Phagen zu finden sein, der bereits bei der Untersuchung der Starterkultur festgestellt wurde. Als Alternative

kommt ein Stamm in Betracht, der seinen Ursprung nicht in der Starterkultur hat, sondern auf ähnlichem Weg wie der *Str. thermophilus*-Stamm A in den Käse gelangt ist.

### 3.4 Alternative Methoden zur Populationsanalyse

Quantitative Populationsanalysen sind in der Regel mit sehr viel Arbeit verbunden, gilt es doch für ein zumindest annähernd genaues Ergebnis eine ausreichend große Stichprobe von Organismen zu untersuchen, die nebenbei für die Anwendung der meisten Identifizierungstechniken zunächst aus der Probe isoliert werden müssen. Alternativ können Verfahren angewandt werden, die die Identifizierung der Organismen mit deren Quantifizierung verbinden, wie es auch für die hier vorgestellte FTIR-Mikrospektroskopie der Fall ist. Im Gegensatz zu dieser, die ja eine phänotypische Methode darstellt, basieren molekularbiologische Techniken auf dem Nachweis genotypischer Merkmale und sind somit von einer vorherigen Kultivierung der Mikroorganismen unabhängig. Einen guten Überblick über diese Methoden im Hinblick auf Populationsanalysen aus lebensmittelassoziierten Ökosystemen geben Giraffa & Neviani [58]. Im Folgenden wird auf drei Verfahren, die eine genaue Quantifizierung der Organismen erlauben, näher eingegangen.

Zu diesen Techniken zählt die *In-situ*-Hybridisierung mit fluoreszierenden Sonden (FISH), die bereits verschiedentlich für die Analyse mikrobieller Konsortien aus Lebensmitteln verwendet wurde [47, 80]. Ercolini et al. [47] haben bei ihrer Analyse der Populationsstruktur in Stilton Käse nicht nur unterschiedliche Arten von Milchsäurebakterien nachgewiesen, sondern auch deren Lokalisation im Käse selbst. Die Zahl der simultan einsetzbaren Sonden bei FISH ist jedoch auf einige wenige limitiert, da zu viele gleichzeitig eingesetzte Farbstoffe nur sehr schlecht oder gar nicht mehr voneinander unterschieden werden können. Zur Erzielung eines erhöhten Probendurchsatzes bietet sich die Kombination fluoreszenzmarkierter Sonden mit Durchflusszytometrie an [35, 60].

Eine weitere Technik zur quantitativen Populationsanalyse ist Real-time-PCR mit spezifischen Primern. Hier ist die Amplifizierung eines DNA-Fragments mit der Freisetzung eines Fluoreszenzsignals gekoppelt, dessen Intensität mit zunehmender Menge an amplifizierter DNA steigt [92]. Je nach Anzahl der Zyklen, die benötigt werden, um einen

Grenzwert an Fluoreszenz zu überschreiten, kann anhand von Standards auf die in der Probe ursprünglich vorhandene DNA-Menge rückgeschlossen werden. Die Sensitivität dieser Methode ist sehr hoch; so wiesen Huijsdens et al. [70] für die Quantifizierung von Bakterien des Darms mit Real-time-PCR eine Sensitivität von 1 KbE für *E. coli* und 9 KbE für *Bacteroides vulgatus* und Nogva et al. [106] von 6 bis 60 KbE für *L. monocytogenes* nach. Es können jedoch, wie auch beim Einsatz fluoreszenzmarkierter Sonden, nur diejenigen Organismen detektiert werden, nach denen ausdrücklich gesucht wird.

Eine sehr leistungsfähige Technik für Populationsanalysen, die den Nachweis vieler verschiedener Mikroorganismen in einem Schritt vereint, sind Microarrays. Hunderte bis Tausende auf einen Chip gespottete DNA-Fragmente hybridisieren mit DNA aus der Probe und erzeugen ein Fluoreszenzsignal. Die Intensität dieses Signals korreliert wiederum stark mit der Menge der gebundenen DNA [152]. Aufgrund der hohen Zahl an möglichen Referenzen auf dem Chip ist diese Technik nicht nur für die Analyse begrenzt komplexer Konsortien, wie z.B. Reifungsfloren in Lebensmitteln, sondern insbesondere für komplexe Populationen geeignet.

Der Vorteil kultivierungsunabhängiger Techniken ist die Detektion aller in einer Probe vorhandenen Mikroorganismen, also auch jener, die auf gängigen Nährmedien nicht kultiviert und damit auch nicht erfasst werden können. Methoden, die auf der Amplifizierung von DNA beruhen, unterliegen jedoch einigen anderen Limitierungen [97]. Einige dieser Techniken erlauben nur eine semiquantitative Analyse der Flora, da z.B. im Fall von DGGE über die Stärke der Bande im Acrylamidgel oder im Fall der LH-PCR über eine Evaluierung der Peakhöhe des Fluoreszenzsignals [90] auf den Anteil der jeweiligen Art an der Population rückgeschlossen wird. Zudem hat DGGE im Vergleich zu beispielsweise Real-time-PCR und FTIR-Mikrospektroskopie eine limitierte Sensitivität, denn es können nur etwa die dominierenden 90-99% einer Flora detektiert werden [99]. Andere PCR-basierte Methoden, die wie DGGE auf der unspezifischen Amplifizierung der DNA beruhen, könnten ähnlichen Einschränkungen unterliegen.

Sehr sensitive Methoden wie die oben beschriebene *In-situ*-Hybridisierung, Real-time-PCR oder Microarrays sind kompliziert in der Durchführung und z.T. sehr teuer. Zudem impliziert die Anwendung von *In-situ*-Hybridisierung und Real-time-PCR eine vorherige



Festlegung auf die Detektion bestimmter Organismen. Dies ist mit einer möglichst universellen Identifizierung von Mikroorganismen nicht vereinbar und die Techniken sind damit für einen Einsatz in der Routineanalytik nicht geeignet.

#### **4. Beurteilung der Einsatzmöglichkeiten von FTIR-Mikrospektroskopie in der Lebensmittelindustrie**

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sich FTIR-Mikrospektroskopie erfolgreich auf die Identifizierung von Mikroorganismen anwenden lässt. Ihre Leistungsfähigkeit ist, sowohl was den Identifizierungserfolg als auch die Diskriminierungsfähigkeit betrifft, der FTIR-Makrospektroskopie ebenbürtig (vgl. Kap. 2.1.1 des Ergebnisteils). Der erzielte Identifizierungserfolg für die Datenbank der Hefen ist höher als bei Verwendung kommerziell zu erwerbender Testkits (vgl. Tab. 7) und auch für coryneforme Bakterien und Milchsäurebakterien werden gute Ergebnisse erzielt.

Einschränkend auf die Anwendung der Technik wirkt sich jedoch die Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroorganismen aus, da für eine Messung Mikrokolonien ausreichender Größe vorliegen müssen. Ferner ergaben sich bei einigen Arten der Milchsäurebakterien Schwierigkeiten beim Transfer kleiner Kolonien von der Agarplatte auf den ZnSe-Probenträger, die jedoch größtenteils durch eine verlängerte Inkubationsdauer überwunden werden konnten. Die Generalisierbarkeit der Methode wird dadurch eingeschränkt und ein breiter Ausbau der Referenzdatenbanken unter Berücksichtigung möglichst vieler verschiedener Spezies erscheint nicht mehr zweckmäßig. Hinzu kommt, dass der Arbeitsaufwand für die Messung von Reinkulturen höher ist als mit FTIR-Makrospektroskopie, und auch unter diesem Gesichtspunkt eine Entwicklung von Datenbanken mit tausend oder mehr Spektren nicht sinnvoll ist. Durch den limitierten Probandendurchsatz aufgrund des höheren Arbeitsaufwands erscheint die universelle Identifizierung reiner Kulturen, wie es mit FTIR-Makrospektroskopie gemacht wird, nicht als optimale Anwendung von FTIR-Mikrospektroskopie. Ungeachtet dessen könnten pathogene Organismen, deren Identifizierung unter Zeitdruck erfolgen muss, eine Ausnahme bilden. Hier bedeutet eine Identifizierung mit FTIR-Mikrospektroskopie über einen Ansatz direkt aus der Selektivanreicherung einen Zeitvorteil von mehreren Tagen gegenüber Verfahren, die für eine Analyse mehr Biomasse benötigen.

Das größte Potential der FTIR-Mikrospektroskopie liegt jedoch ohne Zweifel in der Populationsanalyse, die das hauptsächliche Einsatzgebiet in der Zukunft sein sollte. Der hohe Automatisierungsgrad der Technik gestattet die Generierung großer Datenmengen in äußerst kurzer Zeit; so können pro Tag ca. 200-250 Spektren aufgenommen werden. Dies ermöglicht Populationsanalysen, für die mit herkömmlichen Methoden mehrere Wochen benötigt werden, innerhalb weniger Tage. Die große Datenbasis für die quantitative Erfassung von Populationszusammensetzungen garantiert zudem eine sehr hohe Sensitivität, die auch die Erfassung von Spezies ermöglicht, deren Anteil an der Population unter einem Prozent liegt. Dies ist mit manchen molekularbiologischen Techniken wie beispielsweise DGGE nicht möglich.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Populationsanalysen hat sich gezeigt, dass eine Optimierung der Bibliotheken auf die Lösung spezifischer Problemstellungen empfehlenswert ist. So wirkt sich eine Adaption der Datenbanken auf das zu untersuchende Konsortium, wie es bei der Analyse der Starterflora des Emmentaler Käses durchgeführt wurde, vorteilhaft auf den Identifizierungserfolg aus. Eine Adaption der Bibliotheken bietet sich im Besonderen an, wenn bis auf Stammebene differenziert werden soll, denn bei hoher Spezialisierung können Einschränkungen des Systems umgangen und das Potential der Methode voll ausgeschöpft werden.

Populationsanalysen mit FTIR-Mikrospektroskopie können in der Lebensmittelindustrie unterschiedliche Anwendung finden. Über den Einsatz adaptierter Datenbanken ist ein Monitoring von Reifungskonsortien oder Starterkulturen in regelmäßigem Turnus möglich und auch die Entwicklung von Kulturen während der Produktion kann verfolgt werden. Eine Analyse von Floren unbekannter Zusammensetzung ist ebenfalls möglich. So kann nach einem bestimmten Organismus in einer Probe gefahndet werden, indem dessen Spektrum als Referenz in die Datenbank integriert wird. Dies wird v.a. Kontaminationsroutenanalysen deutlich vereinfachen. Ein schneller Einblick in die Zusammensetzung einer Flora kann auch ohne Verwendung einer speziellen Datenbank gewonnen werden. Über eine Clusteranalyse werden die aufgenommenen Spektren zu Gruppen ähnlicher Keime sortiert, anhand derer eine Abschätzung der Komplexität der Flora vorgenommen werden kann.

## 5. Ausblick

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Referenzdatenbanken für Hefen, coryneforme Bakterien und Milchsäurebakterien umfassen nur die für den milchwirtschaftlichen Bereich wichtigsten Spezies und sollten im Hinblick auf eine Erhöhung der Zahl der Stämme pro Art sowie der Arten insgesamt erweitert werden. Dies wird die Reichweite der Methode erhöhen und den Identifizierungserfolg weiter steigern. In diesem Zusammenhang kann ebenfalls angedacht werden, die Zusammensetzung der Bibliotheken nicht nach taxonomischen Gesichtspunkten zu strukturieren, sondern ein mögliches Wachstum der Organismen auf dem jeweiligen Medium als Kriterium zu verwenden. Dies würde insbesondere Populationsanalysen erleichtern. Für Populationsanalysen technologisch wichtiger Konsortien, die über einen längeren Zeitraum überwacht und kontrolliert werden sollen, empfiehlt sich zudem die spezifische Adaption der Datenbanken an die jeweilige Flora über die Integration von Spektren der dort vorkommenden Stämme in die Datenbank. Zur Optimierung der Identifizierung kann hier auch eine Änderung der Inkubationsparameter in Erwägung gezogen werden und eine kleine aber hochspezifische Referenzbibliothek neu erstellt werden.

Der mit den in dieser Arbeit entwickelten Datenbanken erzielte Identifizierungserfolg sollte für eine Optimierung der Methode weiter verbessert werden. Dazu bietet sich neben einem Ausbau der Datenbanken mit weiteren Stämmen insbesondere eine veränderte Datenauswertung an. Hier liegt der Einsatz multivariater statistischer Verfahren wie kNNs nahe, die eine Verarbeitung der komplexen Datenstruktur mikrobieller FTIR-Spektren ohne Informationsverlust ermöglichen. Über die Anwendung von kNNs lassen sich hierarchisch strukturierte Klassifikationsbäume erstellen, mit denen sich die Parameterwahl für die Identifizierung optimal auf spezifische Probleme innerhalb der Datenbank anpassen lässt.

## V. Literaturverzeichnis

1. **Alves, A., O. Santos, I. Henriques und A. Correia.** 2002. Evaluation of methods for molecular typing and identification of members of the genus *Brevibacterium* and other related species. *FEMS Microbiol. Lett.* **213**:205-11.
2. **Amiel, C., L. Mariey, M. C. Curk-Daubie, P. Pichon und J. Travert.** 2000. Potentiality of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for discrimination and identification of dairy Lactic acid bacteria. *Lait* **80**:445-459.
3. **Andrighetto, C., E. Psomas, N. Tzanetakis, G. Suzzi und A. Lombardi.** 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**:5-9.
4. **Antonsson, M., G. Molin und Y. Ardo.** 2003. *Lactobacillus* strains isolated from Danbo cheese as adjunct cultures in a cheese model system. *Int. J. Food Microbiol.* **85**:159-69.
5. **Arias, C. R., J. K. Burns, L. M. Friedrich, R. M. Goodrich und M. E. Parish.** 2002. Yeast species associated with orange juice: evaluation of different identification methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1955-61.
6. **Augustyn, O. P. H., J. L. F. Kock und D. Ferreira.** 1992. Differentiation between yeast species and strains within a species by cellular fatty acid analysis, 5. A feasible technique? *Syst. Appl. Microbiol.* **15**:105-115.
7. **Barnett, J. A., R. W. Payne und D. Yarrow.** 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*, 3. ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
8. **Baruzzi, F., A. Matarante, M. Morea und P. S. Cocconcelli.** 2002. Microbial community dynamics during the Scamorza Altamura cheese natural fermentation. *J. Dairy Sci.* **85**:1390-7.
9. **Behrendt, U., A. Ulrich, P. Schumann, D. Naumann und K. Suzuki.** 2002. Diversity of grass-associated *Microbacteriaceae* isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward; polyphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:1441-54.
10. **Beresford, T. P., N. A. Fitzsimons, N. L. Brennan und T. M. Cogan.** 2001. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* **11**:259-74.
11. **Bernard, K., M. Bellefeuille, D. G. Hollis, M. I. Daneshvar und C. W. Moss.** 1994. Cellular fatty acid composition and phenotypic and cultural characterization of CDC fermentative coryneform groups 3 and 5. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1217-22.

12. **Blasco, L., S. Ferrer und I. Pardo.** 2003. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for in situ identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **225**:115-23.
13. **Bockelmann, W.** 1995. The proteolytic system of starter and non-starter bacteria: Components and their importance for cheese ripening. *Int. Dairy J.* **5**:977-94.
14. **Bockelmann, W.** 2002. Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses. *Int. Dairy J.* **12**:123-131.
15. **Bockelmann, W. und T. Hoppe-Seyler.** 2001. The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *Int. Dairy J.* **11**:307-314.
16. **Boekhout, T. und V. Robert (Hrsg.).** 2003. Yeasts in food. Beneficial and detrimental Aspects. Behr's, Hamburg.
17. **Brandao, P. F., J. P. Clapp und A. T. Bull.** 2002. Discrimination and taxonomy of geographically diverse strains of nitrile-metabolizing actinomycetes using chemometric and molecular sequencing techniques. *Environ. Microbiol.* **4**:262-76.
18. **Brennan, N. M., R. Brown, M. Goodfellow, A. C. Ward, T. P. Beresford, P. J. Simpson, P. F. Fox und T. M. Cogan.** 2001. *Corynebacterium mooreparkense* sp. nov. and *Corynebacterium casei* sp. nov., isolated from the surface of a smear-ripened cheese. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:843-52.
19. **Brennan, N. M., R. Brown, M. Goodfellow, A. C. Ward, T. P. Beresford, M. Vancanneyt, T. M. Cogan und P. F. Fox.** 2001. *Microbacterium gubbeenense* sp. nov., from the surface of a smear-ripened cheese. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1969-1976.
20. **Brennan, N. M., A. C. Ward, T. P. Beresford, P. F. Fox, M. Goodfellow und T. M. Cogan.** 2002. Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:820-30.
21. **Busse, H. J. und P. Schumann.** 1999. Polyamine profiles within genera of the class *Actinobacteria* with LL-diaminopimelic acid in the peptidoglycan. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:179-84.
22. **Carnio, M. C., I. Eppert und S. Scherer.** 1999. Analysis of the bacterial surface ripening flora of German and French smeared cheeses with respect to their anti-listerial potential. *Int. J. Food Microbiol.* **47**:89-97.
23. **Cato, E. P., W. E. C. Moore und J. L. Johnson.** 1983. Synonymy of strains of "*Lactobacillus acidophilus*" group A2 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus crispatus* (Brygoo and Aladame 1953) Moore and Holdeman 1970. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**:426-8.
24. **Choisy, C., M. Desmazeaud, J. C. Gripon, G. Lamberet, J. Lenoir und C. Tourneur.** 1987. Microbiological and biochemical aspects of ripening, *In* A. Eck (Hrsg.), *Cheesemaking*. Lavoisier, New York. S. 62-100.

25. **Choo-Smith, L. P., K. Maquelin, T. van Vreeswijk, H. A. Bruining, G. J. Puppels, N. A. Ngo Thi, C. Kirschner, D. Naumann, D. Ami, A. M. Villa, F. Orsini, S. M. Doglia, H. Lamfarraj, G. D. Sockalingum, M. Manfait, P. Allouch und H. P. Endtz.** 2001. Investigating microbial (micro)colony heterogeneity by vibrational spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1461-9.
26. **Christy, A. A., Y. Ozaki und V. G. Gregoriou.** 2001. *Modern Fourier Transform Infrared Spectroscopy.* Elsevier Science, Amsterdam.
27. **Cocolin, L., L. F. Bisson und D. A. Mills.** 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**:81-7.
28. **Collins, M. D., B. A. Phillips und P. Zannoni.** 1989. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:105-8.
29. **Corredor, M., A. M. Davila, C. Gaillardin und S. Casaregola.** 2000. DNA probes specific for the yeast species *Debaryomyces hansenii*: useful tools for rapid identification. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**:171-7.
30. **Corsetti, A., M. De Angelis, F. Dellaglio, A. Paparella, P. F. Fox, L. Settanni und M. Gobbetti.** 2003. Characterization of sourdough lactic acid bacteria based on genotypic and cell-wall protein analyses. *J. Appl. Microbiol.* **94**:641-54.
31. **Corsetti, A., J. Rossi und M. Gobbetti.** 2001. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **69**:1-10.
32. **Coyle, M. B. und B. A. Lipsky.** 1990. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**:227-46.
33. **Crow, V. L., T. Coolbear, P. K. Gopal, F. G. Martley, L. L. McKay und H. Riepe.** 1995. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *Int. Dairy J.* **5**:855-75.
34. **Curk, M. C., F. Peladan und J. C. Hubert.** 1994. Fourier Transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**:241-248.
35. **Davey, H. M.** 2002. Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. *Methods Cell Sci.* **24**:91-7.
36. **De Briel, D., F. Couderc, P. Riegel, F. Jehl und R. Minck.** 1992. High-performance liquid chromatography of corynomycolic acids as a tool in identification of *Corynebacterium* species and related organisms. *J. Clin. Microbiol.* **30**:1407-17.
37. **de Urraza, P. J., A. Gomez-Zavaglia, M. E. Lozano, V. Romanowski und G. L. de Antoni.** 2000. DNA fingerprinting of thermophilic lactic acid bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *J. Dairy Res.* **67**:381-92.
38. **Deak, T. und L. R. Beuchat.** 1987. Identification of Foodborne Yeasts. *J. Food Protect.* **50**:243-264.

39. **Deak, T. und L. R. Beuchat.** 1995. Evaluation of the MicroScan enzyme-based system for the identification of foodborne yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* **79**:439-46.
40. **Dellaglio, F., G. E. Felis und S. Torriani.** 2002. The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. Request for an opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:285-7.
41. **Delley, M. und J. E. Germond.** 2002. Differentiation of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, subsp. *lactis* and subsp. *delbrueckii* using physiological and genetic tools and reclassification of some strains from the ATCC collection. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**:228-31.
42. **Devriese, L. A., M. D. Collins und R. Wirth.** 1992. The genus *Enterococcus*, *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (Hrsg.), *The Prokaryotes*, Second ed, vol. 2. Springer, New York. S. 1465-81.
43. **Dicks, L. M., E. M. Du Plessis, F. Dellaglio und E. Lauer.** 1996. Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zae* nom. rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:337-40.
44. **Dlauchy, D., J. Tornai Lehoczki und G. Peter.** 1999. Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**:445-453.
45. **El Menyawi, I., M. Woegerbauer, H. Sigmund, H. Burgmann und W. Graninger.** 2000. Identification of yeast species by fatty acid profiling as measured by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **742**:13-24.
46. **Eliskases-Lechner, F. und W. Ginzinger.** 1995. The bacterial flora of surface-ripened cheeses with special regard to coryneforms. *Lait* **75**:571-583.
47. **Ercolini, D., P. J. Hill und C. E. Dodd.** 2003. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3540-8.
48. **Esteve-Zarzoso, B., C. Belloch, F. Uruburu und 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.
49. **Fabian, H., P. Lasch, M. Boese und W. Haensch.** 2002. Mid-IR microspectroscopic imaging of breast tumor tissue sections. *Biopolymers* **67**:354-7.
50. **Felske, A., M. Vancanneyt, K. Kersters und A. D. Akkermans.** 1999. Application of temperature-gradient gel electrophoresis in taxonomy of coryneform bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:113-21.
51. **Fleet, G. H.** 2003. Yeasts in fruit and fruit products, *In* V. Robert (Hrsg.), *Yeasts in food. Beneficial and detrimental Aspects*. Behr's, Hamburg. S. 267-87.
52. **Franz, C. M., M. E. Stiles, K. H. Schleifer und W. H. Holzapfel.** 2003. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* **88**:105-22.



53. **Freydiere, A. M., R. Guinet und P. Boiron.** 2001. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med. Mycol.* **39**:9-33.
54. **Funke, G., K. Peters und M. Aravena-Roman.** 1998. Evaluation of the RapID CB plus system for identification of coryneform bacteria and *Listeria* spp. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2439-42.
55. **Funke, G., F. N. Renaud, J. Freney und P. Riegel.** 1997. Multicenter evaluation of the updated and extended API (RAPID) Coryne database 2.0. *J. Clin. Microbiol.* **35**:3122-6.
56. **Funke, G., A. von Graevenitz, J. E. Clarridge, 3rd und K. A. Bernard.** 1997. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:125-59.
57. **Gevers, D., G. Huys und J. Swings.** 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**:31-6.
58. **Giraffa, G. und E. Neviani.** 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* **67**:19-34.
59. **Griffiths, P. R. und J. A. d. Haseth.** 1986. Fourier transform infrared spectrometry. Wiley, New York.
60. **Gunasekera, T. S., M. R. Dorsch, M. B. Slade und D. A. Veal.** 2003. Specific detection of *Pseudomonas* spp. in milk by fluorescence *in situ* hybridization using ribosomal RNA directed probes. *J. Appl. Microbiol.* **94**:936-45.
61. **Günzler, H. und H. M. Heise.** 1996. IR-Spektroskopie. Eine Einführung. VCH, Weinheim.
62. **Haag, H., H. U. Gremlich, R. Bergmann und J. J. Sanglier.** 1996. Characterization and identification of actinomycetes by FT-IR spectroscopy. *J. Microbiol. Methods* **27**:157-163.
63. **Hall, L., S. Wohlfiel und G. D. Roberts.** 2003. Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of commonly encountered, clinically important yeast species. *J. Clin. Microbiol.* **41**:5099-102.
64. **Hammes, W. P. und R. F. Vogel.** 1995. The genus *Lactobacillus*, In B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (Hrsg.), *The genera of lactic acid bacteria*, vol. 2. Blackie Academic & Professional, Glasgow. S. 19-54.
65. **Helm, D., H. Labischinski, G. Schallehn und D. Naumann.** 1991. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J. Gen. Microbiol.* **137**:69-79.
66. **Hernan-Gomez, S., J. C. Espinosa und J. F. Ubeda.** 2000. Characterization of wine yeasts by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *FEMS Microbiol. Lett.* **193**:45-50.

67. **Holzappel, W. H. und U. Schillinger.** 1992. The genus *Leuconostoc*, In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (Hrsg.), *The Prokaryotes*, Second ed, vol. 2. Springer, New York. S. 1508-34.
68. **Hoppe-Seyler, T. S., B. Jaeger, W. Bockelmann, W. H. Noordman, A. Geis und K. J. Heller.** 2003. Identification and differentiation of species and strains of *Arthrobacter* and *Microbacterium barkeri* isolated from smear cheeses with Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) and pulsed field gel electrophoresis (PFGE). *Syst. Appl. Microbiol.* **26**:438-44.
69. **Hou, X. G., Y. Kawamura, F. Sultana, K. Hirose, M. Miyake, Y. Otsuka, S. Misawa, T. Oguri, H. Yamamoto und T. Ezaki.** 1997. Genetic identification of members of the genus *Corynebacterium* at genus and species levels with 16S rDNA-targeted probes. *Microbiol. Immunol.* **41**:453-60.
70. **Huijsdens, X. W., R. K. Linskens, M. Mak, S. G. Meuwissen, C. M. Vandembroucke-Grauls und P. H. Savelkoul.** 2002. Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4423-7.
71. **Husson-Kao, C., J. Mengaud, J.-C. Gripon, L. Benbadis und M.-P. Chartier.** 2000. Characterization of *Streptococcus thermophilus* strains that undergo lysis under unfavourable environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **55**:209-13.
72. **Jakobsen, M. und J. Narvhus.** 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy J.* **6**:755-68.
73. **Jang, J., B. Kim, J. Lee und H. Han.** 2003. A rapid method for identification of typical *Leuconostoc* species by 16S rDNA PCR-RFLP analysis. *J. Microbiol. Methods* **55**:295-302.
74. **Johnson, J. L., C. F. Phelps, C. S. Cummins, J. London und F. Gasser.** 1980. Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**:53-68.
75. **Jordan, K. N. und T. M. Cogan.** 1999. Heat resistance of *Lactobacillus* spp. isolated from Cheddar cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**:136-40.
76. **Kammerlehner, J.** 1988. *Labkäse-Technologie*, Band II. Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer.
77. **Kandler, O. und N. Weiss.** 1986. Genus *Lactobacillus*, In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (Hrsg.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore MD. S. 1209-34.
78. **Kirschner, C., K. Maquelin, P. Pina, N. A. Ngo Thi, L. P. Choo-Smith, G. D. Sockalingum, C. Sandt, D. Ami, F. Orsini, S. M. Doglia, P. Allouch, M. Mainfait, G. J. Puppels und D. Naumann.** 2001. Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1763-70.

79. **Kneipp, J., P. Lasch, E. Baldauf, M. Beekes und D. Naumann.** 2000. Detection of pathological molecular alterations in scrapie-infected hamster brain by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1501**:189-99.
80. **Kollöffel, B., L. Meile und M. Teuber.** 1999. Analysis of brevibacteria on the surface of Gruyère cheese detected by *in situ* hybridization and by colony hybridization. *Let. Appl. Microbiol.* **29**:317-22.
81. **Kosse, D., H. Seiler, R. Amann, W. Ludwig und S. Scherer.** 1997. Identification of yoghurt-spoiling yeasts with 18S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**:468-480.
82. **Kreger-van Rij, N. J. W. (Hrsg.).** 1984. The yeasts - a taxonomic study, Third ed. Elsevier, Amsterdam.
83. **Kümmerle, M., S. Scherer und H. Seiler.** 1998. Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2207-14.
84. **Kurtzman, C. P.** 1994. Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast* **10**:1727-40.
85. **Kurtzman, C. P.** 2003. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygotorulasporea*. *FEMS Yeast Res.* **4**:233-45.
86. **Kurtzman, C. P. und C. J. Robnett.** 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**:331-71.
87. **Kurtzman, C. P. und C. J. Robnett.** 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the '*Saccharomyces* complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res.* **3**:417-32.
88. **Las Heras-Vazquez, F. J., L. Mingorance-Cazorla, J. M. Clemente-Jimenez und F. Rodriguez-Vico.** 2003. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast. Res.* **3**:3-9.
89. **Lasch, P. und D. Naumann.** 1998. FT-IR microspectroscopic imaging of human carcinoma thin sections based on pattern recognition techniques. *Cell. Mol. Biol.* **44**:189-202.
90. **Lazzi, C., L. Rossetti, M. Zago, E. Neviani und G. Giraffa.** 2004. Evaluation of bacterial communities belonging to natural whey starters for Grana Padano cheese by length heterogeneity-PCR. *J. Appl. Microbiol.* **96**:481-90.
91. **Lücke, F. K.** 1996. Lactic acid bacteria involved in food fermentations and their present and future uses in food industry, *In* B. Ray (Hrsg.), *Lactic acid bacteria: Current advances in metabolism, genetics and applications*. Springer, Berlin. S. 81-99.

92. **Mackay, I. M.** 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**:190-212.
93. **Maoz, A., R. Mayr und S. Scherer.** 2003. Temporal stability and biodiversity of two complex antilisterial cheese-ripening microbial consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4012-8.
94. **Maquelin, K., L. P. Choo-Smith, H. P. Endtz, H. A. Bruining und G. J. Puppels.** 2002. Rapid identification of *Candida* species by confocal Raman microspectroscopy. *J. Clin. Microbiol.* **40**:594-600.
95. **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 und 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**:324-9.
96. **Marcellino, N., E. Beuvier, R. Grappin, M. Gueguen und D. R. Benson.** 2001. Diversity of *Geotrichum candidum* strains isolated from traditional cheesemaking fabrications in France. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4752-9.
97. **McCartney, A. L.** 2002. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *Br. J. Nutr.* **88 Suppl 1**:29-37.
98. **Meroth, C. B., W. P. Hammes und C. Hertel.** 2003. Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:7453-61.
99. **Meroth, C. B., J. Walter, C. Hertel, M. J. Brandt und W. P. Hammes.** 2003. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:475-82.
100. **Moghaddas, J., A. L. Truant, C. Jordan und H. R. Buckley.** 1999. Evaluation of the RapID Yeast Plus System for the identification of yeast. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **35**:271-3.
101. **Mori, K., K. Yamazaki, T. Ishiyama, M. Katsumata, K. Kobayashi, Y. Kawai, N. Inoue und H. Shinano.** 1997. Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:54-7.
102. **Naumann, D.** 2001. FT-Infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research, *In* H. U. Gremlich and B. Yan (Hrsg.), *Infrared and Raman spectroscopy of biological materials*. Marcel Dekker, New York. S. 323-77.
103. **Naumann, D., D. Helm und H. Labischinski.** 1991. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* **351**:81-2.
104. **Naumann, D., D. Helm, H. Labischinski und P. Giesbrecht.** 1991. The Characterization of Microorganisms by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), *In* W. H. Nelson (Hrsg.), *Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis*. VCH, New York. S. 43-96.

105. **Ngo Thi, N. A., C. Kirschner und D. Naumann.** 2000. FT-IR microspectrometry: A new tool for characterizing micro-organisms, *In* A. Mahadevan-Jansen and G. J. Puppels (Hrsg.), *Biomedical spectroscopy: Vibrational spectroscopy and other novel techniques*, Proceedings of SPIE, vol. 3918. Bellingham, Washington. S. 36-44.
106. **Nogva, H. K., K. Rudi, K. Naterstad, A. Holck und D. Lillehaug.** 2000. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4266-71.
107. **Oberreuter, H., A. Brodbeck, S. von Stetten, S. Goerges und S. Scherer.** 2003. Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy is a promising tool for monitoring the population dynamics of microorganisms in food stuff. *Eur. Food Res. Technol.* **216**:434-439.
108. **Oberreuter, H., H. Seiler und 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.
109. **Ogier, J. C., O. Son, A. Gruss, P. Tailliez und A. Delacroix-Buchet.** 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3691-701.
110. **Oliveira, K., G. Haase, C. Kurtzman, J. J. Hyldig-Nielsen und H. Stender.** 2001. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by fluorescent *in situ* hybridization with peptide nucleic acid probes. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4138-41.
111. **Orsini, F., D. Ami, A. M. Villa, G. Sala, M. G. Bellotti und S. M. Doglia.** 2000. FT-IR microspectrometry for microbiological studies. *J. Microbiol. Methods* **42**:17-27.
112. **Place, R. B., D. Hiestand, H. R. Gallmann und M. Teuber.** 2003. *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**:30-7.
113. **Ramani, R., S. Gromadzki, D. H. Pincus, I. F. Salkin und V. Chaturvedi.** 1998. Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3396-8.
114. **Reps, A.** 1987. Bacterial surface-ripened cheeses, *In* P. F. Fox (Hrsg.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, vol. 2: Major cheese groups. Elsevier Applied Science, London. S. 151-184.
115. **Riddle, J. W., P. W. Kabler, B. A. Kenner, R. H. Bordner, S. W. Rockwood und H. J. Stevenson.** 1956. Bacterial identification by infrared spectrophotometry. *J. Bacteriol.* **72**:593-603.
116. **Rodas, A. M., S. Ferrer und I. Pardo.** 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**:412-22.

117. **Rogosa, M., C. S. Cummins, R. A. Lelliott und R. M. Keddie.** 1974. Actinomycetes and related organisms, *In* R. E. Buchanan, N. E. Gibbons, S. T. Cowan, J. G. Holt, J. Liston, A. W. Ravin, and R. J. Stanier (Hrsg.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8. ed. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, Maryland. S. 599-881.
118. **Rohm, H., F. Lechner und M. Lehner.** 1990. Evaluation of the API ATB 32C system for the rapid identification of foodborne yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **11**:215-23.
119. **Rudolf, M. und S. Scherer.** 2001. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **63**:91-8.
120. **Salminen, S. und A. v. Wright (Hrsg.).** 1998. Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects, Second ed. Marcel Dekker, New York.
121. **Sandt, C., G. D. Sockalingum, D. Aubert, H. Lepan, C. Lepouse, M. Jaussaud, A. Leon, J. M. Pinon, M. Manfait und D. Toubas.** 2003. Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units. *J. Clin. Microbiol.* **41**:954-9.
122. **Sanglier, J. J., D. Whitehead, G. S. Saddler, E. V. Ferguson und M. Goodfellow.** 1992. Pyrolysis mass spectrometry as a method for the classification, identification and selection of actinomycetes. *Gene* **115**:235-42.
123. **Sasaki, J., M. Chijimatsu und K. Suzuki.** 1998. Taxonomic significance of 2,4-diaminobutyric acid isomers in the cell wall peptidoglycan of actinomycetes and reclassification of *Clavibacter toxicus* as *Rathayibacter toxicus* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:403-10.
124. **Scarpellini, M., D. Mora, S. Colombo und L. Franzetti.** 2002. Development of genus/species-specific PCR analysis for identification of *Carnobacterium* strains. *Curr. Microbiol.* **45**:24-9.
125. **Schleifer, K. H. und W. Ludwig.** 1995. Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria, *In* B. J. B. Wood and W. H. Holzapel (Hrsg.), *The genera of lactic acid bacteria*, vol. 2. Blackie Academic & Professional, Glasgow. S. 7-18.
126. **Schleifer, K. H. und W. Ludwig.** 1995. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**:461-7.
127. **Schmalreck, A. F., P. Trankle, E. Vanca und R. Blaschke-Hellmessen.** 1998. Differenzierung und Charakterisierung von humanpathogenen Hefen (*Candida albicans*, *Exophiala dermatitidis*) und tierpathogenen Algen (*Prototheca* spp.) mittels Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) im Vergleich zu konventionellen Methoden. *Mycoses* **41 Suppl 1**:71-7.
128. **Schmitt, J. und T. Udelhoven.** 2001. Use of artificial neural networks in biomedical diagnosis, *In* H. U. Gremlich and B. Yan (Hrsg.), *Infrared and Raman spectroscopy of biological materials*. Marcel Dekker, New York. S. 379-419.

129. **Schubert, K., W. Ludwig, N. Springer, R. M. Kroppenstedt, J. P. Accolas und F. Fiedler.** 1996. Two coryneform bacteria isolated from the surface of French Gruyere and Beaufort cheeses are new species of the genus *Brachybacterium*: *Brachybacterium alimentarium* sp. nov. and *Brachybacterium tyrofermentans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:81-7.
130. **Seiler, H.** 2002. Yeasts in milk and dairy products, *In* P. F. Fox (Hrsg.), *Encyclopedia of dairy sciences*. Academic Press, Amsterdam. S. 2761-9.
131. **Selvarangan, R., U. Bui, A. P. Limaye und B. T. Cookson.** 2003. Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* **41**:5660-4.
132. **St.-Germain, G. und D. Beauchesne.** 1991. Evaluation of the MicroScan Rapid Yeast Identification panel. *J. Clin. Microbiol.* **29**:2296-9.
133. **Stackebrandt, E., F. A. Rainey und N. L. Ward-Rainey.** 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:479-491.
134. **Stiles, M. E. und W. H. Holzapfel.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36**:1-29.
135. **Tang, Y. W., A. von Graevenitz, M. G. Waddington, M. K. Hopkins, D. H. Smith, H. Li, C. P. Kolbert, S. O. Montgomery und D. H. Persing.** 2000. Identification of coryneform bacterial isolates by ribosomal DNA sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1676-8.
136. **Teuber, M., A. Geis und H. Neve.** 1992. The genus *Lactococcus*, *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (Hrsg.), *The Prokaryotes*, Second ed, vol. 2. Springer, New York. S. 1482-1501.
137. **Thomas, L. C. und J. E. S. Greenstreet.** 1954. The identification of microorganisms by infrared spectrophotometry. *Spectrochim. Acta* **6**:302-19.
138. **Timmings, E. M., S. A. Howell, B. K. Alsberg, W. C. Noble und R. Goodacre.** 1998. Rapid differentiation of closely related *Candida* species and strains by pyrolysis-mass spectrometry and Fourier transform-infrared spectroscopy. *J. Clin. Microbiol.* **36**:367-74.
139. **Timmings, E. M., D. E. Quain und R. Goodacre.** 1998. Differentiation of brewing yeast strains by pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. *Yeast* **14**:885-93.
140. **Tintelnot, K., G. Haase, M. Seibold, F. Bergmann, M. Staemmler, T. Franz und D. Naumann.** 2000. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1599-608.
141. **Török, T. und A. D. King, Jr.** 1991. Comparative study on the identification of food-borne yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1207-12.

142. **Tynkkynen, S., R. Satokari, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm und M. Saxelin.** 1999. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3908-14.
143. **Valdes-Stauber, N., S. Scherer und H. Seiler.** 1997. Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **34**:115-29.
144. **Valente, P., J. P. Ramos und O. Leoncini.** 1999. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. *Can. J. Microbiol.* **45**:949-58.
145. **Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters und J. Swings.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**:407-38.
146. **Vaneechoutte, M., P. Riegel, D. de Briel, H. Monteil, G. Verschraegen, A. De Rouck und G. Claeys.** 1995. Evaluation of the applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*. *Res. Microbiol.* **146**:633-41.
147. **Vasdinyei, R. und T. Deak.** 2003. Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *Int. J. Food Microbiol.* **86**:123-30.
148. **Vasquez, A., S. Ahrne, B. Pettersson und G. Molin.** 2001. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for identification of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus zeae* and *Lactobacillus rhamnosus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**:215-9.
149. **Wadlin, J. K., G. Hanko, R. Stewart, J. Pape und I. Nachamkin.** 1999. Comparison of three commercial systems for identification of yeasts commonly isolated in the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1967-70.
150. **Weiss, W. und G. Burgbacher.** 1986. 100 Jahre Kefir in Deutschland - nach wie vor ein Problem. Untersuchung von "Kefir" aus Molkereien und Handel sowie dessen Problematik. *Dt. Milchwirtschaft* **37**:81-4, 89-90.
151. **Wetzel, D. L. und S. M. LeVine.** 2001. Biological applications of infrared microspectroscopy, *In* H. U. Gremlich and B. Yan (Hrsg.), *Infrared and Raman spectroscopy of biological materials*. Marcel Dekker, New York. S. 101-42.
152. **Zhou, J.** 2003. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:288-94.



## Anhang

**Anhang 1: Für den Aufbau der Referenzdatenbank für Hefen verwendete Stämme**

Spezies	Stamm <sup>a</sup>	Herkunft
<i>Candida glabrata</i>	DSMZ 6425	k. A.
<i>Candida intermedia</i>	DSMZ 70753	Pilsener beer
<i>Candida intermedia</i>	CBS 572	Faeces
<i>Candida intermedia</i>	CBS 5310	Grape
<i>Candida intermedia</i>	G 1529	k. A.
<i>Candida intermedia</i>	G 1914	k. A.
<i>Candida intermedia</i>	M 244	k. A.
<i>Candida maltosa</i>	CBS 5611 T	Neutralizing tank for monosodium glutamate
<i>Candida parapsilosis</i>	DSMZ 5784 T	Sprue
<i>Candida parapsilosis</i>	DSMZ 70125	Sausage
<i>Candida parapsilosis</i>	CBS 1954	Olives
<i>Candida parapsilosis</i>	G 1523	k. A.
<i>Candida parapsilosis</i>	M 213	k. A.
<i>Candida tropicalis</i>	DSMZ 1346	k. A.
<i>Candida tropicalis</i>	CBS 94 T	Bronchitic patient
<i>Candida tropicalis</i>	CBS 2310	k. A.
<i>Candida tropicalis</i>	CBS 643	Kefyr
<i>Candida tropicalis</i>	G 1928	k. A.
<i>Clavispora lusitaniae</i>	CBS 1944	Sputum
<i>Clavispora lusitaniae</i>	CBS 5299	Milk of mastitic cow
<i>Clavispora lusitaniae</i>	CBS 6936 T	Citrus essence
<i>Clavispora lusitaniae</i>	G 1568	k. A.
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CBS 941	Rancid butter
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CBS 767 T	Carlsberg laboratory
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CBS 1099	Cheese
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CBS 6960	Organ of cow
<i>Debaryomyces hansenii</i>	DSMZ 70238	Sausage
<i>Debaryomyces hansenii</i>	DSMZ 70244	Beer
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CBS 789	Interdigital mycotic lesion
<i>Debaryomyces hansenii</i>	WSYC 482	Dairy
<i>Debaryomyces hansenii</i>	WSYC 483	Dairy

<i>Debaryomyces hansenii</i>	WSYC 484	Dairy
<i>Debaryomyces hansenii</i>	WSYC 485	Dairy
<i>Debaryomyces hansenii</i>	WSYC 486	Dairy
<i>Debaryomyces hansenii</i>	WSYC 487	Dairy
<i>Debaryomyces hansenii</i>	WSYC 488	Dairy
<i>Debaryomyces hansenii</i>	WSYC 489	Dairy
<i>Debaryomyces hansenii</i>	WSYC 490	Dairy
<i>Debaryomyces hansenii</i>	WSYC 491	Dairy
<i>Debaryomyces hansenii</i>	WSYC 492	Dairy
<i>Debaryomyces hansenii</i>	WSYC 493	Dairy
<i>Debaryomyces hansenii</i>	WSYC 494	Dairy
<i>Debaryomyces hansenii</i>	WSYC 495	Dairy
<i>Debaryomyces hansenii</i>	G 1626	k. A.
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CBS 312	Fermenting cacao
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CBS 314 T	Grapes
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CBS 5074	Apple must
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	G 2173	k. A.
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	M 143	k. A.
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	G 1503	k. A.
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	CBS 397	Yoghurt
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	CBS 6432	k. A.
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	G 1346	k. A.
<i>Pichia anomala</i>	CBS 5759 T	k. A.
<i>Pichia anomala</i>	DSMZ 70130	Brewery
<i>Pichia anomala</i>	CBS 249	Berries
<i>Pichia anomala</i>	G 1438	k. A.
<i>Pichia anomala</i>	G 1690	k. A.
<i>Pichia anomala</i>	G 2111	k. A.
<i>Pichia guilliermondii</i>	DSMZ 6381	Sputum
<i>Pichia guilliermondii</i>	DSMZ 70052	Butter
<i>Pichia guilliermondii</i>	CBS 2030 T	Insect frass
<i>Pichia guilliermondii</i>	CBS 7921	Water of pond
<i>Pichia membranaefaciens</i>	CBS 1328	Kummis
<i>Pichia membranaefaciens</i>	DSMZ 70631	Brewery
<i>Pichia membranaefaciens</i>	CBS 107 T	Elm exudate
<i>Pichia membranaefaciens</i>	G 2266	k. A.

<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CBS 2395	Butter starter
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CBS 316 T	k. A.
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CBS 2772	Yeast infusion
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	M 215	k. A.
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	M 315	k. A.
<i>Saccharomyces bayanus</i>	CBS 380 T	Turbid beer
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DSMZ 1333	Distillery yeast
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DSMZ 70470	k. A.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DSMZ 70471	k. A.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DSMZ 70478	Palm wine
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DSMZ 70509	k. A.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DSMZ 70514	Grape must
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	WSYC 220	k. A.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763	Distillery yeast
<i>Saccharomyces exiguus</i>	CBS 6388	Strawberry
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	CBS 1146 T	k. A.
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	CBS 6795	Juice
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	DSMZ 70497	March pane
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	DSMZ 70526	k. A.
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	G 1835	k. A.

<sup>a</sup> ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA; CBS, Cenraalbureau voor Schimmelcultures, Delft, The Netherlands; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany; WSYC, Weihenstephan Yeast Collection, Abteilung Mikrobiologie, ZIEL Weihenstephan, Freising, Germany; G, M, Abteilung Mikrobiologie, ZIEL Weihenstephan, Freising, Germany; T, Type strain; k. A., keine Angabe

#### Anhang 2: Für den Aufbau der Referenzdatenbank für coryneforme Bakterien verwendete Stämme

Spezies	Stamm <sup>a</sup>	Herkunft
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	ATCC 31021	k. A.
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	DSMZ 20122	Cheese
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	DSMZ 20123 T	k. A.
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	WS 2232	Cheese
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	WS 3708	Cheese
<i>Arthrobacter protophormiae</i>	ATCC 15993	Soil

<i>Arthrobacter protophormiae</i>	DSMZ 20168 T	k. A.
<i>Arthrobacter protophormiae</i>	WS 1456	k. A.
<i>Arthrobacter protophormiae</i>	WS 2004	Dairy wastewater
<i>Brevibacterium linens</i>	ATCC 8377	k. A.
<i>Brevibacterium linens</i>	ATCC 9174	Cheese
<i>Brevibacterium linens</i>	WS 1968	k. A.
<i>Brevibacterium linens</i>	WS 2909	Starter organism
<i>Brevibacterium linens</i>	WS 3669	Cheese
<i>Brevibacterium linens</i>	WS 3721	Cheese
<i>Brevibacterium linens</i>	WS 3723	Cheese
<i>Brachybacterium alimentarium</i>	CNRZ 925 T	Cheese
<i>Brachybacterium alimentarium</i>	WS 3462	Cheese
<i>Brachybacterium alimentarium</i>	WS 3686	Cheese
<i>Brachybacterium alimentarium</i>	WS 3687	Cheese
<i>Brachybacterium conglomeratum</i>	DSMZ 10241 T	Oil brine
<i>Brachybacterium conglomeratum</i>	DSMZ 20582	Milk
<i>Brachybacterium conglomeratum</i>	WS 2246	k. A.
<i>Brachybacterium tyrofermentans</i>	CNRZ 926 T	Cheese
<i>Brachybacterium tyrofermentans</i>	WS 3465	Cheese
<i>Brachybacterium tyrofermentans</i>	WS 3725	Cheese
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	ATCC 10538	k. A.
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	ATCC 21084	k. A.
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	ATCC 21280	Quail egg
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	DSMZ 20306 T	Faeces of infant
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	WS 3464	Cheese
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	WS 3502	Cheese
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	WS 3555	Cheese
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	WS 3619	Cheese
<i>Corynebacterium casei</i>	WS 3681	Cheese
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC 21492	Mutant derived from ATCC 13032
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	DSMZ 20156	Sewage
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	DSMZ 20300 T	Sewage
<i>Corynebacterium variabile</i>	DSMZ 20132 T	Food
<i>Corynebacterium variabile</i>	WS 2066	k. A.
<i>Corynebacterium variabile</i>	WS 3497	Cheese

<i>Corynebacterium variabile</i>	WS 3560	Cheese
<i>Corynebacterium variabile</i>	WS 3670	Cheese
<i>Corynebacterium variabile</i>	WS 3675	Cheese
<i>Corynebacterium variabile</i>	WS 3683	Cheese
<i>Kocuria rhizophila</i>	ATCC 15936	Food
<i>Kocuria rhizophila</i>	DSMZ 43241	k. A.
<i>Kocuria rhizophila</i>	WS 3519	k. A.
<i>Kocuria varians</i>	ATCC 399	Water
<i>Kocuria varians</i>	ATCC 15306 T	Milk
<i>Kocuria varians</i>	WS 2192	Cheese
<i>Microbacterium gubbeenense</i>	DPC 5286 T	Cheese
<i>Microbacterium gubbeenense</i>	WS 2219	Cheese
<i>Microbacterium gubbeenense</i>	WS 2223	Cheese
<i>Microbacterium gubbeenense</i>	WS 3720	Cheese
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 400	Water
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 11880	Freshwater lake
<i>Micrococcus luteus</i>	DSMZ 20030 T	k. A.
<i>Rathayibacter tritici</i>	ATCC 11402	Wheat, India
<i>Rathayibacter tritici</i>	WS 2242	k. A.
<i>Staphylococcus equorum</i>	WS 3740	Cheese
<i>Staphylococcus equorum</i>	WS 3744	Cheese
<i>Staphylococcus equorum</i>	WS 3752	Cheese
<i>Staphylococcus xylosus</i>	ATCC 15935	Food
<i>Staphylococcus xylosus</i>	WS 3741	Cheese

<sup>a</sup> ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA; CNRZ, Centre Nationale de Recherches Zootechniques, Jouy-en-Josas, France; DPC, Dairy Products Research Centre, Teagasc, Moorepark, Ireland; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany; WS, Weihenstephan Culture Collection, Abteilung Mikrobiologie, ZIEL Weihenstephan, Freising, Germany; T, Type strain; k. A., keine Angabe

**Anhang 3: Für den Aufbau der Referenzdatenbank für Milchsäurebakterien verwendete Stämme**

<b>Spezies</b>	<b>Stamm<sup>a</sup></b>	<b>Herkunft</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 6055	Pasteurized milk
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSMZ 20478 T	k. A.
<i>Enterococcus faecalis</i>	WS 2528	k. A.
<i>Enterococcus faecalis</i>	G 58	k. A.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSMZ 20079 T	k. A.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSMZ 9126	k. A.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	WS 2535	k. A.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	G 422	Starter organism
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	G 1819	Starter organism
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSMZ 20054 T	Faeces
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSMZ 20556	Green olives
<i>Lactobacillus casei</i>	DSMZ 20011 T	Cheese
<i>Lactobacillus casei</i>	G 465	Dairy
<i>Lactobacillus casei</i>	G 466	Dairy
<i>Lactobacillus casei</i>	G 832	k. A.
<i>Lactobacillus casei</i>	G 1802	Starter organism
<i>Lactobacillus crispatus</i>	DSMZ 20584 T	Eye
<i>Lactobacillus crispatus</i>	DSMZ 20356	Faeces
<i>Lactobacillus crispatus</i>	WS 2293	k. A.
<i>Lactobacillus crispatus</i>	G 1823	k. A.
<i>Lactobacillus curvatus</i>	DSMZ 20019 T	Milk
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	DSMZ 20081 T	Yoghurt
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	G 1759	k. A.
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	G 1760	Starter organism
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	G 1765	Starter organism
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. delbrueckii</i>	DSMZ 20074 T	Sour grain mash
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. delbrueckii</i>	G 776	Cheese
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis</i>	DSMZ 20072 T	Emmental cheese
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis</i>	DSMZ 20076	k. A.
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis</i>	G 1761	Starter organism
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis</i>	G 1762	Starter organism
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis</i>	G 1764	Starter organism
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	G 1757	Starter organism
<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSMZ 20052 T	Fermented beets

<i>Lactobacillus fermentum</i>	G 828	k. A.
<i>Lactobacillus helveticus</i>	DSMZ 20075 T	Emmental cheese
<i>Lactobacillus helveticus</i>	G 1756	Starter organism
<i>Lactobacillus helveticus</i>	G 1780	Starter organism
<i>Lactobacillus helveticus</i>	G 1781	Starter organism
<i>Lactobacillus helveticus</i>	G 1822	Starter organism
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	DSMZ 10533 T	Human blood
<i>Lactobacillus paracasei</i>	DSMZ 5622 T	k. A.
<i>Lactobacillus paracasei</i>	G 393	Cheese
<i>Lactobacillus paracasei</i>	G 1190	k. A.
<i>Lactobacillus paracasei</i>	G 1196	k. A.
<i>Lactobacillus paracasei</i>	G 1514	Dairy
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSMZ 20174 T	Pickled cabbage
<i>Lactobacillus plantarum</i>	WS 2534	k. A.
<i>Lactobacillus plantarum</i>	WS 2546	k. A.
<i>Lactobacillus plantarum</i>	G 637	protective culture
<i>Lactobacillus plantarum</i>	G 1075	k. A.
<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSMZ 20016 T	Intestine of adult
<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>	DSMZ 20069 T	k. A.
<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>	G 1204	Dairy
<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>	G 1771	Starter organism
<i>Lactococcus lactis ssp. diacetylactis</i>	WS 1686	Starter organism
<i>Lactococcus lactis ssp. diacetylactis</i>	G 777	Cheese
<i>Lactococcus lactis ssp. diacetylactis</i>	G 838	Dairy
<i>Lactococcus lactis ssp. diacetylactis</i>	G 1775	Starter organism
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	DSMZ 20481 T	k. A.
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	G 810	Dairy
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	G 1205	Dairy
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	G 1772	Starter organism
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	DSMZ 20346 T	Starter organism
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	G 822	Dairy
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	G 1326	Dairy
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	G 1328	Dairy
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	G 1331	Dairy
<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ 20617 T	Pasteurized milk
<i>Streptococcus thermophilus</i>	G 806	Dairy

---

<i>Streptococcus thermophilus</i>	G 829	Dairy
<i>Streptococcus thermophilus</i>	G 1795	Starter organism
<i>Streptococcus thermophilus</i>	G 1799	Starter organism
<i>Streptococcus thermophilus</i>	G 1800	Starter organism
<i>Weissella confusa</i>	DSMZ 20196 T	Sugar cane
<i>Weissella paramesenteroides</i>	DSMZ 20288 T	k. A.
<i>Weissella viridescens</i>	DSMZ 20410 T	Cured meat products

<sup>a</sup> ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany; WS, Weihenstephan Culture Collection, Abteilung Mikrobiologie, ZIEL Weihenstephan, Freising, Germany; G, Abteilung Mikrobiologie, ZIEL Weihenstephan, Freising, Germany; T, Type strain; k. A., keine Angabe



# CURRICULUM VITAE

MAREIKE WENNING

## PERSÖNLICHE ANGABEN

---

Geboren am: 07.08.1975 in Gelsenkirchen  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## SCHULBILDUNG

---

Mai 1995 Abitur am Gabelsberger Gymnasium in Mainburg

## STUDIUM

---

Nov. 1995 – Okt. 2000 Studium der Ökotoxikologie an der Technischen Universität München/Weihenstephan  
Diplomarbeit: durchgeführt am Institut für Mikrobiologie des Forschungszentrums für Milch und Lebensmittel Weihenstephan (FML) der Technischen Universität München  
Thema: pH-Stress-Antwort bei *Corynebacterium ammoniagenes* – Untersuchung der Auswirkungen von niedrigem pH-Wert auf das Spektrum der intrazellulären Proteine mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese

Nov. 2000 – Aug. 2004 Promotion in der Abteilung Mikrobiologie des Zentralinstituts für Ernährungs- und Lebensmittelforschung Weihenstephan (ZIEL, ehemals FML) der Technischen Universität München