

AiF-FV 12634 N

**Diagnostik von Mikroorganismen durch mikroskop-
unterstützte FTIR-Spektroskopie: Schnelle mikro-
bielle Populationsanalysen bei Lebensmitteln**

**Abschlußbericht
August 2003**

Institut für Mikrobiologie
Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Weihenstephan
Technische Universität München
Weihenstephaner Berg 3
D-85350 Freising

Leiter der Forschungsstelle: Univ.- Prof. Dr. Siegfried Scherer
Projektleiter: Dr. H. Seiler
Wissenschaftliche Mitarbeiterin: Mareike Wenning

INHALTSÜBERSICHT

I. ZUSAMMENFASSUNG	3
II. GEGENÜBERSTELLUNG DER ERGEBNISSE UND DER ZIELSETZUNGEN DES ANTRAGS	4
III. ERGEBNISSE UND IHRE AUSWIRKUNGEN AUF DEN WISSENSCHAFTLICH-TECHNISCHEN FORTSCHRITT	5
1. Ergebnisse	5
1.1 Identifizierung von Mikroorganismen mit FTIR-Mikrospektroskopie	5
1.2 Erstellung der Datenbank für Hefen	6
Entwicklung der allgemeinen Methode	6
Aufbau und Bewertung der Datenbank	7
Typisierung von Hefen auf Stammniveau	9
1.3 Erstellung der Datenbank für coryneforme Bakterien	10
Kultivierung und Probenahme	10
Aufbau und Bewertung der Datenbank	10
1.4 Erstellung der Datenbank für Milchsäurebakterien	11
Kultivierung und Probenahme	11
Aufbau und Bewertung der Datenbank	11
1.5 Populationsanalysen mit FTIR-Mikrospektroskopie	12
Entwicklung der allgemeinen Methode am Beispiel von Molkereiabwasser	12
Populationsanalyse von Bergkäse	13
Populationsanalyse von Appenzeller Käse	14
1.6 Grenzen der Methode	15
1.7 Fazit	15
2. Auswirkungen auf den wissenschaftlich-technischen Fortschritt	16
2.1. Schnelle Identifizierung von Mikroorganismen	16
2.2. Populationsanalysen mikrobieller Konsortien	16
3. Wirtschaftlicher Nutzen und industrielle Anwendungen in kleinen und mittleren Unternehmen	17
IV. PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGE	18
1. Publikationen	18
2. Vorträge	18

I. Zusammenfassung

Die Anwendung der FTIR-Mikrospektroskopie auf die Identifizierung lebensmittelrelevanter Mikroorganismen wurde erarbeitet. Bestandteile des Projektes waren die Entwicklung der allgemeinen Methodik wie Probenaufbereitung, Wahl der Meß- und Auswerteparameter, Aufbau von Referenzdatenbanken für unterschiedliche Organismengruppen sowie die Anwendung der Ergebnisse unter Praxisbedingungen.

Die Entwicklung der Methode am Beispiel der Hefen ergab einen optimalen Koloniedurchmesser für gut reproduzierbare Messungen von mindestens 70 µm, was für Hefen eine Inkubation von ca. 24 Stunden bei 25°C erfordert. Ein Vergleich des Identifizierungserfolges von Mikrospektroskopie und Spektroskopie am Beispiel der Hefendatenbank ergab äquivalente Ergebnisse für beide Systeme. Die Spezifität der Mikrospektroskopie geht zudem bis auf Stammniveau hinunter. Eine Typisierung von insgesamt 30 Stämmen der Arten *Saccharomyces cerevisiae* und *Debaryomyces hansenii* erzielte eine durchschnittliche Quote richtiger Zuordnungen auf Stammebene von 92 % für *S. cerevisiae* und 91 % für *D. hansenii*.

Insgesamt wurden für Hefen, coryneforme Bakterien und Milchsäurebakterien Referenzdatenbanken angelegt. Für Hefen war es möglich, alle Arten mit einem Zeitpunkt für die Probenahme, also den Transfer der Kolonien von der Agarplatte auf das ZnSe-Probenfenster, zu erfassen. Die Datenbank umfaßte 84 Spektren von 13 Arten und erzielte nach Optimierung der Auswerteparameter 80 % richtige Identifizierungen auf Speziesebene. Die Coryneformen konnten nicht alle mit einem Probenahmezeitpunkt erfaßt werden, da die Wachstumsgeschwindigkeiten zu stark variierten; hier wurden insgesamt drei verschiedene Zeitpunkte festgelegt. In die Bibliothek wurden 85 Spektren von 18 Spezies aufgenommen, von denen mit dem erarbeiteten Identifizierungsmodus 64 % richtig klassifiziert wurden. Für die Milchsäurebakterien wurden ebenfalls drei Zeitpunkte für den Kolonietransfer festgelegt. Die Referenzbibliothek umfaßte 44 Spektren von 10 Spezies und erzielte 68 % richtige Identifizierungen. Dies ist um so höher einzuschätzen, als es im Gegensatz zur FTIR-Spektroskopie keine zusätzlichen Zuckertests für die Vorauswahl einer Subbibliothek gab, sondern alle Arten in einer Datenbank zusammengefaßt waren.

Als praktische Anwendung der FTIR-Mikrospektroskopie wurde das Vorgehen für Populationsanalysen erarbeitet und die Floren von Molkereiabwasser nach der Klärung und zwei Rotschmierekäsen untersucht. Um der Tatsache Rechnung zu tragen, daß erwartungsgemäß nicht alle detektierten Keime auch ihre Entsprechung in der Datenbank finden, wurde die Methode so gewählt, daß die Organismen nach der Messung vom Probenfenster isoliert werden können. So wird eine mögliche Identifizierung dieser Isolate mit alternativen Methoden sichergestellt und eine Beschränkung des Systems auf bestimmte Floren vermieden. Bei der Analyse beider Käsekonsortien wurden jeweils ca. 1000 Spektren innerhalb einer Woche aufgenommen. Die Ergebnisse zeigen, daß mit FTIR-Mikrospektroskopie die Zusammensetzung derartiger Populationen in sehr kurzer Zeit detailliert erfaßt werden kann.

Wie sich bei der Erstellung der Datenbanken herausgestellt hat, gibt es für die Identifizierung von Mikroorganismen mit FTIR-Mikrospektroskopie Einschränkungen. Es besteht eine Abhängigkeit der Identifizierung der Mikroorganismen von ihrer Wachstumsgeschwindigkeit, da zu langsame Stämme unter Einhaltung der Transferzeitpunkte nicht in den Bibliotheken erfaßt werden können. Zudem ist das Adhäsionsverhalten einiger Stämme zum Probenhalter sehr schlecht, so daß auch diese nicht berücksichtigt werden können. Für reine Kulturen ist der Aufwand für eine Messung höher als mit FTIR-Spektroskopie und demnach auch der Probendurchsatz reduziert.

Nach unserer Einschätzung kann und soll daher die Mikrospektroskopie die herkömmliche FTIR-Spektroskopie nicht ersetzen, sondern ergänzen. Ihre Vorteile liegen in der Identifizierung von Mikroorganismen unter Zeitdruck, wenn die Isolierung aus der Probe unterbleiben kann, und der Analyse ganzer Populationen. Die Limitierungen der Methode können hier leicht umgangen werden, wenn das System nicht zu sehr generalisiert, sondern auf spezielle Anwendungen adaptiert wird.

Abgesehen von der Implementierung des Mikroskops in einen Praxisbetrieb wurden die Ziele des Vorhabens nach unserer Einschätzung erreicht.

II. Gegenüberstellung der Ergebnisse und der Zielsetzungen des Antrags

Zielsetzung	Ergebnisse
Entwicklung der Methode:	durchgeführt am Beispiel der Hefen, Prüfung der Spezifität, Bestimmung der methodenspezifischen Grenzen, Durchführung technischer Modifikationen am Mikroskop
Entwicklung der Spektrenbibliotheken für	
Hefen:	84 Spektren von 9 Gattungen, 13 Spezies, 11 Typstämme Inkubationsparameter: YGC-Agar, 25°C, Transferzeitpunkt nach 24 h Inkubation 80 % richtige Identifizierungen auf Speziesebene
Coryneforme Bakterien:	85 Spektren von 9 Gattungen, 18 Spezies, 11 Typstämme Inkubationsparameter: Caso-Agar, 30°C, Transferzeitpunkte nach 20, 30 und 48 h Inkubation 64 % richtige Identifizierungen auf Speziesebene
Milchsäurebakterien:	44 Spektren von 5 Gattungen, 10 Spezies bzw. 14 Subspezies, 13 Typstämme Inkubationsparameter: APT-Agar, 34°C, anaerob, Transferzeitpunkte nach 15, 24 und 40 h Inkubation 68 % richtige Identifizierungen auf Speziesebene
Prüfung diverser Kultivierungsbedingungen:	erfolgte bei der Erstellung aller Bibliotheken
Praktische Anwendung der Ergebnisse:	Erarbeitung der Methodik für Populationsanalysen Populationsanalysen von zwei Rotschmierekäsen und einem Molke- reiabwasser nach der Klärung
Identifizierung mit konventionellen Methoden:	erfolgte z.T. bei Hefen und Milchsäurebakterien, bei Coryneformen wurde auf eindeutig identifizierte Stämme zurückgegriffen
Vergleich mit FTIR-Spektroskopie:	erfolgte bei Hefen und den Populationsanalysen
Vergleich mit genanalytischen Methoden:	erfolgte bei den Populationsanalysen
Technologietransfer in einen Praxisbetrieb:	--

III. Ergebnisse und ihre Auswirkungen auf den wissenschaftlich-technischen Fortschritt

1. Ergebnisse

1.1 Identifizierung von Mikroorganismen mit FTIR-Mikrospektroskopie

Fourier-transformierte Infrarot (FTIR) -Spektroskopie hat sich in den letzten Jahren zunehmend als eine sehr praktikable und kostengünstige Alternative zu konventionellen Identifizierungsmethoden erwiesen. Die Kombination von Spektroskopie und Mikroskopie für die FTIR-spektrometrische Analyse von Mikrokolonien zur Anwendung im lebensmittelmikrobiologischen Labor zu bringen, war Thema dieses Projektes.

Mikrokolonien von ca. 200 µm Durchmesser, wie sie nach einer Inkubation von ca. 24 Stunden vorliegen, werden über ein Abklatschverfahren von der Agarplatte auf das Trägermaterial überführt. Die einzelnen Mikrokolonien auf dem Probenfenster werden unter dem Lichtmikroskop detektiert, markiert und dann im Infrarotmodus des Mikroskops automatisiert gemessen. Ein vollautomatischer, computergesteuerter Objektisch ermöglicht die Messung von beliebig vielen Kolonien in Serie. Die Spektren werden im mittleren IR-Bereich zwischen den Wellenzahlen 4000 bis 400 cm⁻¹ (2.500 bis 25.000 nm) aufgenommen und sind durch verschiedene Bereiche, die näherungsweise der Absorption einzelner Zellbestandteile zuzuordnen sind, charakterisiert (Abb. 1). So liegt im Bereich von 3000 bis 2800 cm⁻¹ im wesentlichen die Absorption der Fettsäuren, bei 1800 bis 1500 cm⁻¹ der Proteine, bei 1500 bis 1200 cm⁻¹ absorbieren verschiedenste Verbindungen wie Ester und Aromaten, bei 1200 bis 900 cm⁻¹ liegen die Maxima der Polysaccharide und zwischen 900 und 700 cm⁻¹ liegt der Fingerprint-Bereich. Diese Summe der Absorptionen aller Zellbestandteile ergibt unter standardisierten Bedingungen sehr gut reproduzierbare und hoch charakteristische Spektren, die unter Zuhilfenahme von Referenzdatenbanken für eine Identifizierung genutzt werden.

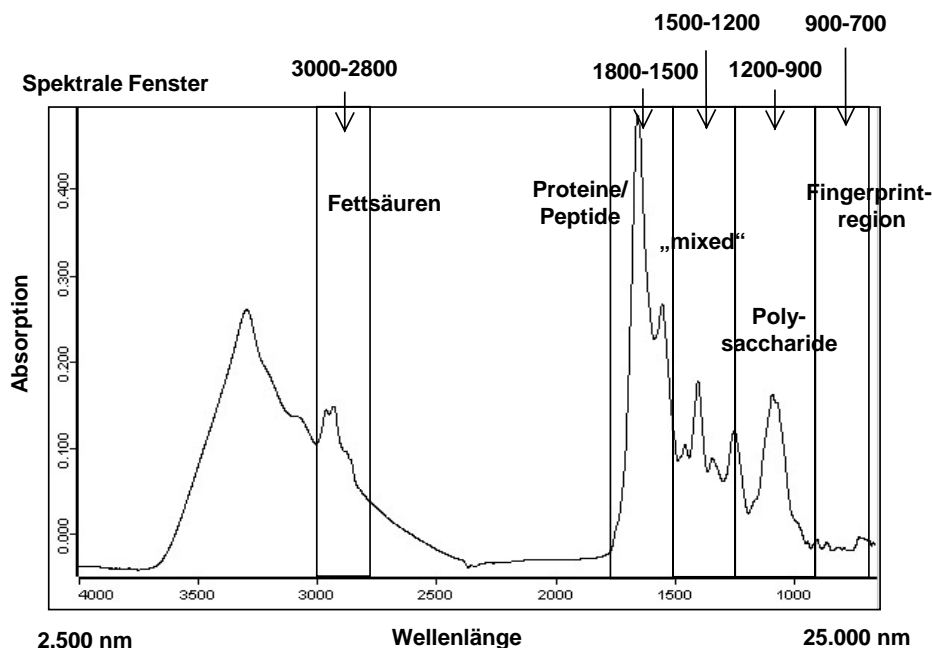


Abb. 1. FTIR-Spektrum eines Bakteriums mit Angabe der Absorptionen unterschiedlicher Zellkomponenten in bestimmten spektralen Bereichen.

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. Auch überlagern sich die einzelnen komplexen Banden im Absorptionsspektrum stark, so daß für die Auswertung der Spektren die erste bzw. zweite Ableitung berechnet wird, die eine Auflösung dieser Banden in einzelne Peaks bewirkt. Die Identifizierung ist ferner stark von der Zusammensetzung der Bibliotheken abhängig, da sich die Anpassung von Mikroorganismen an unterschiedliche Habitate auch in der stofflichen Zusammensetzung ihrer Zellen niederschlägt. Somit können sich Isolate der gleichen Art, die aus verschiedenen Lebensmitteln oder Milieus isoliert wurden, verhältnismäßig stark unterscheiden. Eine Datenbank muss demnach für eine treffsichere Identifizierung eine Vielzahl von Spektren unterschiedlicher Formen einer Spezies umfassen.

1.2 Erstellung der Datenbank für Hefen

Entwicklung der allgemeinen Methode

Hefen sind eine gut bekannte Keimgruppe, von der am Institut für Mikrobiologie des FML Weihenstephan eine umfangreiche Stammsammlung existiert. Sie für eine erstmalige Anwendung der FTIR-Mikrospektroskopie einzusetzen lag also nahe.

Bevor mit dem Aufbau einer Datenbank begonnen werden konnte, mußten die Parameter der Probenaufbereitung festgelegt werden. Hierzu gehören das Wachstumsmedium und die Inkubationstemperatur, die die stoffliche Zusammensetzung der Zellen maßgeblich beeinflussen, und die Inkubationsdauer, die den Durchmesser und damit auch die Dicke der Kolonien nach dem Transfer auf das Probenfenster determiniert. Zur Ermittlung der Korrelation zwischen Inkubationsdauer, Koloniedurchmesser und Reproduzierbarkeit der Messungen wurden Wachstumskurven erstellt und Kolonien unterschiedlichen Durchmessers gemessen. In Abb. 2A sind für sechs verschiedene Hefespezies Wachstumsverläufe dargestellt, die z.T. stark differieren. *Saccharomyces cerevisiae* hat 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. Abb. 2B zeigt den Einfluß der Inkubationsdauer und damit der Koloniegröße auf die Reproduzierbarkeit der Messungen am Beispiel von *S. cerevisiae*. Mit zunehmendem Durchmesser verbessert sich die Reproduzierbarkeit der Spektren von Kolonien gleicher Größe, wobei eine spektrale Distanz (SD) von < 0,5 als Grenzwert für Wiederholungsmessungen zu sehen ist. Damit ergibt sich ein minimaler Koloniedurchmesser von 70 µm für reproduzierbare Messungen. Darunter ist das Verhältnis von am Detektor gemessenem Signal zum Hintergrundrauschen aufgrund zu geringer Probenmasse noch zu klein. Auch könnten die Zellen an der Oberfläche der Kolonie noch nicht in die stationäre Wachstumsphase übergegangen sein und somit in ihrer Zusammensetzung stärker differieren. Dazu kommt, daß Unterschiede zwischen einzelnen Zellen nur über eine verhältnismäßig geringe Zellzahl gemittelt werden und demzufolge stärker zum Tragen kommen.

K. marxianus zeigt in Abb. 2A das langsamste Wachstum und benötigt zum Erreichen einer Koloniegröße von 70 µm bei 25°C ca. 24 Stunden, *S. cerevisiae* erreicht dagegen in der gleichen Zeit spielend 250 µm. Spektren von großen Kolonien bis 250 µm sind denen kleinerer Kolonien jedoch hoch ähnlich, so daß zwischen 70 und 250 µm der Durchmesser die Qualität der Spektren nicht mehr beeinflusst. 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 liegen hin und wieder Organismen vor, die noch langsamer wachsen und nicht in das vorgegebene Schema passen. Hier kann die Agarplatte – falls es sich nur um wenige Stunden handelt – in Abweichung von der Methode länger bebrütet werden oder es müßte ein zweiter Stempelzeitpunkt gewählt werden. Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf z.B. 27°C und damit eine Beschleunigung des Wachstums macht wenig Sinn, da dann zwar die langsam wachsenden Spezies schneller wachsen würden, die wachstumsstarken Arten allerdings auch, was die Diskrepanz der Koloniegröße zwischen diesen Arten nur vergrößern würde.

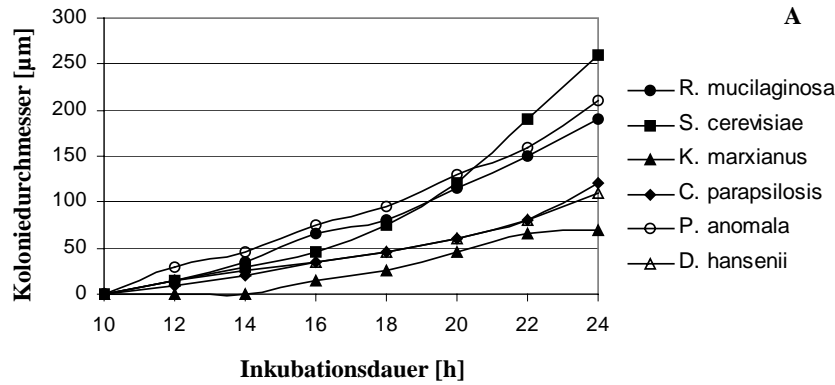


Abb. 2A. Koloniedurchmesser sechs verschiedener Hefespezies auf dem Probenträger, gemessen nach unterschiedlich langer Inkubation auf YGC-Agar bei 25°C.

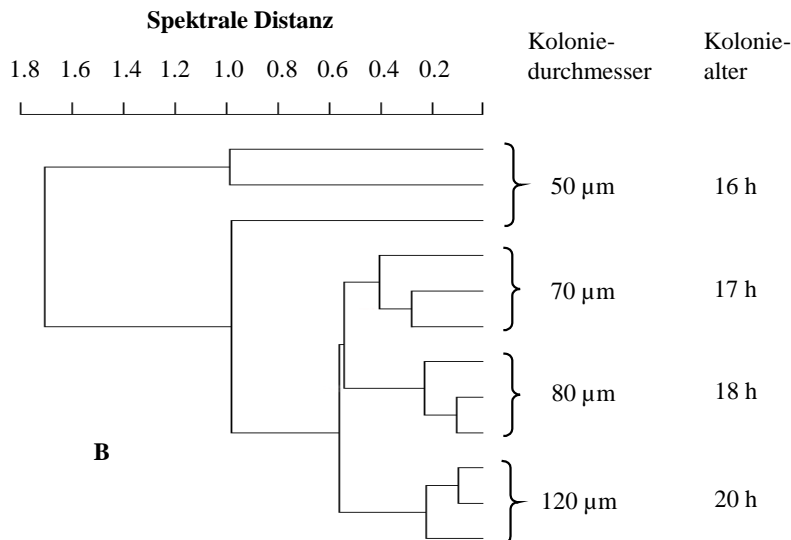


Abb. 2B. Korrelation von Koloniedurchmesser und Reproduzierbarkeit der Messungen. Dendrogramm von *S. cerevisiae* Spektren, aufgenommen nach unterschiedlich langer Bebrütung bei 25°C. Spektrale Fenster 3030-2830 cm^{-1} , 1350-1200 cm^{-1} und 900-700 cm^{-1} , Average linkage, Korrelation mit Normalisierung auf Replevel.

Aufbau und Bewertung der Datenbank

In die Bibliothek wurden insgesamt 84 Spektren von 82 Stämmen aus 13 Spezies und 9 Gattungen aufgenommen, wobei v.a. die Arten berücksichtigt wurden, die nach unserer Erfahrung am häufigsten als Saprophyte in Sauermilchprodukten auftreten (Tab. 1). Für jede Spezies wurden sowohl Stämme aus offiziellen Sammlungen – u.a. die Typstämme – als auch Isolate aus dem Molkereiumfeld ausgewählt. Die Stämme wiesen zum großen Teil ein gutes bis ausreichendes Wachstum auf, in Einzelfällen mußte jedoch länger bebrütet werden 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, die vermutlich über die lange Kultivierung unter Laborbedingungen degeneriert und damit in ihrem Wachstum stark eingeschränkt waren. Bei Wildisolaten trat eine solche Erscheinung nur in einem Fall und auch da nur sehr schwach auf.

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu gewährleisten und Zufallsergebnisse auszuschließen, wurde jeder Stamm mindestens dreimal gemessen, wobei jeweils drei bis sechs Spektren unterschiedlicher Kolonien aufgenommen wurden, und jeweils ein repräsentatives Spektrum jeder Messung zu einem Mittelwertspektrum verrechnet. Die Parameter der Datenverarbeitung wurden zunächst von der Identifizierung der Hefen mit FTIR-Spektroskopie übernommen und sollten später überprüft werden. Von den Originalspektren wurde die 2. Ableitung berechnet und die spektralen Bereiche – auch spektrale Fenster genannt – von 3030 bis 2830 cm^{-1} , 1350 bis 1200 cm^{-1} und 900 bis 700 cm^{-1} für die Errechnung der Distanzmaße herangezogen.

Um den Identifizierungserfolg der FTIR-Mikrospektroskopie und somit die Spezifität der Methode im Vergleich zur FTIR-Spektroskopie zu ermitteln, wurde aus 45 Stämmen für jedes System eine Datenbank aufgebaut und einer externen Validierung unterzogen. Die Ergebnisse in Abb. 3 zeigen mit 67 % für die Mikrospektroskopie und 65 % für die Spektroskopie äquivalente Identifizierungsraten auf Speziesebene und damit für beide Methoden ein ähnliches Leistungsniveau. Bei der Bewertung der Ergebnisse muß beachtet werden, daß der Erfolg stark von der Zusammensetzung der Datenbank abhängt. So fallen die Identifizierungsraten bei derart kleinen Datensätzen nicht so gut aus, wie man es sich wünschen würde, da die einzelnen Spezies mit drei bis fünf Vertretern in der Datenbank unterrepräsentiert und in ihrer Variabilität keinesfalls abgedeckt sind (siehe 1.1). Eine Erweiterung der Spektrenzahl auf 84 verbesserte den Identifizierungserfolg der Mikrospektroskopie auf 73 % (Abb. 3).

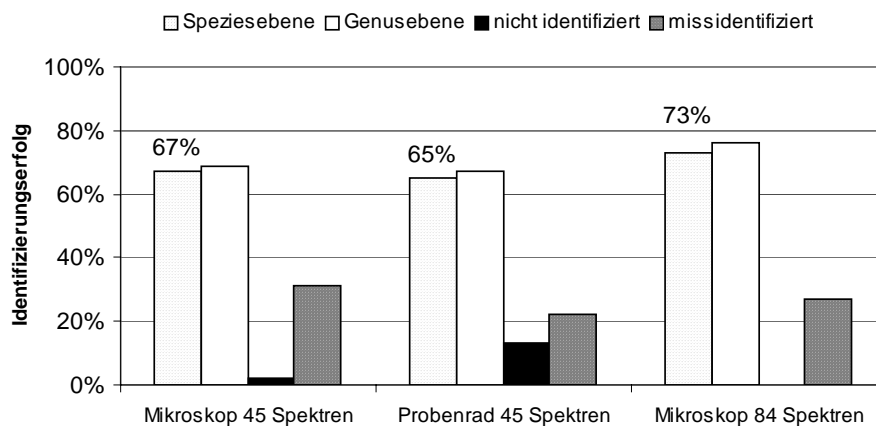


Abb. 3. Identifizierung von Hefen. Vergleich des Identifizierungserfolgs von FTIR-Mikrospektroskopie (Mikroskop) und FTIR-Spektroskopie (Probenrad) mit 45 Spektren und Mikrospektroskopie mit 84 Spektren in der Datenbank. 2. Ableitung, Spektrale Fenster: 3030-2830 cm^{-1} , 1350-1200 cm^{-1} und 900-700 cm^{-1} , Korrelation mit Normalisierung auf Reporevel.

Die Erweiterung der Datenbank sollte Lücken zwischen bereits enthaltenen Stämmen schließen und die Rate der richtigen Identifizierungen steigern. Um diesen Effekt zu verdeutlichen wurde die Zahl der *Debaryomyces 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 Abb. 4 zu sehen, steigt die Rate der richtigen Identifizierungen mit zunehmender Zahl der Stämme von 37 % auf 81 %. Die Standardabweichungen sind zu Beginn sehr hoch, verringern sich aber erwartungsgemäß mit Erhöhung der Spektrenchar stark. Die Erfassung möglichst vieler Formen einer Art in der Referenzdatenbank wirkt sich also außerordentlich positiv auf die erzielten Ergebnisse aus.

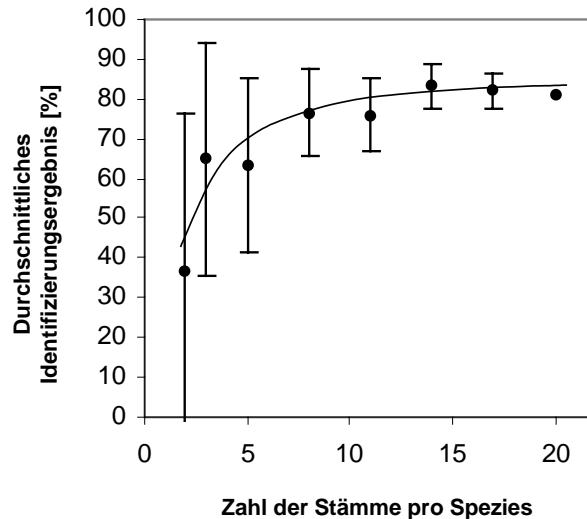


Abb. 4. Identifizierung von *D. hansenii* Stämmen gemessen mit FTIR-Mikrospektroskopie. Jeder Datenpunkt steht für das durchschnittliche Identifizierungsergebnis von zehn zufallsbedingt ausgewählten Kombinationen mit 3, 4, 6, 9, 12, 15, 18, oder 21 Stämmen. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

Bei Betrachtung der Einzelergebnisse der externen Validierung fällt auf, daß einige Spezies prinzipiell gut zu identifizieren sind, bei anderen dagegen Probleme auftreten. So verläuft die Typisierung von *Candida intermedia*, *Candida tropicalis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Rhodotorula mucilaginosa* und *S. cerevisiae* weitgehend unproblematisch mit nur wenigen oder gar keinen Fehlidentifizierungen, bei *C. parapsilosis*, *Torulaspora delbrueckii* und v. a. *D. hansenii*, *K. marxianus* und *Pichia guilliermondii* ergeben sich jedoch Schwierigkeiten. So kommt es z.B. bei *T. delbrueckii* in mehreren Fällen zu einer Fehlidentifizierung durch *D. hansenii* CBS 6960, bei *P. guilliermondii* ebenfalls in einigen Fällen zu einer falschen Identifizierung durch Stämme der Art *D. hansenii*. Umgekehrt verursachen diese Spezies Fehlidentifizierungen bei *D. hansenii*. Es kommt mit dem hier angewandten Klassifizierungssystem offensichtlich zu starken Überschneidungen dieser Arten, die durch eine andere Parameterwahl eventuell vermieden werden könnten. Als erste Alternative wurde die 1. Ableitung der Spektren für eine Identifizierung herangezogen, ergab allerdings statt der erhofften Verbesserung eine deutliche Verschlechterung des Ergebnisses von 73 % auf 63 % (Abb. 5A). Als zweite Alternative wurden die Spektren bzw. deren 2. Ableitungen einer detaillierten visuellen Analyse unterzogen, bei der sich herausstellte, daß diese Arten im Amidbereich von 1810 bis 1710 cm^{-1} Unterschiede aufzeigen. Eine Validierung der Bibliothek mit den um diesen Bereich erweiterten spektralen Fenstern verbesserte den Identifizierungserfolg deutlich auf 80 % (Abb. 5B) und zeigt einmal mehr, wie viel die richtige Auswahl der spektralen Fenster für den Erfolg der Methode bedeutet.

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. Abb. 6 zeigt, daß Wiederholungsmessungen verschiedener Stämme im Dendrogramm jeweils fusionieren. In jedem Fall bilden unabhängige Wiederholungsmessungen eines Stammes ein Subcluster, das sich klar von Subclustern anderer Stämme abhebt. Mit jedem Stamm der Bibliothek wurde eine vierte unabhängige Wiederholungsmessung durchgeführt und die resultierenden Spektren gegen die Bibliothek identifiziert. Stämme von *D. hansenii* hatten in der Clusteranalyse eine geringere Ähnlichkeit als die von *S. cerevisiae* gezeigt, weshalb wir erwarteten, daß erstere Art gute Ergebnisse bei der Stammidentifizierung ergeben würde, bei *S. cerevisiae* dagegen rechneten wir mit größeren Abweichungen. Für jeden Stamm wurden drei bis fünf Spektren identifiziert und die durchschnittliche Quote richtiger Zuordnungen auf Stamm-

ebene berechnet. Tatsächlich ergab sich mit 92 % für *S. cerevisiae* und 91 % für *D. hansenii* für beide Spezies jeweils eine sehr hohe Quote richtiger Identifizierungen. Diese unerwartet guten Ergebnisse auch für das relativ homogene *S. cerevisiae*-Taxon demonstrieren, daß FTIR-Mikrospektroskopie eine sehr vielversprechende Technologie für die Charakterisierung von Hefen über die Speziesebene hinaus ist.

1.3 Erstellung der Datenbank für coryneforme Bakterien

Kultivierung und Probenahme

Der Zeitpunkt der Probenahme, also des Transfers der Mikrokolonien von der Agarplatte auf den Stempel, wird von der Koloniegröße determiniert. Ausgehend von den Erfahrungen mit der Entwicklung der Hefenbibliothek sollte für die Aufnahme qualitativ guter Spektren der geeignete Koloniedurchmesser zwischen 70 und 250 µm liegen. Abb. 7 zeigt die Koloniegröße einiger Stämme 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 einzigen Stempelzeitpunkt für alle Stämme zu bestimmen, statt dessen wurden die drei Zeitpunkte 20, 30 und 48 Stunden gewählt. Diese decken sowohl die schnell als auch die langsamer wachsenden Arten ab und liegen zudem günstig für praktische Anwendungen der Methode. Alle Stämme, die zu zwei Zeitpunkten geeignete Koloniedurchmesser erreichten, wurden auch an beiden Zeitpunkten gestempelt und mit zwei Spektren in der Bibliothek abgelegt.

Wie bereits vermutet ergab sich für Kolonien eines Stammes mit einem Durchmesser zwischen 70 und 250 µm eine gute Reproduzierbarkeit der Spektren (Daten nicht gezeigt).

Aufbau und Bewertung der Datenbank

In die Datenbank wurden insgesamt 85 Spektren aus 18 Spezies und neun Gattungen aufgenommen (Tab. 2). Sie gehören zu 67 Stämmen, von denen 18 mit 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. Einige Stämme, unter ihnen auch der Typstamm von *Brevibacterium 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 hatten sich die Kolonien eines Stammes von *Rathayibacter tritici* so in den Agar gefressen, daß es nicht möglich war, sie auf den ZnSe-Kristall zu überführen und zu messen.

Analog zum Aufbau der Hefendatenbank wurden auch hier von jedem Stamm mehrere Messungen durchgeführt und Mittelwertspektren gebildet. Zur Wahl der optimalen Parameter für die Datenverarbeitung und gleichzeitiger Evaluierung des Identifizierungserfolges wurde eine Modelldatenbank mit 65 Referenzspektren unter Anwendung verschiedener Kombinationen von 1. oder 2. Ableitung und unterschiedlichen spektralen Fenstern getestet. Die erste Fensterkombination von 3030 bis 2830 cm⁻¹, 1350 bis 1200 cm⁻¹ und 900 bis 700 cm⁻¹ kam auch schon bei der Identifizierung der Hefen zum Einsatz, die zweite von 3000 bis 2800 cm⁻¹, 1800 bis 1500 cm⁻¹, 1500 bis 1200 cm⁻¹, 1200 bis 900 cm⁻¹ und 900 bis 700 cm⁻¹ wurde adaptiert von der Identifizierung der Coryneformen mit FTIR-Spektroskopie. In Abb. 8 ist der durchschnittliche Identifizierungserfolg für zwei dieser Varianten dargestellt.

Die Kombination von 1. Ableitung mit den fünf Fenstern der Coryneformenidentifizierung erzielte mit 53 % richtiger Identifizierung auf Speziesebene die besten Ergebnisse und wurde als Standardmethode festgelegt. Dennoch ist diese Quote nicht zufriedenstellend. Die Ursache liegt zum einen darin, daß die Spezies *Corynebacterium casei* und *Staphylococcus xylosus* jeweils nur mit einem Stamm vertreten waren und somit auch nicht richtig identifiziert werden konnten. Außerdem sind weitere drei Spezies mit nur jeweils zwei Stämmen in der Bibliothek abgelegt, was richtige Identifizierungen ebenfalls erschwert. Zudem können *C. casei* und *Corynebacterium ammoniagenes* phänotypisch nur sehr schwer oder gar nicht unterschieden werden, da *C. casei* lediglich eine genotypische Variante von

C. ammoniagenes ist. Die gute Quote der Identifizierungen auf Genusebene von 83 % zeigt, daß zwei Drittel der falschen Identifizierungen auf Gattungsebene die richtige Klassifizierung ergaben, eine zufriedenstellende Trennung der einzelnen Spezies jedoch nicht erfolgte. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, daß die Stämme nach dem Kriterium ausgewählt wurden, die Spezies möglichst gut und breit zu erfassen und einige Stämme somit aus dem Überlappungsbereich zwischen zwei Arten kommen. Zudem wurde versucht, so weit es ging bereits sequenzierte Stämme als Referenzen zu wählen, da hier die Identität eindeutig geklärt ist. Allerdings wurden bei früheren Identifizierungen vor allem die Stämme sequenziert, die schwierig zu klassifizieren waren, was wiederum dazu führte, daß nicht nur häufige Vertreter einer Spezies, sondern auch eher seltene Exemplare für die Bibliothekserstellung ausgesucht wurden. Dies ist zwar zum einen erwünscht, um die Spezies möglichst umfassend abzudecken, zum anderen bedingt es aber bei Validierungen dieser Art Schwierigkeiten.

Eine Erweiterung der Datenbank auf 67 Stämme mit 85 Spektren verbesserte den Identifizierungserfolg auf 64 % (Abb. 8). Die Arten der Gattung *Corynebacterium* werden jetzt sicherer identifiziert, obwohl noch nicht alle Schwierigkeiten behoben sind. Problematisch für die Identifizierung sind weiterhin Spezies mit wenig Referenzspektren wie *Brachybacterium faecium*, *Brachybacterium tyrofermentans*, *Kocuria rhizophila* oder *R. tritici*. Hier muß die Bibliothek noch weiter ausgebaut werden.

1.4 Erstellung der Datenbank für Milchsäurebakterien

Kultivierung und Probenahme

Milchsäurebakterien werden in mesophile und thermophile Organismen unterteilt. Aufgrund dieser Tatsache wurde erwartet, daß die Erfassung aller für die Produktion von Lebensmitteln relevanten Spezies in einem Protokoll nicht einfach werden würde. Die Wachstumskurven in Abb. 9 zeigen zwar ein stark unterschiedliches Wachstum auf APT-Agar bei 30°C, dennoch erreicht ein großer Teil der getesteten Stämme ausreichende Koloniegroßen innerhalb von 15 bis 20 Stunden. Einige Vertreter der thermophilen Fraktion wie *Lactobacillus delbrueckii* oder *Lactobacillus acidophilus* wachsen jedoch bei 30°C nur sehr spärliches bis gar nicht und sind somit in der Darstellung nicht erfaßt. Tests mit verschiedenen Agars wie M17, MRS oder Milchagar erzielten keine besseren Ergebnisse. Daraufhin wurde die Temperatur schrittweise erhöht, um auch die thermophilen zu besserem Wachstum anzuregen, die mesophilen – im Besonderen *Leuconostoc mesenteroides* – jedoch nicht an die Grenze ihrer Belastbarkeit zu treiben. Als optimale Inkubationstemperatur erwiesen sich 34°C. Ein Großteil der Organismen konnte hier nach 15 Stunden gestempelt werden, zwei weitere Probenahmepunkte waren nach 24 und 40 Stunden.

Die Wahl der Probenahmezeitpunkte wurde allerdings nicht ausschließlich vom Koloniedurchmesser bestimmt, sondern auch vom Adhäsionsverhalten der Kolonien zum ZnSe-Probenfenster. Einige Stämme der Arten *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus* und *Lactobacillus helveticus* bilden schon innerhalb 24 Stunden Inkubation ausreichend große Koloniedurchmesser, bleiben jedoch nicht am Proben-träger haften. Erst wenn die Kolonien relativ groß und damit auch höher sind, kann genügend Zellmaterial für eine Messung auf den Kristall übertragen werden.

Aufbau und Bewertung der Datenbank

In die Referenzdatenbank wurden 44 Mittelwertspektren von 40 Stämmen aus 10 Spezies und 5 Gattungen aufgenommen (Tab. 3). Die Arten *Lb. delbrueckii* und *Lactococcus lactis* waren jeweils mit drei Subspezies vertreten. Ein Stamm von *Lb. acidophilus* zeigte auch nach 40 Stunden Inkubation keine Adhäsion an das Probenfenster und mußte somit von der Messung ausgeschlossen werden.

Nach einer visuellen Spektrenanalyse wurden sechs verschiedene spektrale Bereiche von 3000 bis 2800 cm⁻¹, 1660 bis 1500 cm⁻¹, 1420 bis 1400 cm⁻¹, 1360 bis 1200 cm⁻¹, 1180 bis 1090 cm⁻¹ und 950 bis 700 cm⁻¹ für die Identifizierung festgelegt und der Identifizierungserfolg sowohl mit der ersten als auch der zweiten Ableitung ermittelt. Die erste Ableitung stellte sich, wie schon bei den Coryneformen, als die bessere Alternative heraus (Abb. 10). 68 % der Spektren wurden richtig nach Spezies klassifiziert und 89 % der korrekten Gattung zugeordnet. 17 Spektren der Arten *Lb. delbrueckii* und

Lc. lactis gehörten unterschiedlichen Subspezies (jeweils drei pro Art) an, von denen 53 % richtig identifiziert wurden.

Für eine Datenbank mit lediglich 44 Spektren sind diese Ergebnisse sehr zufriedenstellend, im Besonderen deshalb, weil im Gegensatz zur herkömmlichen FTIR-Spektroskopie keine zusätzlichen Stoffwechselreaktionen getestet wurden. Mit FTIR-Spektroskopie war es nicht möglich, eine Datenbank für alle Organismen anzulegen, sondern die Gruppe wurde in sechs Subbibliotheken unterteilt und die Zugehörigkeit zu den einzelnen Bibliotheken über charakteristische Reaktionen im Zuckerstoffwechsel determiniert.

Schwierigkeiten bei der Identifizierung ergaben sich für *Lactobacillus casei*, *Lb. helveticus*, *Lactobacillus fermentum* und *Streptococcus thermophilus* vor allen Dingen deshalb, weil ihre Spektren innerhalb der Art relativ große Unterschiede zueinander aufweisen und diese Arten infolgedessen mit mehr als nur zwei oder drei Stämmen in der Datenbank vertreten sein sollten. Bei der Typisierung auf Subspeziesebene traten v.a. bei den Lactobazillen Probleme auf, jedoch waren zwei der drei Subspezies nur mit zwei Stämmen vertreten. Vermutlich werden eine Erweiterung der Datenbank und eine nochmalige Analyse der Spektren dieses Problem entschärfen.

1.5 Populationsanalysen mit FTIR-Mikrospektroskopie

Entwicklung der allgemeinen Methode am Beispiel von Molkereiabwasser

Bei der Anwendung der FTIR-Mikrospektroskopie für Populationsanalysen wird in der Praxis vermutlich jeweils eine bestimmte Organismengruppe im Fokus der Untersuchung stehen, doch kann nicht genau vorhergesehen werden, welche Keime tatsächlich detektiert werden und demnach auch identifiziert werden sollen. Da der große Vorteil der Methode in der unverzerrten Analyse der Zusammensetzung von Konsortien ohne vorherige Isolierung liegt, werden sich zwangsläufig Probleme bei der Identifizierung von Organismen ergeben, die nicht Bestandteil der Referenzbibliotheken sind. Somit wird es für die Analyse unbekannter Populationen notwendig sein, stichprobenartig Isolierungen vorzunehmen und die gereinigten Kulturen mit alternativen Methoden zu identifizieren. Im Idealfall sollten diese Isolate den mit Mikrospektroskopie aufgenommenen Spektren direkt zuzuordnen sein, um möglichst exakte Klassifizierungen zu erreichen.

Die prinzipielle Vorgehensweise bei Populationsanalysen sollte mit einer Untersuchung der Flora eines Molkereiabwassers nach der Klärung erarbeitet werden. Da für im Wasser zu erwartende Keime keine Bibliothek mit Referenzspektren existierte, sollte die Identifizierung über die Isolierung und nachfolgende Identifizierung ausgewählter Keime erfolgen. Nach dem ersten Ansatz wurde das Abwasser bei -20°C gelagert und für den zweiten Ansatz wieder aufgetaut. Nach Anlegen einer Verdünnungsreihe wurden die Proben auf CASO-Agar bei 30°C inkubiert und nach jeweils 17 bzw. 24 Stunden gestempelt, um sowohl die langsam als auch die schneller wachsenden Organismen zu erfassen. Alle Kolonien auf dem Probenfenster mit einem Durchmesser zwischen 70 und 250 μm wurden gemessen und die resultierenden Spektren zu einem Dendrogramm verrechnet, anhand dessen eine grobe Einteilung der Spektren in Gruppen vorgenommen wurde. In jedem Subcluster des Dendrogramms wurden repräsentative Kolonien ausgewählt, die über die Koordinaten des computergesteuerten Objektisches exakt angefahren werden konnten. Diese bereits angetrockneten Kolonien wurden mit Zahnstochern vom Probenfenster gepickt und in PC-Bouillon suspendiert. Die Bouillon wurde bei 30°C inkubiert und die gewachsenen Organismen auf CASO-Agar ausgestrichen. Die höheren Verdünnungen des Abwassers wurden drei Tage bebrütet und von diesen Platten ebenfalls Kolonien gepickt. Alle Isolate wurden mit FTIR-Spektroskopie gemessen, um Duplikate herauszufiltern und die Probenzahl zu reduzieren, die verbliebenen Isolate über 16S rDNA-Sequenzierungen identifiziert und nochmals mit FTIR-Mikrospektroskopie gemessen. Im Dendrogramm sollten diese Spektren mit den Clustern fusionieren, die ähnliche Spektren enthalten, und diesen somit einen Speziesnamen zuordnen.

Bei der ersten Analyse wurden insgesamt 246 Spektren aufgenommen, von denen 63 wegen zu schlechter Qualität aussortiert werden mußten; insgesamt gingen also 183 Spektren in die Auswertung ein. Bei der zweiten Analyse wurden 126 Mikrokolonien gemessen und nur zwei Spektren waren von schlechter Qualität. 15 Stämme wurden von den Platten isoliert und 21 der vom Probenfenster gepickten Stämme konnten in Bouillon rekultiviert werden. Ursprünglich sollten wesentlich mehr Organismen

men vom Probenfenster isoliert werden, doch die Vorgehensweise des Pickens hat sich als nicht optimal erwiesen. Zum einen zeigte ein großer Teil der Isolate in der Bouillon kein Wachstum, was darauf hindeutet, daß entweder der Transfer der Zellen mit dem Zahnstocher vom Stempel in die Bouillon nicht gelungen ist oder die Organismen durch die Trocknung schon so stark geschädigt waren, daß kein Wachstum mehr möglich war. Des weiteren sind Kontaminationen aufgetreten, d.h. in der Bouillon sind zwei oder mehr Keime gewachsen oder der gewachsene Organismus konnte nach der Messung mit FTIR-Mikrospektroskopie keinem der Cluster der Populationsanalyse zugeordnet werden. Die Identifizierung dieser Isolate mit FTIR-Spektroskopie zeigte, daß es sich v.a. um Keime wie *Staphylococcus epidermidis*, *Brachybacterium* sp. oder *Micrococcus luteus* handelte, die vermutlich während des Isolierens in die Bouillon gelangten. Vollständig sterile Bedingungen können bei dieser Art der Untersuchung nicht eingehalten werden, da für das exakte Anfahren der Kolonien auf dem Stempel der Objektstisch des Mikroskops unabdingbar ist und somit auf eine kontrollierte Arbeitsumgebung verzichtet werden muß.

Abb. 9A und B zeigen die Ergebnisse der Populationsanalysen des ersten (A) und zweiten (B) Ansatzes. In der Analyse des frischen Abwassers (A) finden sich insgesamt mindestens drei verschiedene Organismen: *Streptococcus suis*, *Thauera ~mechernichensis* und ein Organismus, der nicht identifiziert werden konnte, weil kein Spektrum der isolierten Keime mit diesem Cluster fusionierte. Ein Grund hierfür könnte sein, daß aus Wasser isolierte Mikroorganismen bei wiederholter Kultivierung auf festem Medium ihren Stoffwechsel auf trockene Bedingungen umstellen und somit andere Spektren ergeben, die mit denen einer Kultivierung direkt vom Wasser ausgehend nicht mehr vergleichbar sind. Da vom Stempel gepickte Kolonien dieses Clusters in Bouillon nicht gewachsen waren, konnte auch keine Zuordnung über ein direktes Isolat vorgenommen werden.

Im zweiten Ansatz der Wasserprobe, die in diesem Fall für einige Tage bei -20°C gelagert wurde, ergab sich eine um eine Log-Einheit reduzierte Gesamtkeimzahl. Es konnten ebenfalls *St. suis* und *Th. ~mechernichensis* nachgewiesen werden und zudem einige Organismen, die nicht identifiziert werden konnten. Zusätzlich wurde *Pseudomonas putida* identifiziert, die noch im ersten Ansatz nicht detektiert werden konnte. Dies bedeutet, daß das Einfrieren offenbar nicht nur die Gesamtkeimzahl im zweiten Ansatz um ca. eine Log-Einheit reduziert hat, sondern auch die Mengenverhältnisse der Population verschoben wurden. Im ersten Ansatz wurden 60 % *St. suis*, 5 % *Th. mechernichensis* und 35 % nicht identifizierte Organismen gefunden. Im zweiten Ansatz dagegen hatte *St. suis* einen Anteil von 66 %, *Th. mechernichensis* von 18 %, die nicht identifizierbaren von 6 % und es konnte *Ps. putida* als vierter Organismus mit 10 % Anteil an der Population nachgewiesen werden. Es scheint, daß der nicht identifizierte Organismus durch das Einfrieren stärker geschädigt und damit selektiv in seinem Anteil reduziert wurde. Der Anteil von *Ps. putida* lag dadurch nicht mehr unter der Nachweisgrenze und konnte somit erfaßt werden.

Populationsanalyse von Bergkäse

Die Oberflächenreifungsflora eines Vorarlberger Bergkäses, ein Hartkäse, sollte analysiert werden und gleichzeitig als Praxistest für die erarbeitete Coryneformen-Datenbank dienen, die zum Stand dieser Untersuchung 65 Referenzspektren umfaßte. Die Gesamtkeimzahl betrug $1,4 \times 10^8$ KbE/g, dies entspricht $3,5 \times 10^7$ KbE/cm² Rinde. Analog zu den gewählten Stempelzeitpunkten für die Erstellung der Bibliothek wurde auch der Käseansatz zu drei verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Nach 20 Stunden Inkubation wurden 596 Mikrokolonien gemessen, nach 30 Stunden 260 und nach 48 Stunden 242. 82 Spektren mußten wegen zu schlechter Qualität von der Auswertung ausgeschlossen werden, alle übrigen 1016 Spektren wurden mit der Coryneformen-Datenbank bestehend aus 65 Referenzspektren identifiziert.

Zudem wurden insgesamt 213 Kolonien direkt vom ZnSe-Probenfenster und von der Agarplatte isoliert und mit FTIR-Spektroskopie identifiziert. Die Vorgehensweise beim Isolieren der Kolonien vom Probenfenster wurde ausgehend von der Analyse des Abwassers dahingehend geändert, daß die Kolonien auf dem Stempel nach der Messung in einer Atmosphäre mit 95 % relativer Feuchte rehydriert wurden, um die Zellen vor zu starken Schäden durch Austrocknung zu bewahren, und zudem die Zahnstocher ebenfalls feucht gehalten wurden, um ein besseres Adhäsieren der Zellen an das Holz zu gewährleisten. Weiterhin wurden die Isolate nicht mehr in PC-Bouillon sondern auf CASO-Agar kul-

tiviert, um ein Überwachsen der eigentlichen Isolate durch Kontaminanten zu vermeiden. Diese Maßnahmen haben sich bewährt, denn ein großer Anteil der gewählten Mikrokolonien konnte erfolgreich auf den Agar überführt werden und Kontaminationen traten nur noch auf, wenn die Kolonien auf dem Stempel sehr dicht lagen, so daß es schwierig war, eine einzelne Kolonie abzunehmen.

Die Identifizierung der Mikrokolonien ergab, daß nach 20 Stunden Inkubation auf dem Stempel nur *Staphylococcus equorum* nachzuweisen war. Staphylokokken wachsen in der Regel sehr schnell und haben somit schon nach 20 Stunden einen ausreichend großen Koloniedurchmesser. Die Ergebnisse der Identifizierungen nach 30 und 48 Stunden sind in Abb. 10 dargestellt. Nach 30 Stunden sind neben *St. equorum* auch *B. linens*, *Arthrobacter casei* und Corynebakterien detektierbar. Der Anteil von *St. equorum* ist auf ca. 70 % gesunken und beträgt nach 48 Stunden nur noch ca. 20 %. Alle anderen Spezies hingegen sind stärker vertreten. Diese Arten haben langsamere Wachstumsgeschwindigkeiten und benötigen längere Zeit, um Kolonien mit für die Messung ausreichender Größe zu bilden. Je später also der Analysezeitpunkt liegt, desto mehr Kolonien haben einen genügend großen Durchmesser erreicht und können gemessen werden. Der Stempelzeitpunkt hat hier bedeutenden Einfluß auf das Ergebnis der Populationsanalyse. Die nach 48 Stunden erfaßten Verhältnisse entsprechen ziemlich genau der tatsächlichen Zusammensetzung, ausgenommen sind nur Spezies, die ein ausgesprochen langsames Wachstum zeigen und Organismen, die aufgrund geringer Zellzahlen gegen Ende der Analyse von den übrigen Arten überwachsen wurden. Ein detailliertes Bild dieser Arten kann, wenn sie verhältnismäßig schnell wachsen, zu frühen Zeitpunkten ermittelt werden, wenn noch mit niedrigeren Verdünnungsstufen gearbeitet wird. Zur exakten Erfassung der Zusammensetzung der Population müssen folglich die gemessenen Spektren pro Stempelzeitpunkt in Keimzahlen umgerechnet und später die Keimzahlen der einzelnen Arten zueinander ins Verhältnis gesetzt werden. Da jedoch in dieser Untersuchung alle nach 20 Stunden detektierten Spezies auch nach 48 Stunden Inkubation in der höheren Verdünnungsstufe der Käseschmiere noch vorhanden waren, ist dieser Zeitpunkt repräsentativ für die gesamte Analyse.

Mit FTIR-Mikrospektroskopie wurden *St. equorum*, *B. linens*, *C. ammoniagenes* und *C. casei* identifiziert und zum überwiegenden Teil konnten diese Ergebnisse mit FTIR-Spektroskopie bestätigt werden. Eine Ausnahme bildeten die Arten der Gattung *Corynebacterium*, wo aus den unter 1.3 genannten Gründen keine gute Differenzierung zwischen den Spezies möglich war. Zudem wurden einige der Isolate mit FTIR-Spektroskopie als *C. glutamicum* identifiziert. Da für diese Spezies jedoch in der Datenbank der Mikrospektroskopie keine Referenzen abgelegt waren, konnte sie demnach auch nicht erfaßt werden. Alles in allem gesehen sind die Ergebnisse mit FTIR-Mikrospektroskopie, im Gegensatz zu ihrer rein statistischen Auswertung, jedoch unter Praxisbedingungen sehr gut und bis auf eine Ausnahme äquivalent zu denen der FTIR-Spektroskopie.

Populationsanalyse von Appenzeller Käse

Nach der Erweiterung der Datenbank für Coryneforme auf 85 Spektren wurde eine weitere Analyse eines Käse-Reifungskonsortiums, diesmal von Appenzeller Käse, durchgeführt. Die Probenaufbereitung und der Versuchsaufbau waren gleich der vorhergehenden Analyse, jedoch wurden die Identifizierungen stichprobenartig über 16S rDNA-Sequenzanalyse der isolierten Kulturen überprüft. Die ermittelte Gesamtkeimzahl lag bei $7,3 \times 10^9$ KbE/g, das entspricht bei einer Gesamteinwaage von 51 cm² einer Keimzahl von $1,4 \times 10^8$ /cm². Nach 20 Stunden Inkubation wurden 298 Kolonien, nach 30 Stunden 379 Kolonien und nach 48 Stunden 401 Kolonien gemessen und identifiziert.

Die Population nach 20 Stunden stellt sich wie in Abb. 11 dar. 55,6 % sind *St. equorum*, 25,2 % *Enterococcus faecalis*, 16,8 % *C. casei* und 2,4 % andere Staphylokokken. Alle detektierten Organismen haben eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit, liegen jedoch in verhältnismäßig geringen Zellzahlen vor, da hier die Platte mit der Verdünnung von 10^{-4} für die Analyse herangezogen wurde. Platten mit höheren Verdünnungen zeigten nur wenige Mikrokolonien. *E. faecalis*, zugehörig zu den Milchsäurebakterien, wurde durch Sequenzanalyse identifiziert, da er in der Coryneformendatenbank nicht vertreten war und vor der Identifizierung mit FTIR-Spektroskopie die Isolate mikroskopisch nicht vordifferenziert wurden. Die Klassifizierung von *C. casei* wurde ebenfalls mit einer Sequenzanalyse bestätigt, da es mit FTIR-Spektroskopie nur schwer von *C. ammoniagenes* zu differenzieren ist.

Nach 30 Stunden Bebrütung wurden Platten mit einer Verdünnung von 5×10^{-5} untersucht und die Zusammensetzung des Konsortiums hatte sich etwas geändert (Abb. 12). Die Anteile von *St. equorum* und *E. faecalis* sind auf knapp 13 % bzw. knapp 3 % zurückgegangen. *C. casei* macht mittlerweile 75 % der Flora aus und *A. casei* knapp 9 %. *A. casei* wurde wiederum über eine Sequenzierung der DNA klassifiziert, denn er stellt eine erst kürzlich neu beschriebene Spezies dar, die bis zu diesem Zeitpunkt noch keinen Eingang in unsere Bibliothek gefunden hatte.

Nach 48 Stunden Inkubation wurde die Verdünnung von 10^{-6} gestempelt und die Flora setzt sich nun aus fünf verschiedenen Arten zusammen (Abb. 13A). Nach wie vor läßt sich ein geringer Prozentsatz an *St. equorum* nachweisen, *E. faecalis* dagegen ist aufgrund zu geringer Zellzahlen nicht mehr vertreten. *C. casei* macht mit knapp 62 % weiterhin einen Großteil der Population aus und auch *A. casei* ist mit 23 % stark vertreten. Neu hinzugekommen sind *B. linens* mit knapp 2 % und eine Spezies, die auch mit einer Sequenzanalyse bisher nicht identifiziert werden konnte, mit 8 %. Eine Vergrößerung des Bereiches der Subcluster (Abb. 13B) zeigt, daß das Cluster von *C. casei* in mehrere kleinere Untergruppen zergliedert ist, die erst bei etwas höheren Werten fusionieren. Dies deutet darauf hin, daß die Population aus mehreren Stämmen dieser Art zusammengesetzt ist. Diese Annahme wird gestützt von der Ausprägung unterschiedlicher Kolonieförmigkeiten unter den Isolaten und dem schon frühen Auftreten der Art nach erst 20 Stunden Inkubation. Die Topographie der Subcluster indiziert zwischen drei und sechs unterschiedliche Formen von *C. casei* (Abb. 13B), je nachdem wie eng die Grenze der Heterogenität gezogen wird; eine sichere Zuordnung der Cluster zu unterschiedlichen Stämmen kann jedoch nur molekularbiologisch erfolgen.

Insgesamt besteht die Flora des Appenzellers aus vier coryneformen Arten, von denen *C. casei* mit Abstand den größten Anteil ausmacht, einem Milchsäurebakterium, *St. equorum* und einigen anderen Staphylokokken. Eine Darstellung der Identifizierungen jedes Probenahmezeitpunktes zeigt Abb. 14. Die Umrechnung der Identifizierungen pro Stempelzeitpunkt auf die Gesamtkeimzahl (Abb. 15) zeigt, daß die endgültigen Keimzahlen zum großen Teil denen nach 48 Stunden entsprechen und somit dieser Zeitpunkt am aussagekräftigsten ist, da hier mit der höchsten Verdünnung gearbeitet wird und sowohl die langsam als auch die schneller wachsenden Arten erfaßt werden. *E. faecalis* und die Staphylokokken ohne *St. equorum* fallen, die Gesamtflora betrachtet, kaum ins Gewicht.

1.6 Grenzen der Methode

Die Entwicklung von Referenzdatenbanken für drei unterschiedliche Gruppen von Organismen hat gezeigt, daß eine erfolgreiche Identifizierung ganz wesentlich von der Größe der Kolonien und damit vom Wachstum des jeweiligen Stammes abhängt. Wachstumsgeschwindigkeiten innerhalb eines Taxons differieren in der Regel jedoch, so daß eine starke Vereinheitlichung der Methode auf einen Probenahmezeitpunkt nicht immer möglich ist. Ferner ist davon auszugehen, daß Stämme mit hoher Replikationsdauer nicht mehr erfaßt werden können, wenn eine möglichst breite Abdeckung der Organismengruppe in der Datenbank erwünscht ist. Bei einer Spezialisierung auf ausgesuchte Arten oder Stämme jedoch läßt sich die Methode auf die gegebenen Grenzen adaptieren.

Einige Bakterien unter den Coryneformen und Bazillen haben die Eigenart, sich beim Wachstum auf festem Medium in den Agar zu fressen und sich auch mit der Platinöse nur schwer vom Medium lösen zu lassen. Ein Überführen der Kolonien auf den Probenträger ist hier nicht möglich und verschließt diese Organismen einer Analyse mit FTIR-Mikrospektroskopie. Ähnliches gilt für einige Milchsäurebakterien, deren Oberflächenstrukturen ein Adhäsieren der Zellen am ZnSe-Kristall in diesem frühen Wachstumsstadium behindern. Diese Stämme können nur nach längerer Inkubation oder gar nicht gemessen werden.

1.7 Fazit

Unsere Arbeiten haben gezeigt, daß FTIR-Mikrospektroskopie erfolgreich auf die Identifizierung lebensmittelrelevanter Keime angewandt werden kann. Für Hefen, coryneforme Bakterien und Milchsäurebakterien wurden Protokolle für die Probenaufbereitung und Referenzdatenbanken erstellt, deren Leistungsfähigkeit denen der herkömmlichen FTIR-Spektroskopie in nichts nachsteht. Damit ist erstmals eine Methode beschrieben, die eine einfache und schnelle Identifizierung von Mikroorganismen

direkt aus der Probe gestattet, ohne molekularbiologische Kenntnisse zu erfordern. Defizite, die bislang den Identifizierungserfolg einschränken, können entweder durch weiteren Ausbau der Datenbanken oder die Applikation alternativer Auswertelgorithmen, wie hierarchische Klassifizierungen, kompensiert werden.

Populationsanalysen können mit der von uns erarbeiteten Vorgehensweise ohne Schwierigkeit durchgeführt werden, ungeachtet ob mit bekannten oder unbekanntem Konsortien gearbeitet wird, denn auch eine Isolierung bereits gemessener Mikrokolonien ist möglich. Der hohe Automatisierungsgrad der Methode im Hinblick auf Serienmessungen von Kolonien auf einem Probenträger gestattet hier die Generierung großer Datenmengen in äußerst kurzer Zeit. Es empfiehlt sich für die Analyse von Floren jedoch, die Methode und Datenbank auf die jeweilige Anwendung zu optimieren, um möglichst exakte Ergebnisse zu erzielen und die methodenspezifischen Grenzen zu umgehen.

Trotz vergleichbaren Identifizierungserfolges kann FTIR-Mikrospektroskopie nach unseren Erfahrungen kein Ersatz für die herkömmliche FTIR-Spektroskopie sein, da der Arbeitsaufwand für die Analyse reiner Kulturen deutlich höher und damit der Probendurchsatz reduziert ist. Ein Ausbau der Datenbanken auf tausend oder mehr Spektren ist somit nicht sinnvoll. Vielmehr liegen die Vorteile v.a. in der Identifizierung unter Zeitdruck, wenn die Isolierung umgangen werden soll, und bei Populationsanalysen. Aufgrund dessen und der methodischen Grenzen empfiehlt es sich, die Methode nicht zu stark zu generalisieren, sondern auf spezifische Problemstellungen anzuwenden. Bei hoher Spezialisierung können Einschränkungen umgangen und das Potential des Systems voll ausgeschöpft werden.

2. Auswirkungen auf den wissenschaftlich-technischen Fortschritt

2.1. Schnelle Identifizierung von Mikroorganismen

FTIR-Mikrospektroskopie ist das erste chemisch-physikalische Verfahren, mit dem Mikroorganismen ohne vorherige Isolierung und Reinigung identifiziert werden können, was bisher nur mit Einsatz von Gensonden oder Microarrays möglich war. Ausgehend von einer Produkt- oder Umfeldprobe können schnell wachsende Organismen bereits nach 15 Stunden, durchschnittlich wachsende nach ca. 24 Stunden und sehr langsam wachsende nach 48 Stunden gemessen und identifiziert werden. Dies bedeutet im Vergleich zu bisherigen Identifizierungsmethoden, für die reine Kulturen vorliegen müssen, einen Zeitvorteil von mehreren Tagen, der insbesondere bei der Identifizierung pathogener Organismen in Lebensmitteln entscheidend zum Tragen kommen kann. Der hohe Automatisierungsgrad des Systems ermöglicht zudem die Messung hunderter Kolonien in Serie und stellt somit die Ergebnisse auf eine umfangreiche Datenbasis.

Die Entwicklung der Datenbanken für Hefen, coryneforme Bakterien und Milchsäurebakterien hat gezeigt, daß die Methode auf unterschiedliche Taxa angewandt werden kann und vergleichbare Ergebnisse zur herkömmlichen FTIR-Spektroskopie erzielt. Es liegt also nahe, die Anwendung auf weitere Organismengruppen auszuweiten.

2.2. Populationsanalysen mikrobieller Konsortien

Die komplette und detaillierte Aufschlüsselung einer Kultur erfordert die Analyse ggf. hunderter Isolate. Dies bedeutet einen hohen zeitlichen und finanziellen Aufwand, der aufgrund der damit verbundenen Kosten nur in seltenen Fällen in Kauf genommen wird. Mit FTIR-Mikrospektroskopie lassen sich nicht zuletzt wegen des hohen Automatisierungsgrades derartige Analysen nunmehr in einem Bruchteil der bislang benötigten Zeit bearbeiten.

Die Methode kann an verschiedensten Anwendungen adaptiert werden. Durch Integration z.B. technologisch wichtiger Mikroorganismen in die Referenzdatenbanken kann eine Eichung auf ausgesuchte Konsortien vorgenommen werden, die dann leicht und ohne großen Aufwand in regelmäßigem Turnus kontrolliert werden können. Auch die Entwicklung einer Kultur im Zeitverlauf kann damit verfolgt werden.

Alternativ kann auch nach dem Vorhandensein eines bestimmten Keims in der großen Masse gefahndet werden, der mit herkömmlichen Methoden nur schwer erfaßt werden könnte. Ist sein Spektrum in der Bibliothek abgelegt, wird er identifiziert, auch wenn er nur einen sehr kleinen Anteil der vorhandenen Organismen stellt. Dies wird v.a. die Analyse von Kontaminationsrouten deutlich vereinfachen.

Auch ohne Nutzung einer speziellen Datenbank können Populationsanalysen durchgeführt werden, beispielsweise wenn ein schneller Einblick in die Zusammensetzung einer unbekanntes Flora oder der vorhandenen Mikroorganismen einer Probe gesucht ist. Jeder Organismus, der unter den gegebenen Umständen Kolonien bildet wird bei der Analyse detektiert und mit seinem Spektrum dokumentiert. Die Darstellung der Distanzmaße der Spektren untereinander in der Clusteranalyse sortiert die Spektren zu Gruppen uniformer Keime, anhand derer eine Abschätzung der Komplexität der Flora vorgenommen und einige wenige Keime für weitere Analysen ausgewählt werden können.

3. Wirtschaftlicher Nutzen und industrielle Anwendungen in kleinen und mittleren Unternehmen

Die preiswerte, schnelle und zudem zuverlässige Identifizierung von Mikroorganismen kann einen wichtigen Beitrag zu einer auch wirtschaftlich sinnvollen Qualitätssicherung im Lebensmittelunternehmen leisten. Denn obwohl durch Hygienekonzepte viele mikrobielle Untersuchungen im Betrieb vorgeschrieben sind, könnte durch erweiterte Kontrollen finanziellen Einbußen, verursacht beispielsweise durch Fehlproduktion, vorgebeugt werden.

Die von uns vorgestellte Methode hilft, in ihrer Zusammensetzung nicht bekannte Floren verhältnismäßig einfach und schnell zu analysieren. Wo sonst mit hohem Aufwand große Zahlen an Organismen isoliert und dann mit teuren Kits über Tage oder gar Wochen identifiziert werden mußten, kann mit Einsatz der Mikrospektroskopie viel Zeit und Geld gespart werden. Dies kann auf technologisch wichtige Konsortien, wie beispielsweise die Reifungsfloren bei Käse, aber auch auf die Hausflora, Keime im Abwasser oder ähnliches angewandt werden. Ein Unternehmen hat somit ein wichtiges Instrument zur Kontrolle des mikrobiologischen Status der Produktionsstätte an der Hand.

Durch Monitoring technologisch wichtiger Konsortien kann zudem die gleichbleibende Zusammensetzung dieser Kulturen und damit eine stabile Produktqualität gewährleistet werden. Bei Fehlproduktionen kann eine Analyse der Flora die Klärung der Ursache und damit die Einschätzung des Handlungsbedarfs erleichtern. Hat eine Verschiebung der Flora stattgefunden, muß die Kultur überprüft werden, sind Kontaminationen aufgetreten, kann die Analyse der Kontaminationsroute mit FTIR-Mikrospektroskopie vereinfacht werden.

Bei der Entwicklung neuer Starter oder Kulturen kann mit dem vorgestellten System der Erfolg der Entwicklung in der praktischen Anwendung auf einfache Weise kontrolliert werden. Die Analyse der eingesetzten Flora im Zeitverlauf zeigt auf, ob sich eine neu entwickelte Kultur durchsetzen und ihren technologischen Zweck erfüllen kann. Dabei wird auch aufgeklärt, ob und wenn ja welche Organismen der Hausflora eines Unternehmens in die Reifung eingreifen.

IV. Publikationen und Vorträge

1. Publikationen

Wenning, M., Seiler, H. und Scherer, S. (2002). Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy, a Novel and Rapid Tool for Identification of Yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, S 4717-4721.

Scherer S. und Seiler H. (2002). Computergestütztes Identifizierungssystem (FTIR-Technologie) für Starterkulturen und Verderbsorganismen in der Lebensmittelindustrie. Dokumentation der 60. FEI-Diskussionstagung 2002 und der Könler FoodTec-Tage, S. 49-54.

2. Vorträge

Wenning, M.; Seiler, H. und Scherer, S.: Schnelle Identifizierung von Reifungskulturen durch FTIR-Mikrospektroskopie. Deutsche Gesellschaft für Milchwissenschaft, Milchkonferenz. 20. und 21. September 2001, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Berlin.

Wenning, M.; Seiler, H. und Scherer, S.: Schnelle Identifizierung von lebensmittel-relevanten Hefen und Bakterien durch FTIR-Mikroskopie. Weihenstephaner Milchwirtschaftliche Herbsttagung 10.-11. Oktober 2002, Wissenschaftszentrum Weihenstephan.

Wenning, M.; Seiler, H. und Scherer, S.: Identification of food-related microorganisms by FT-IR microspectroscopy. Workshop "FTIR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostic" 24.-25. Oktober 2002, Robert Koch-Institut Berlin.

Wenning, M.; Seiler, H. und Scherer, S.: Schnelle Identifizierung von lebensmittelrelevanten Mikroorganismen durch FTIR-Spektroskopie. 5. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie der VAAM und DGHM, 8.-10. Mai 2003, Kultur- und Bildungszentrum Kloster Seon/Chiemsee.

Wenning, M. und Scherer, S.: Schnelle Populationsanalyse von Reifungskonsortien mit FTIR-Mikrospektroskopie. Deutsche Gesellschaft für Milchwissenschaft, Milchkonferenz. 18. und 19. September 2003, Universität Osnabrück.

Dieses Vorhaben wurde aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung (Bundesministerium für Wirtschaft und Arbeit / AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert. Projekt-Nr.: AiF-FV 12634 N

Freising, 29.08.2003

Ort, Datum

Unterschrift des Leiters und Stempelabdruck der
Forschungsstelle