

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
LEHRSTUHL FÜR MIKROBIELLE ÖKOLOGIE

Identifizierung von Hefen durch Fourier-transform Infrarotspektroskopie und künstliche neuronale Netze

Nicole Ramona Büchl

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 Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. U. M. Kulozik

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer
2. Univ.-Prof. Dr. R. F. Vogel

Die Dissertation wurde am 12.03.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 04.05.2009 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Siegfried Scherer am Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie am Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Technische Universität München angefertigt.

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer für die Überlassung des Themas, für die persönliche Betreuung und für die Unterstützung mit wissenschaftlichen Ideen und Ratschlägen.

Prof. Dr. Rudi Vogel (Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie) möchte ich für die freundliche Übernahme des Koreferates danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Mareike Wenning für die wertvollen wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen sowie für ihre unermüdliche Geduld alle Fragen und Schwierigkeiten zu klären und dabei stets positiven Optimismus zu verbreiten. Ich möchte mich auch für die kritische Durchsicht dieser Arbeit vielfach bei ihr bedanken.

Bei meinen Kooperationspartnern Dr. Henriette Mietke-Hofmann, Dr. Hans-Peter Seidl und apl. Prof. Dr. Gerhard Haase möchte ich mich herzlich für die zur Verfügung gestellten Stämme und die vielen neuen Einblicke in die Bereiche der Futtermittelmikrobiologie und klinischen Diagnostik bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Mathias Hutzler vom Lehrstuhl für Brauereitechnologie II, der die Stammanalyse mittels dHPLC ermöglicht hat.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Herbert Seiler für die hilfreichen fachlichen Diskussionen und Anregungen bedanken. Allen FTIR-Arbeitsgruppenmitgliedern, besonders Lisa Rieder und Andreas Bischof, möchte ich ganz herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und das freundschaftliche Arbeitsklima im Labor danken.

Allen Kollegen und Kolleginnen der Abteilung Mikrobiologie danke ich herzlich für die familiäre Atmosphäre, die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während der gesamten Zeit meiner Ausbildung in jeglicher Form unterstützten und stets an mich geglaubt haben.

Meinem Freund Christian Richter möchte von Herzen für seine unermüdliche Unterstützung, insbesondere aber für das geduldige Zuhören und die aufmunternden Worte zu all meinen Problemen und Problemchen danken.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	14
1.1 Hefen	14
1.1.1 Taxonomie	14
1.1.2 Vorkommen und Bedeutung	17
1.2 Methoden zur Identifizierung von Hefen	19
1.2.1 FTIR-Spektroskopie	19
1.2.2 Künstliche neuronale Netze	22
1.2.3 Molekularbiologische Methoden	24
1.3 Zielsetzung	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Referenzstämme	26
2.1.1 Stammhaltung	26
2.1.2 Stammlagerung	27
2.2 FTIR-Spektroskopie	28
2.2.1 Probenvorbereitung und Messung	28
2.2.2 Auswertung und Identifizierung der Spektren	29
2.2.3 Erweiterung der Datenbank zur Identifizierung klinisch relevanter Hefearten	30
2.2.4 Validierung der Datenbank zur Identifizierung klinisch relevanter Hefearten	30
2.3 Training des KNN	31
2.3.1 Zusammenstellung von Datensätzen	31
2.3.2 Trainingssoftware	31
2.4 Biochemische und molekularbiologische Methoden	33
2.4.1 Methoden zur Artidentifizierung	33
2.4.2 Methoden zur Stammdifferenzierung	35
3 Ergebnisse	38
3.1 Etablierung einer Datenbank zur Identifizierung klinisch relevanter Hefearten	38
3.1.1 Entwicklung und Bewertung der Datenbank	38

3.1.2	Vergleich mit API ID32C	44
3.2	Identifizierung der lebensmittelrelevanten Hefegattungen <i>Issatchenkia</i> und <i>Pichia</i>	47
3.2.1	26S rDNS-Sequenzierung	48
3.2.2	Entwicklung und Bewertung des KNN	51
3.3	Differenzierung von ubiquitären und probiotischen <i>S. cerevisiae</i> aus Futtermitteln	56
3.3.1	Stammtypisierung mittels dHPLC	59
3.3.2	Stammtypisierung mittels δ -PCR	61
3.3.3	Entwicklung und Bewertung des KNN	63
4	Diskussion	69
4.1	Etablierung einer Datenbank zur Identifizierung klinisch relevanter Hefearten	69
4.1.1	Entwicklung und Bewertung	69
4.1.2	Identifizierungsvergleich zwischen FTIR-Spektroskopie und API ID32C	71
4.1.3	Bewertung der Einsatzmöglichkeit der Datenbank in der klinischen Diagnostik	74
4.2	Identifizierung der lebensmittelrelevanten Hefegattungen <i>Issatchenkia</i> und <i>Pichia</i>	76
4.2.1	Identifizierung der Referenzstämme	76
4.2.2	Entwicklung und Bewertung des KNN	80
4.2.3	Beurteilung des KNN für den Einsatz in der Lebensmittelindustrie	82
4.3	Differenzierung von ubiquitären und probiotischen <i>S. cerevisiae</i> aus Futtermitteln	83
4.3.1	Stammtypisierung mittels dHPLC und δ -PCR	83
4.3.2	Entwicklung und Bewertung des KNN	85
4.3.3	Einsatz des KNN zur Stammtypisierung im Futtermittelbereich	88
4.4	Ausblick	89
	Literatur	90
	A Stammliste der klinischen Isolate	104
	B Stammliste der Gattungen <i>Issatchenkia</i> und <i>Pichia</i>	112
	C Stammliste der Spezies <i>S. cerevisiae</i>	127
	D dHPLC-Peakprofile ubiquitärer <i>S. cerevisiae</i>	135

Abbildungsverzeichnis

1.1	Spektrenverlauf bei Hefen	21
1.2	Struktureller Aufbau eines KNN	23
1.3	Ribosomale Genstruktur bei Hefen	24
2.1	Lage der IGS-Primer im ribosomalen Genom	36
3.1	HCA von <i>C. africana</i> -, <i>C. albicans</i> - und <i>C. dubliniensis</i> -Stämmen . . .	40
3.2	Phylogenetischer Baum nah verwandter <i>Issatchenkia</i> - und <i>Pichia</i> - Arten	49
3.3	HCA nah verwandter <i>Issatchenkia</i> - und <i>Pichia</i> -Arten	50
3.4	Struktureller Aufbau des <i>Issatchenkia-Pichia</i> -KNN	54
3.5	HCA probiotischer und ubiquitärer <i>S. cerevisiae</i>	57
3.6	HCA zur Auswahl repräsentativer probiotischer Isolate	58
3.7	DHPLC-Peakprofile probiotischer <i>S. cerevisiae</i>	60
3.8	Fragmentmuster der δ -PCR für probiotische und ubiquitäre <i>S. ce</i> - <i>revisiae</i>	62
3.9	Struktureller Aufbau des <i>S. cerevisiae</i> -KNN mit drei Ebenen	64
3.10	Struktureller Aufbau des <i>S. cerevisiae</i> -KNN mit zwei Ebenen	65
3.11	HCA probiotischer <i>S. cerevisiae</i>	66
3.12	Interne und externe Validierung der beiden Varianten des <i>S. cere</i> - <i>visiae</i> -KNN	67
3.13	Externe Validierung der zweiten Ebene der zweiten <i>S. cerevisiae</i> - KNN-Variante	68
4.1	HCA von <i>Cr. neoformans</i> -Stämmen	72
4.2	Ergebnisse der Identifizierung mit API ID32C und FTIR-Datenbank	73
4.3	Artauswahl für den Vergleich zwischen HCA und phylogenetischen Berechnungen	78
4.4	HCA nah verwandter <i>Issatchenkia</i> - und <i>Pichia</i> -Arten	79

Tabellenverzeichnis

1.1	Überblick über die Hefegattungen	16
1.2	Absorption von Zellbestandteilen	20
2.1	Parametergrenzwerte für Qualitätstest	29
2.2	Datensätze für das Training des KNN	31
2.3	Übersicht über die gewählten Parameter zur Datenvorbehandlung	32
3.1	Stammübersicht über die klinisch relevanten Arten	39
3.2	Aufteilung der klinischen Stämme für die Datenbank	42
3.3	Validierung der Datenbank für klinisch relevante Hefen	43
3.4	Stammübersicht für die Identifizierung mit API ID32C	44
3.5	Identifizierungsergebnisse mit API ID32C und Datenbank	45
3.6	Übersicht über die sequenzierten <i>Issatchenkia</i> - und <i>Pichia</i> -Stämme .	48
3.7	Aufteilung der <i>Issatchenkia</i> - und <i>Pichia</i> -Stämme für das KNN . . .	52
3.8	Interne Validierung des <i>Issatchenkia-Pichia</i> -KNN	55
3.9	Externe Validierung des <i>Issatchenkia-Pichia</i> -KNN	55
3.10	Stammübersicht zur molekularbiologischen Stammtypisierung . .	59
3.11	Aufteilung der <i>S. cerevisiae</i> -Stämme für das KNN	63
3.12	Externe Validierung der <i>S. cerevisiae</i> -KNN-Variante 2	68

Abkürzungsverzeichnis

AFLP	<i>amplified fragment length polymorphism</i>
ARDRA	<i>amplified ribosomal DNA restriction analysis</i>
bp	<i>base pairs</i>
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Niederlande
CNCM	Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Frankreich
dHPLC	<i>denaturing high performance liquid chromatography</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EtBr	Ethidiumbromid
FTIR	Fourier-transform Infrarot
HCA	Hierarchische Clusteranalyse
IGS	<i>intergenic spacer</i>
ITS	<i>internal transcribed</i>
KBE	Kolonie bildende Einheit
KNN	künstliches neuronales Netz
MALDI-TOF-MS	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectroscopy</i>
MilliQ	mittels Millipore-Anlage gereinigtes Wasser
MUCL	Industrial Fungi and Yeasts Collection, Belgien
NCYC	National Collection of Yeast Cultures, England
NT	Neo-Typstamm
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFGE	<i>pulsed field gel electrophoresis</i>

RAPD	<i>randomly amplified polymorphic desoxyribonucleinacid</i>
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
RNS	Ribonukleinsäure
T	Typstamm
WSYC	Weihenstephan Yeast Collection
ZnSe	Zink-Selenid

Gattungsnamen

<i>C.</i>	<i>Candida</i>
<i>Cl.</i>	<i>Clavispora</i>
<i>Cr.</i>	<i>Cryptococcus</i>
<i>G.</i>	<i>Geotrichum</i>
<i>I.</i>	<i>Issatchenkia</i>
<i>K.</i>	<i>Kluyveromyces</i>
<i>P.</i>	<i>Pichia</i>
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>T.</i>	<i>Trichosporon</i>
<i>Y.</i>	<i>Yarrowia</i>
<i>D.</i>	<i>Debaryomyces</i>

Zusammenfassung

Die Fourier-transform Infrarot (FTIR)-Spektroskopie wird bereits seit einigen Jahren erfolgreich zur Identifizierung von Mikroorganismen in verschiedenen Bereichen eingesetzt. Einen Vorteil dieser physikalischen Methode stellen flexibel anpassbare Referenzdatenbanken dar, die einen optimalen Einsatz in unterschiedlichen Bereichen zulassen. Weiterhin ermöglicht eine Kombination der FTIR-Spektroskopie mit künstlichen neuronalen Netzen (KNN) das Lösen komplexerer Klassifizierungsprobleme, da mit Hilfe dieser mathematischen Datenverarbeitung detailliertere Informationen aus den Spektren extrahiert werden können. So wird beispielsweise die Unterscheidung sehr nah verwandter und damit phänotypisch ähnlicher Arten bis hin zur Differenzierung verschiedener Stämme einer Art ermöglicht.

Die Zielsetzung dieser Arbeit beinhaltete die Etablierung eines zuverlässigen Systems zur Identifizierung von Hefen, welches erstmals auf der Anwendung von FTIR-Spektroskopie in Kombination mit künstlichen neuronalen Netzen basiert. Durch die Überarbeitung und Erweiterung der bestehenden spektralen Referenzdatenbank zur Identifizierung von Hefen wurde diese für den Einsatz im Lebensmittelbereich verbessert und konnte darüberhinaus für den Bereich der Futtermittelindustrie sowie den klinischen Bereich neu erschlossen werden.

Für eine erfolgreiche Anwendung der bestehenden Datenbank zur Identifizierung von Hefen in der klinischen Diagnostik war eine Erweiterung um Spektren klinischer Isolate erforderlich. Durch die Kooperation mit zwei klinischen Untersuchungslaboratorien standen hierzu 210 Stämme von insgesamt 30 klinisch relevanten Arten zu Verfügung. Zur Ergänzung der Datenbank wurden die Spektren von 107 dieser Stämme verwendet. Die verbleibenden 103 Stämme wurden, repräsentiert durch 538 Spektren, für eine erste Validierung der Datenbank genutzt. Diese resultierte in einer korrekten Identifizierungsquote von 87,4 %, wobei die Spektren der vier neu ergänzten Arten *C. africana*, *Cr. neoformans*, *Cr. terreus* und *Cr. uniguttulatus* zu 100 % richtig identifiziert wurden. Ebenso wurden alle Spektren acht weiterer Arten, die bereits zuvor in der Datenbank vertreten waren, richtig identifiziert.

Weiterhin erfolgte die Entwicklung eines KNN zur Differenzierung von nah verwandten Arten der Gattungen *Issatchenkia* und *Pichia*, die häufig in der Lebens- und Futtermittelindustrie sowohl als Schad- als auch Nutzkulturen in Erscheinung treten. Das System umfasst die 16 häufigsten *Pichia*-Arten

sowie alle fünf beschriebenen *Issatchenkia*-Arten. Zur Entwicklung des Systems wurden 237 Referenzstämme, isoliert aus unterschiedlichsten Habitaten, genutzt, wobei die Identität eines Großteils dieser Stämme mittels 26S rDNS-Sequenzierung überprüft wurde. Das KNN beinhaltet 10 einzelne Subnetze, die auf vier aufeinanderfolgenden Ebenen zu einem Netz verbunden sind. Die interne Validierung des Systems mit Spektren der Referenzstämme, die nicht im Training des Systems enthalten waren, ergab eine Quote von 99,2% korrekten Identifizierungen. Um die Genauigkeit und Funktionsfähigkeit des KNN in der Praxis zu testen, erfolgte eine externe Validierung mit 1 608 Spektren von 179 Stämmen, deren Ergebnis ein Anteil von 98,6% korrekt identifizierten Spektren war.

Zur Identifizierung und Klassifizierung von probiotischen und ubiquitären *S. cerevisiae*-Stämmen wurde ein KNN etabliert, das alle fünf derzeit in der Europäischen Union zugelassenen probiotischen Futtermittelzusätze sowie ubiquitäre Stämme aus unterschiedlichen Habitaten umfasst. Zur Entwicklung des KNN wurden 108 Referenzisolate verwendet. Zunächst wurden zwei molekularbiologische Methoden, δ -PCR und dHPLC, für eine Differenzierung der Referenzisolate angewandt. Der Einsatz dieser beiden äußerst sensitiven Methoden ermöglichte zudem eine Unterscheidung zwischen den probiotischen Futtermittelzusätzen. Die externe Validierung des Systems mit 965 Spektren von 65 probiotischen und ubiquitären *S. cerevisiae*-Isolaten ergab 98,2% korrekte Zuordnungen zur richtigen Klasse probiotischer bzw. ubiquitärer *S. cerevisiae*, wobei die korrekte Differenzierungsquote innerhalb der probiotischen Isolate bei 94,9% lag.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Anwendung der FTIR-Spektroskopie in Kombination mit KNN ein hohes Potential zur Identifizierung und Differenzierung von Hefen birgt. Es konnten zuverlässige Systeme zur eindeutigen Identifizierung der im Lebens-, Futtermittel- und klinischen Bereich vorkommenden Hefearten etabliert werden. Darüber hinaus wurde die Methode erstmals für den Bereich der Futtermittelindustrie erschlossen und somit die Differenzierung zwischen probiotischen und ubiquitären *S. cerevisiae*-Stämmen ermöglicht.

Summary

During the last couple of years Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy has developed into a valuable tool for the rapid identification of microorganisms in different fields of application. The identification can be performed by using large and well-designed databases with reference spectra. Advantageously, these databases can be modulated to any kind of interest providing an ideal implementation. However, to solve complex classification problems associated with closely related groups, FTIR spectroscopy has been combined with artificial neural network (ANN) analysis of infrared spectra. This effective dataprocessing method enables the precise extraction of subtle discriminant information from the spectra. Thus, an accurate differentiation at the species and even at the subspecies level is feasible.

The aim of the presented work was the establishment of a reliable identification system for yeasts based on FTIR spectroscopy and ANN. The readaptation of the existing reference database provided an improved application in food microbiology. Furthermore, this approach was newly implemented for usage in clinical diagnostics and quality control of animal feeding stuff.

The development of the existing reference database for application in clinical diagnostics required an enlargement of FTIR spectra from clinical isolates. A total of 210 strains representing 30 clinically relevant species were obtained from two clinical institutes. Spectra of 107 strains were used to enlarge the database. A validation of the system was performed using 538 spectra of the remaining 103 strains. This validation resulted in 87.4 % correct identification including 100 % correct identification of 12 species. Remarkably, also four newly supplemented species – *C. africana*, *Cr. neoformans*, *Cr. terreus* and *Cr. uniguttulatus* – were identified correctly.

A reliable identification system for closely related species of the genera *Issatchenkia* and *Pichia* was established using ANN-based FTIR spectroscopy. The system includes 16 common *Pichia* species and all five known *Issatchenkia* species. A total of 237 strains isolated from a large variety of habitats were used as reference strains to generate an ANN identification system. This system consists of 10 single subnets connected to an ANN with four consecutive levels. An internal validation of the system, using unknown spectra of each reference strain, yielded an identification rate of 99.2 %. To evaluate the performance of the ANN in routine diagnostics, 1,608 spectra of 179 strains unknown to the ANN were used as a test dataset in an external validation.

An overall identification rate of 98.6 %, including a success rate of 100 % for two common species – *P. anomala* and *P. membranifaciens* – was achieved.

For the differentiation of environmental from probiotic *S. cerevisiae* strains another classification system using FTIR spectroscopy combined with ANN was generated. The system comprises five authorised feed additive strains plus environmental strains isolated from a great variety of habitats. A total of 108 isolates were used as reference strains to create an ANN. For probiotic isolates dHPLC-analysis and δ -PCR, which are characterised by high sensitivity and reproducibility, were successfully used as typing methods. The performance of the ANN was tested in two validation steps. First, an internal validation of the system using unknown spectra of each reference strain yielded a classification rate of 99.1 %. For the following external validation a test data set comprising 965 spectra of 65 probiotic and environmental *S. cerevisiae* isolates unknown to the ANN was used. This validation resulted in a classification rate of 98.2 % for the differentiation between probiotic and environmental isolates and 94.9 % for the discrimination of different probiotic feed additives.

The presented work demonstrates the high potential of FTIR spectroscopy combined with ANN analysis for the identification of yeasts at the species and even at the subspecies level. Thus, three reliable identification systems could be established, which were applied successfully in food microbiology, clinical diagnostics, and – for the first time – in feed microbiology. Furthermore, differentiation between probiotic and environmental *S. cerevisiae* strains could be realised due to the high sensitivity of the presented approach.

1 Einleitung

Die Identifizierung von Mikroorganismen und insbesondere von Hefen spielt in vielen Bereichen der Biowissenschaften sowie in verschiedenen Industriezweigen eine wichtige Rolle. Das Vorhandensein von Hefen hat eine ambivalente Wirkung, da sowohl positive als auch negative Effekte auftreten können. Die exakte Benennung der vorliegenden Hefenspezies ist daher von entscheidender Bedeutung. Wichtige Bereiche stellen in diesem Zusammenhang die Qualitätssicherung und -beurteilung von Produkten der Lebens- und Futtermittelindustrie, aber auch die klinische Diagnostik dar. Die Anforderungen an die zur Verfügung stehenden Identifizierungssysteme sind dementsprechend hoch. Die Forderung nach schnellen und verlässlichen Techniken, die einfach in der Anwendung sind und eine immer genauere Differenzierung bis hin zur Stammebene ermöglichen, stellt für den Bereich der Hefenidentifizierung eine große Herausforderung dar. Aufgrund der sehr hohen und stetig wachsenden Artenvielfalt, die mit großer phänotypischer Varianz verbunden ist, erweist sich der Einsatz der vielfach angewandten biochemischen und physiologischen Testsysteme häufig als problematisch und nicht ausreichend sensitiv. Im Gegensatz dazu zeichnet sich die Anwendung von FTIR-Spektroskopie in Kombination mit KNN durch ein besonders hohes Identifizierungspotential aus, welches sich gerade zur Unterscheidung von nah verwandten Arten und Stämmen der gleichen Art eignet.

1.1 Hefen

1.1.1 Taxonomie

Hefen sind definiert als einzellige Pilze mit einem durchschnittlichen Zelldurchmesser von 10 μm , deren vegetatives Wachstum gekennzeichnet ist durch Knospung (*budding*) oder seltener durch Zellteilung (*fission*), die für die Gattung *Schizosaccharomyces* charakteristisch ist [7, 45]. Im Zuge des vegetativen Wachstums kann es zur Bildung von Pseudohyphen oder Hyphen kommen. Ein weiteres Merkmal stellt die Ausbildung sexueller Stadien ohne Fruchtkörperbildung dar [62].

Grundsätzlich lassen sich Hefen in die Abteilung der Ascomyceten (lat.: *Ascomycota*) und der Basidiomyceten (lat.: *Basidiomycota*) einteilen, deren Namen

jeweils aus der Bildung der entsprechenden Asco- bzw. Basidiosporen resultiert. Die größere Gruppe der Ascomyceten umfasst die drei Klassen Archiascomycetes, Euascomycetes und Hemiascomycetes [7]. Die Gruppe der Basidiomyceten wird ebenfalls in drei Klassen unterteilt: Ustilaginomycetes, Urediniomycetes und Hymenomycetes [34]. Die Einteilung der Klassen basiert auf Analysen der Septenmorphologie, der Zellwand sowie der ribosomalen DNS. Beide Gruppen können unter dem Begriff Fungi Perfecti zusammengefasst werden, da sie sich durch die Fähigkeit der Bildung sexueller Stadien, den Asco- bzw. Basidiosporen, von den sich ausschließlich durch asexuelle Sprossung und Konidienbildung vermehrenden Fungi Imperfecti (lat.: *Deuteromycota*) unterscheiden.

Viele Hefearten sind allerdings befähigt sowohl sexuelle als auch asexuelle Stadien auszubilden. Von diesen Arten sind daher eine teleomorphe (geschlechtliche) und eine anamorphe (ungeschlechtliche) Form beschrieben. So wird beispielsweise die Spezies *Issatchenkia orientalis* nach ihrer teleomorphen Form bezeichnet, wohingegen die anamorphe Form *Candida krusei* lautet. Beide Formen der Benennung werden in der klassischen Taxonomie anerkannt, ihre Anwendung ist häufig an unterschiedliche Bereiche der Mikrobiologie gekoppelt. So wird im Lebensmittelbereich vorwiegend die teleomorphe Namensgebung verwendet, während im klinischen Bereich die anamorphen Bezeichnungen bevorzugt werden. In Tabelle 1.1 nach Spencer & Spencer [107] ist ein Überblick über die Hefegattungen der drei Gruppen der Ascomyceten, Basidiomyceten und Fungi Imperfecti gegeben.

Die Taxonomie der Hefen lässt sich in unterschiedliche Perioden unterteilen, die auf neu vorgestellten technologischen und wissenschaftlichen Entwicklungen basieren. Bis etwa 1960 konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Charakterisierung der Zellmorphologie, Vergleichsanalysen der Nährstoffumsetzung einer limitierten Zahl unterschiedlicher Kohlen- und Stickstoffquellen, sowie der genetischen Analyse der sexuellen Vermehrung [13]. Mit Einführung der Elektronenmikroskopie in den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts wurde die morphologische Charakterisierung von Hefen deutlich verbessert. So wurden Unterschiede des Zellwandaufbaus zwischen Asco- und Basidiomyceten erkennbar und auch die Analyse der Septenstruktur wurde ermöglicht. Taxonomische Untersuchungen umfassten in dieser Zeit biochemische Analysen der Zellwand, der Cytochrome oder der Fettsäurezusammensetzung [13].

Tabelle 1.1: Gattungsüberblick über die Phyla Asco- und Basidiomycota sowie der Deuteromycota nach Spencer & Spencer [107].

Ascomycetes		
<i>Ambrosiozyma</i>	<i>Arthroascus</i>	<i>Citeromyces</i>
<i>Clavispora</i>	<i>Coccidiascus</i>	<i>Cyniclomyces</i>
<i>Debaryomyces</i>	<i>Dekkera</i>	<i>Guilliermondella</i>
<i>Hanseniaspora</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Issatchenkia</i>
<i>Kluyveromyces</i>	<i>Lipomyces</i>	<i>Lodderomyces</i>
<i>Metschnikowia</i>	<i>Nadsonia</i>	<i>Nematospora</i>
<i>Pachysolen</i>	<i>Pachytichospora</i>	<i>Pichia</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Schwanniomycetes</i>
<i>Sporopachydermia</i>	<i>Stephanoascus</i>	<i>Torulaspora</i>
<i>Wickerhamia</i>	<i>Wickerhamiella</i>	<i>Wingea</i>
<i>Zygosaccharomyces</i>		
Basidiomycetes		
<i>Chionosphaera</i>	<i>Fibulobasidium</i>	<i>Filobasidiella</i>
<i>Filobasidium</i>	<i>Holtermannia</i>	<i>Leucosporidium</i>
<i>Rhodospordium</i>	<i>Sirobasidium</i>	<i>Sporidiobolus</i>
<i>Tremella</i>	<i>(Cr. neoformans)</i>	
Deuteromycetes		
<i>Aciculoconidium</i>	<i>Brettanomyces</i>	<i>Bullera</i>
<i>Candida</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Kloeckera</i>
<i>Malassezia</i>	<i>Oosporidium</i>	<i>Phaffia</i>
<i>Rhodotorula</i>	<i>Sarcinosporon</i>	<i>Schizoblastosporion</i>
<i>Sporobolomyces</i>	<i>Sterigmatomyces</i>	<i>Sympodiomyces</i>
<i>Trichosporon</i>	<i>Trigonopsis</i>	

Durch die Einführung vergleichender DNS-Analysen Ende der siebziger Jahre wurden Berechnungen der phylogenetischen Distanz zwischen unterschiedlichen Taxa ermöglicht. Diese Berechnungen zeigten, dass nicht alle systematischen Gruppierungen, die basierend auf den biochemischen Charakteristika getroffen wurden, korrekt waren. Daher müssen immer wieder bestimmte Hefearten umbenannt und aufgrund ihrer genetischen Verwandtschaft neu gruppiert werden. Ein Beispiel stellen die Nitrat verwertenden *Hansenula*-Arten dar, die aufgrund phylogenetischer Berechnungen der Gattung *Pichia* zugeteilt wurden und entsprechend umbenannt wurden [61].

Die bis heute anhaltende Entwicklung unterschiedlicher molekularbiologischer Techniken, wie Pulsfeldgelelektrophorese zur Untersuchung chromosomaler DNS oder PCR-Methoden wie AFLP zur Analyse genomischer DNS, ermöglicht es, immer genauer auf Art- und sogar Stammebene zu differenzieren.

1.1.2 Vorkommen und Bedeutung

Hefen sind ubiquitär verbreitete Mikroorganismen, die eine Vielzahl unterschiedlichster Habitate besiedeln können, darunter auch osmo- bzw. halophile sowie saure Substrate mit geringem a_w -Wert. Nach Boekhout & Robert [13] läßt sich das Auftreten von Hefen vereinfacht in drei Bereiche unterteilen. Diese drei Bereiche umfassen natürliche Substrate wie Luft, Boden, Wasser, Pflanzen sowie Früchte, den gezielten Einsatz von Hefen in künstlichen Habitaten und schließlich auch das klinische Auftreten in Mensch und Tier.

In der klinischen Diagnostik stellen Hefen die am häufigsten isolierten Pilze in Patientenproben dar. Da sie in der Umwelt weit verbreitet sind und im menschlichen wie auch tierischen Körper als nicht krankheitsverursachende Bewohner vorkommen [50], ist es schwierig, die klinische Signifikanz der jeweils vorliegenden Hefe zu bestimmen. Ein Großteil der Hefearten wird in Deutschland nach den Technischen Regeln für biologische Arbeitsstoffe (TRBA 460) [4] der Risikogruppe 1 mit Einschränkung zugeordnet. Bei Mikroorganismen, die in diese Gruppe eingeteilt werden, wird die Verursachung einer Krankheit bei immunkompetenten Personen als unwahrscheinlich erachtet. Allerdings werden einige Arten, darunter beispielsweise *C. albicans*, *C. africana*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* und viele *Trichosporon*-Arten, der Risikogruppe 2 zugeteilt. Vertreter dieser Risikogruppe können eine Krankheit beim Menschen hervorrufen, eine Verbreitung in der Bevölkerung wird jedoch als unwahrscheinlich erachtet und eine wirksame Vorbeugung oder Behandlung ist normalerweise möglich. Bei Erkrankungen durch Hefen liegt in der Regel bereits eine immunschwächende Grunderkrankung vor, durch die es zu einer Manifestation der Hefen im Körper und zur Ausbildung eines Krankheitsbildes kommt [9,29,89]. Bei gesunden, immunkompetenten Personen ist belegt, dass es selbst durch Vertreter der Risikogruppe 2 zu keinerlei Manifestation kommt, sofern sie in geringen Zellzahlen auftreten [58,81]. Hefen werden daher als opportunistisch pathogene Keime ein-

gestuft. Da aber gerade unter den opportunistisch pathogenen Spezies viele Vertreter Antibiotikaresistenzmechanismen besitzen, ist eine schnelle Identifizierung des verursachenden Keimes für eine erfolgreiche Therapie sehr wichtig.

Lebensmittel stellen im Allgemeinen aufgrund des Nährstoffreichtums durch die enthaltenen Zucker, Mineralien und Vitamine ein ideales Substrat für das Wachstum von Hefen dar [91]. Dies wird genutzt, um Hefen gezielt zur Produktion bestimmter Lebensmittel und auch Getränke einzusetzen. So werden einige Arten beispielsweise gezielt zur Produktion fermentierter Lebensmittel eingesetzt, um deren Qualität zu verbessern [54]. Besonders *Pichia*-Arten, wie beispielsweise *P. anomala* in Komboucha, sind wichtige Bestandteile für traditionell fermentierte Produkte in Afrika, Lateinamerika und Asien [82]. Die Spezies *P. jadinii* ist dafür bekannt, dass sie die Geschmacksbildung, sowie die Konsistenz von Käse positiv beeinflussen kann, wenn sie der bakteriellen Starterkultur zugesetzt wird [108]. Andere Arten sind dagegen als Lebensmittelverderber beschrieben, die beispielsweise häufig aus Fruchtzubereitungen und Sauermilchprodukten isoliert werden können [13,35]. Die häufig vorkommenden Arten, die als Kahmhefen bekannt sind, zählen ebenfalls zu den Verderbsorganismen, da sie auf Fruchtsäften oder Wein einen charakteristischen Oberflächenfilm – eine Kahmhaut – bilden können. Zu ihnen zählen unter anderem *P. membranifaciens* und *I. orientalis*.

Die mikrobielle Qualitätsminderung bzw. der Verderb von Lebensmitteln durch Hefen kann große Zeit-, Material- und Personalkosten für die herstellenden Betriebe nach sich ziehen. Eine zuverlässige und schnelle Artidentifizierung ist somit entscheidend, um die Qualität der Produkte zu erhalten bzw. Kosten durch Kontaminationen möglichst gering zu halten. Eine exakte Identifizierung ist von großer Bedeutung, da das Vorhandensein von Hefen in Lebensmitteln je nach vorliegender Spezies positive, aber auch negative Auswirkungen haben kann.

Auch in der Futtermittelindustrie nutzt man bereits seit Beginn des 20. Jahrhunderts den Einsatz lebender Hefen zur positiven Unterstützung der natürlichen Darmflora von Nutztieren [20,27,106,120]. Nach einer ersten Definition von Fuller 1989 [38] sind diese Hefen als probiotisch bekannt. Derzeit sind fünf *S. cerevisiae*-Stämme (CNCM I-1079, CNCM I-1077, NCYC 1026, NCYC Sc47, MUCL 39885) als probiotische Futtermittelzusätze anerkannt und durch das europäische Futtermittelgesetz zugelassen. Der Einsatz dieser probiotischen Futtermittelzu-

sätze verursacht allerdings Probleme bei der Qualitätsbeurteilung von Futtermitteln, da hierfür die quantitativ ermittelten Zellzahlen aller Hefen das entscheidende Kriterium zur Beurteilung des Futtermittels darstellen [118]. Dabei wird jedoch keinerlei Bezug zur Herkunft der Hefen, ihrer potentiellen Pathogenität für das Tier, sowie ihrer tatsächlichen Gefahr als Verderbniskeim hergestellt. Gerade durch den Einsatz von Abbauprodukten aus der Lebensmittelindustrie als Futtermittel sind allerdings häufig relativ hohe Hefekeimzahlen nachweisbar. Diese Keimzahl wird zusätzlich durch probiotische *S. cerevisiae* erhöht, die, um einen positiven Effekt garantieren zu können, in hohen Keimzahlen von 10^8 bis 10^{10} KBE/kg Futtermittel zugesetzt werden (European Commission Regulation No. 1831/2003). Auch die Beurteilung von Produkten, die Kreuzkontaminationen verschiedener Probiotika beinhalten, bzw. die Beurteilung nicht ausreichend deklarerter Produkte erweist sich als problematisch. Eine Identifizierung und Differenzierung probiotischer und ubiquitärer *S. cerevisiae* ist daher von großer Bedeutung.

1.2 Methoden zur Identifizierung von Hefen

1.2.1 FTIR-Spektroskopie

Erste Identifizierungen und Differenzierungen von Bakterien mit FTIR-Spektroskopie konnten bereits in den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts durchgeführt werden [46]. Die nicht ausgereifte Gerätetechnologie, aufgrund derer ein extrem hoher Aufwand zur Berechnung der Fourier-Transformation der Interferogramme nötig war, verhinderte jedoch zunächst einen routinemäßigen Einsatz. Erst durch die Computerweiterentwicklung der achtziger Jahre konnte sich die FTIR-Spektroskopie etablieren. Sie findet heute unter anderem in der routinemäßigen Identifizierung von Mikroorganismen im Lebensmittelbereich ihren Einsatz [2, 15, 60, 84, 110, 122].

In der FTIR-Spektroskopie wird der mittlere Infrarotbereich ($4\,000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$) genutzt, um Atome innerhalb eines Molekülverbandes anzuregen und in Schwingung zu versetzen. Die Emission und Absorption von Photonen wird im Strahlengang des IR-Spektrometers gemessen und mit Hilfe der Fourier-Transformation

in Spektren umgewandelt:

$$F_{t\omega} \{f(t)\} = F(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{-i\omega t} dt$$

Mit Hilfe dieser Integraltransformation lässt sich für zeitliche Signale das Frequenzspektrum berechnen. Dabei stellt $f(t)$ die reelle Originalfunktion und $F(\omega)$ die Bildfunktion dar, wobei t für die Zeit und ω für die Winkelgeschwindigkeit steht [46].

Die Energiezufuhr für die Anregung bestimmter Atome ist spezifisch, so dass die Absorption funktioneller Molekülgruppen spezifischen Wellenzahlen zugeordnet werden kann [79]. Vor diesem Hintergrund ist die Zuordnung bestimmter spektraler Bereiche zur Absorption unterschiedlicher Zellbestandteile möglich. Helm et al. [47] deklarierten hierzu fünf spektrale Fenster, die in Tabelle 1.2 aufgelistet sind. Für die Identifizierung von Hefen sind besonders drei Spektralbereiche (in Abbildung 1.1 grau hinterlegt) geeignet [60]. Diese Bereiche enthalten spektrale Informationen mit größtmöglichem Differenzierungspotential für die größtmögliche Anzahl an Hefearten.

Tabelle 1.2: Absorption von Zellbestandteilen in spezifischen Bereichen des FTIR-Spektrums.

absorbierende Verbindungen	spektraler Bereich
Fettsäuren	3 000–2 800 cm ⁻¹
	1 500–1 400 cm ⁻¹
Phospholipide	etwa 1 740 cm ⁻¹
Proteine, DNS/RNS	1 800–1 500 cm ⁻¹
Polysaccharide	1 200–900 cm ⁻¹

In den Spektren spiegelt sich die chemische Zusammensetzung der Zellen wider, die für unterschiedliche Organismen charakteristisch ist. Deshalb werden FTIR-Spektren von Mikroorganismen auch als Fingerabdruck bezeichnet. Dieser ist jedoch durch den sehr komplexen mikrobiellen Zellaufbau von stark überlagernden Banden im FTIR-Spektrum charakterisiert. Um dennoch Aussagen über die Identität des betreffenden Mikroorganismus treffen zu können, werden Ableitungen des Absorptionsspektrums berechnet, für Hefen die zweite Ableitung,

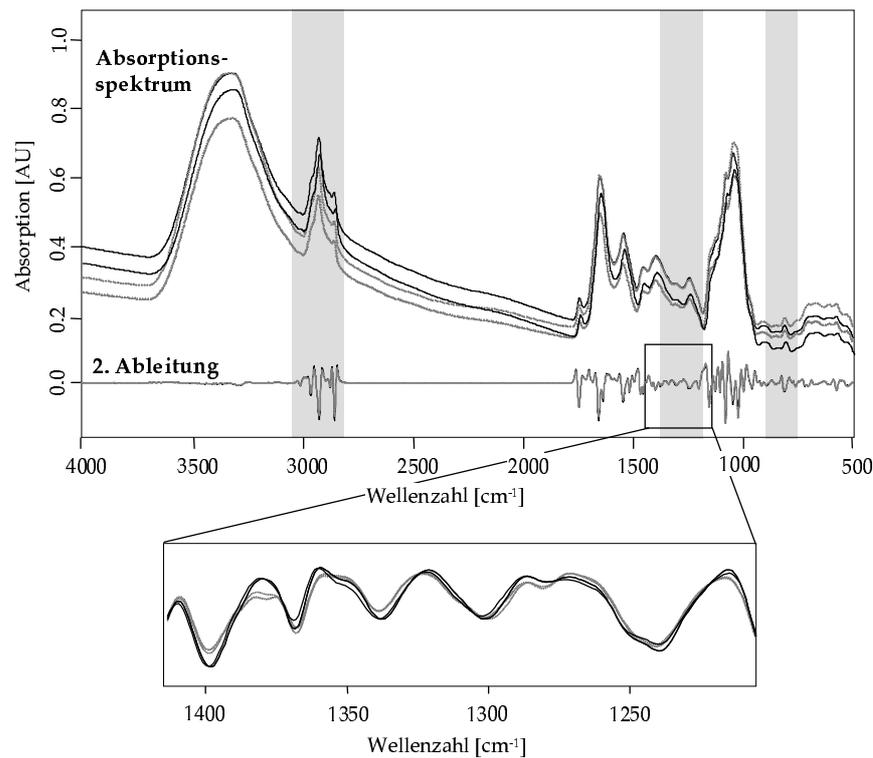


Abbildung 1.1: FTIR-Spektren zweier Hefearten (grau und schwarz) mit zugehörigen zweiten Ableitungen. Im vergrößerten Ausschnitt zwischen 1400–1200 cm⁻¹ ist der Abschnitt der zweiten Ableitungen hervorgehoben, der das größte Differenzierungspotential für die dargestellten Arten enthält.

und für einen Vergleich mit Spektren einer Referenzdatenbank herangezogen [60].

Unbekannte Spektren lassen sich mit Hilfe von Referenzdatenbanken mit bekannten vergleichen. Mittels der Quantifizierung der spektralen Distanz können Aussagen über die Identität gemacht werden. Dieser direkte Vergleich setzt sowohl die Einhaltung der standardisierten Methodik in der Probenaufbereitung als auch die Wahl einer passenden Referenzdatenbank voraus.

1.2.2 Künstliche neuronale Netze

In den letzten Jahren wird FTIR-Spektroskopie häufig in Verbindung mit selbstlernenden künstlichen neuronalen Netzen (KNN) angewandt, um den steigenden Anforderungen nach immer genauer differenzierenden Methoden gerecht werden zu können [16, 98, 99]. Gerade für den Bereich der mikrobiologischen, medizinischen und biodiagnostischen Routineanalyse, in dem das Probenmaterial sehr komplex ist, eröffnet diese Kombination neue Möglichkeiten der Datenauswertung [103]. Durch den Einsatz von KNN steht eine mathematische Datenauswertung zur Verfügung, die es ermöglicht, detaillierte Informationen aus den FTIR-Spektren zu extrahieren.

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

Um einen besseren Lernprozess zu ermöglichen, werden gerade bei komplexen Klassifizierungen Netze ohne Rückkopplung (*feedforward*) mit sogenannten *shortcut connections* eingesetzt. Feedforward-Netze stellen die Basis für sogenannte *backpropagation*-Netze dar [114], die aus einer Eingabeschicht (engl.: *input layer*), einer Ausgabeschicht (engl.: *output layer*) und mindestens einer verborgenen Schicht (engl.: *hidden layer*) bestehen (siehe Abbildung 1.2). Die verborgene Schicht, deren Aktivität im Allgemeinen verdeckt bleibt, wurde eingeführt, um die Leistungsfähigkeit des Netzes zu erhöhen. Bei Netzen ohne Rückkopplung werden die Informationen von der Eingabeschicht über die verborgene Schicht zur Ausgabeschicht geleitet. Dabei gibt es keine Verbindung von einer höheren zu einer der vorgelagerten Ebenen und keine in sich rückgekoppelten Informationsflüsse eines einzelnen Neurons. Durch die *shortcut connections* kann eine Schicht übersprungen werden. Eine weitere Verbesserung wird durch vollständig verbundene (engl.: *fully connected*) Netze erzielt, in denen jedes Neuron der zugrunde liegen-

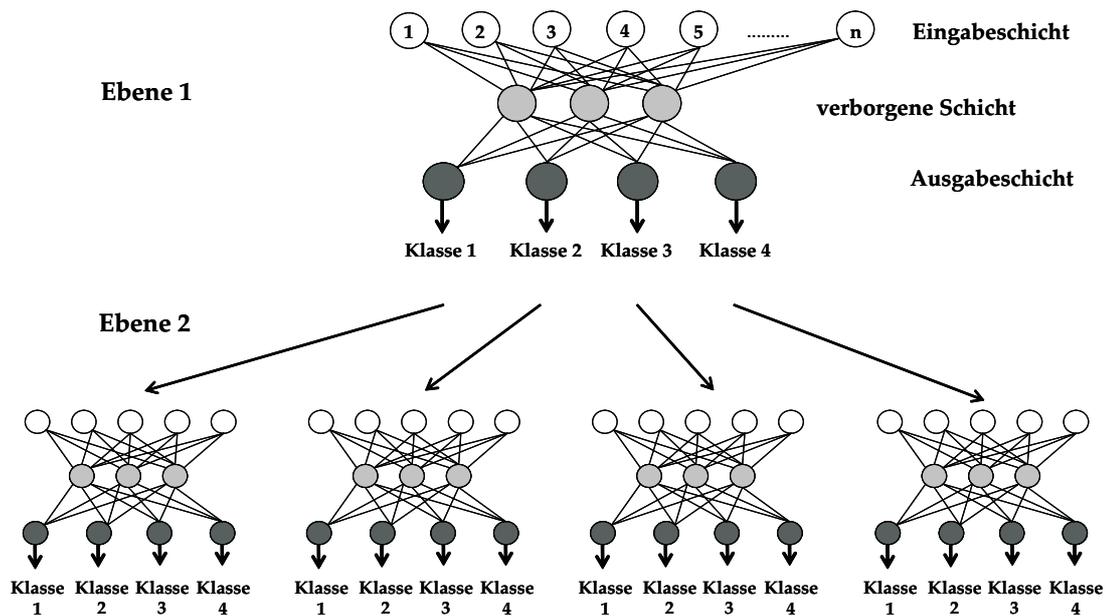


Abbildung 1.2: Vollständig verbundenes dreischichtiges neuronales Netz, bestehend aus zwei Klassifizierungsebenen.

den Schicht mit jedem Neuron der darauf folgenden Schicht verbunden ist.

Die *backpropagation* gehört zu den Verfahren des überwachten Lernens. Der Lernprozess aller neuronalen Netze beinhaltet eine Selbstmodifikation basierend auf Versuch und Fehler. Besonders für die Klassifizierung von Mikroorganismen bietet das überwachte Lernen den Vorteil, dass man dem Netz zu jeder Eingabe (gemessenes Spektrum) die korrekte Ausgabe (zugehörige Klasse) vorgeben kann. Zudem können Subnetze für einzelne Klassen von Mikroorganismen zu einem Gesamtnetz verbunden werden, welches dadurch eine hohe Flexibilität und ein noch größeres Klassifizierungspotential erhält [103]. Dieses wird in Abbildung 1.2 verdeutlicht, die den strukturellen Aufbau eines vollständig verbundenen *backpropagation*-Netzes, bestehend aus einem Toplevel-Netz (Ebene 1) und drei Sublevel-Netzen (Ebene 2), darstellt. Die hohe Flexibilität verbunden mit dem größeren Klassifizierungspotential eignet sich sehr gut, um nah verwandte Gattungen, Arten und teilweise sogar Stämme der gleichen Art exakt voneinander zu differenzieren.

1.2.3 Molekularbiologische Methoden

Für die Artidentifizierung von Hefen wurden bislang vorwiegend klassische Methoden, die physiologische, morphologische und biochemische Tests umfassen, angewandt. Diese basieren auf der Untersuchung von Enzymprofilen und Wachstumscharakteristika [22–24]. Ein seit Jahren häufig angewandtes System stellt beispielsweise das Identifizierungssystem nach Barnett [7] dar, bei welchem anhand der artspezifischen Verstoffwechslung unterschiedlicher Kohlen- und Stickstoffquellen Rückschlüsse auf die vorliegende Hefespezies gezogen werden. Das gleiche Prinzip liegt den käuflich zu erwerbenden Identifizierungskits, wie dem API-System von bioMérieux, zugrunde. Diese traditionellen Techniken eignen sich jedoch nur bedingt zur Identifizierung von nah verwandten Arten mit großer phänotypischer Ähnlichkeit, eine Unterscheidung von Stämmen der gleichen Art ist in der Regel nicht möglich. Als nachteilig erweisen sich neben einem hohen Zeitaufwand, der für die Durchführung dieser Methoden benötigt wird, vor allem die häufig schwer zu interpretierenden Ergebnisse.

Seit einigen Jahren werden daher vermehrt unterschiedliche molekularbiologische Methoden eingesetzt, die sich sowohl zur Artidentifizierung als auch zur Differenzierung auf Stammebene eignen. So werden Restriktionsenzymanalysen, wie beispielsweise die Analyse des AFLP [72] und RFLP [3, 33, 104, 119], aber auch PFGE [59, 77] oder auf PCR-Analysen basierende Techniken wie RAPD [18, 25, 94, 117] angewandt. Zur Differenzierung auf Stammebene ist der Einsatz von Mikrosatelliten-Primern bereits mehrfach beschrieben worden [5, 48, 55, 68, 92].

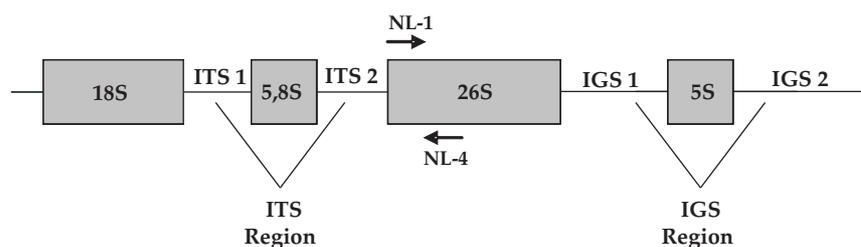


Abbildung 1.3: Ribosomale Genstruktur bei Hefen.

Bei diesen molekularbiologischen Methoden werden bestimmte Bereiche des ribosomalen Hefengenoms untersucht (Abbildung 1.3), da sie universell vorhanden sind und funktionelle Gene sowie variable und nicht variable Genbereiche

enthalten. Zur Unterscheidung verschiedener Hefearten eignen sich konservierte, für ribosomale Gene kodierende Bereiche (in Abbildung 1.3 grau markierte Felder) [116]. Dagegen müssen zur Differenzierung auf Stammebene nicht kodierende und daher weniger konservierte Genomabschnitte, wie die ITS- und die IGS-Region [40], untersucht werden. Diese variablen Bereiche enthalten selbst bei Stämmen der gleichen Art Unterschiede in der DNS-Sequenz.

Die bekannteste molekularbiologische Methode zur Identifizierung von Hefearten stellt die Sequenzierung der variablen D1/D2 Domäne am 5'-Ende der 26S rDNS [34, 64, 65] dar. In Abbildung 1.3 ist der entsprechende Bereich durch das verwendete Primerpaar NL-1 und NL-4 gekennzeichnet. Der stark variable Abschnitt der IGS 2-Region eignet sich dagegen durch den hohen Grad an Sequenz-Polymorphismus sehr gut zur Stammtypisierung, beispielsweise von *S. cerevisiae* [51].

1.3 Zielsetzung

Im Fokus dieser Arbeit stand die Etablierung eines zuverlässigen Systems zur Identifizierung von Hefen in den Bereichen der Lebens- und Futtermittelindustrie sowie klinisch relevanter Hefearten, welches auf der Anwendung der FTIR-Spektroskopie basiert. Zunächst sollte eine Überarbeitung der bestehenden spektralen Datenbank zur Identifizierung von Hefen aus dem Lebensmittelbereich [60], sowie eine Erweiterung um Spektren neuer Isolate aus dem klinischen und Futtermittelbereich erfolgen. Hierbei sollten unterschiedliche molekularbiologische Methoden zur Überprüfung der Referenzisolate getestet und eingesetzt werden.

Um komplexe Klassifizierungsprobleme, die gerade bei nah verwandten Arten eine exakte Identifizierung erschweren, zu lösen, wird die FTIR-Spektroskopie in Verbindung mit KNN angewendet. Durch dieses erhöhte Klassifizierungspotential sollte eine Differenzierung zwischen probiotischen und ubiquitären *S. cerevisiae* ermöglicht werden, die die Nutzung des Systems im Rahmen der Qualitätskontrolle von Futtermitteln realisieren sollte.

2 Material und Methoden

2.1 Referenzstämme

In der vorliegenden Arbeit wurde mit 800 Stämmen bzw. Isolaten von 48 Hefearten, die 11 unterschiedlichen Gattungen angehören, gearbeitet. Eine Auflistung aller verwendeten Referenzstämme findet sich in Anhang A–C.

Es werden für alle Gattungen und Arten die teleomorphen Bezeichnungen verwendet. Als Ausnahme wird für die Gattung *Filobasidiella* (teleomorph) die anamorphe Bezeichnung *Cryptococcus* verwendet, da diese Bezeichnung in der Fachliteratur gebräuchlicher ist.

2.1.1 Stammhaltung

Für die Messung im FTIR-Spektrometer erfolgte die Anzucht der Hefen auf *Yeast-Glucose-Chloramphenicol* (YGC)-Agar (Merck). Um möglichst reproduzierbare Bedingungen gewährleisten zu können, wurde von diesem standardisierten Medium eine größere Menge derselben Charge gelagert. Vor dem Kauf einer neuen Charge wurden daher die Ergebnisse beider Chargen zunächst auf Vergleichbarkeit getestet. Die untersuchten Chargen waren ausschließlich der Kultivierung für die FTIR-Spektroskopie vorbehalten.

Die Anzucht der Organismen im Rahmen der Stammhaltung erfolgte auf nicht getesteten Agarchargen. Der verwendete YGC-Agar (Merck) wurde mit 0,01 %/l Bromphenolblau (YGCB) versetzt. Die je nach Stamm unterschiedlich stark ausgeprägte Fähigkeit der Zellen diesen Farbstoff aufzunehmen resultiert in verschieden gefärbten Einzelkolonien, was das Erkennen von Mischkulturen erleichtert.

Das Medium wurde für beide Anwendungsbereiche nach Angaben des Herstellers mittels eines Agarklavs sowie einer daran angeschlossenen Gießmaschine (beide Geräte von IBS Integra Biosciences) zu je 22 ± 1 g pro Platte gegossen.

Die Inkubation der Platten für die Messung im FTIR-Spektrometer erfolgte nach standardisierten Bedingungen bei 27 °C [60]. Obwohl unterschiedliche spezies- und habitatabhängige Optimaltemperaturen vorlagen, war die Wachstumsfähigkeit der Zellen bei 27 °C eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Messung. Aus diesem Grund erfolgte auch die Stammhaltung bei 27 °C.

Reaktivierung von Stämmen aus der Gefriertrocknung

Hefeextrakt-Dextrose-Bouillon (HDB)

Hefeextrakt	3,0 g
Caseinpepton	10,0 g
D(+) - Glucose · H ₂ O	5,0 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Das Medium wurde in Reagenzröhrchen zu je 5 ml aliquotiert und bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert.

Für die Reaktivierung der lyophilisierten Stämme erfolgte eine Resuspension in 1 ml Bouillon. Ausgehend von dieser Zellsuspension wurde ein Drei-Quadranten-Ausstrich auf YGCB-Agar gemacht. Anschließend wurden je 0,5 ml der Suspension auf eine weitere YGCB-Agar Platte bzw. in die verbliebenen 4 ml Bouillon gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 27 °C für etwa 48 Stunden. Bei ausreichendem Wachstum erfolgte ausgehend vom Drei-Quadrantenaustreich eine weitere Passage auf YGCB, um eine möglichst optimale Stoffwechselaktivität der Hefen gewährleisten zu können.

Reaktivierung von Stämmen aus Glycerinstocks

Zur Reaktivierung der bei -70 °C tiefgefrorenenen Mikroorganismen wurde mit einer Stahlöse dem entsprechenden Glycerinstock eine ausreichende Zellmenge entnommen und ein Drei-Quadranten-Ausstrich auf YGCB-Agar gemacht. Nach einer Inkubation für etwa 48 Stunden bei 27 °C wurde auch hier eine zweite Passagierung zur Wiederherstellung einer intakten Stoffwechselaktivität angeschlossen.

2.1.2 Stammlagerung

Die Konservierung aller Referenzstämmen und Isolate erfolgte in Glycerinstocks bei -70 °C.

Suspensionsmedium

Natriumglutamat	10,0 g
Lactose · H ₂ O	16,0 g
Agar	1,0 g
Ascorbinsäure	0,1 g
Glyzerin	120,0 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Das Suspensionsmedium wurde in Reagenzröhrchen zu je 5 ml aliquotiert und bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert.

Von einem maximal 3 Tage alten Drei-Quadranten-Ausstrich wurde reichlich Zellmaterial in das Suspensionsmedium eingerührt, homogenisiert und auf zwei Cryo-Röhrchen (2 ml PP-Röhrchen, Greiner) aufgeteilt. Nach 12–24 Stunden Lagerung bei 4 °C wurden die Stämme bei -70 °C tiefgefroren. Während dieser Vorlagerung bei geringerer Temperatur wird den Zellen ermöglicht Glyzerin aufzunehmen. Dadurch wird die Kristallbildung im Zellinneren, die zu einem Aufbrechen der Zelle führen kann, verringert und so der Verlust an vitalen, rekultivierbaren Zellen vermindert.

2.2 FTIR-Spektroskopie

2.2.1 Probenvorbereitung und Messung

Zur Probenaufbereitung wurden ausschließlich Ausstriche verwendet, die maximal 5 Tage alt waren. Hiervon wurde je Probe eine halbe Impföse (1 mm Durchmesser) Zellmaterial abgenommen und mittels Drigalski-Spatel auf gedrittelten YGC-Agarplatten verteilt. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden bei 27 °C.

Für die Messung wurde eine volle Impföse Material aus der Mitte des konfluenten Zellrasens abgenommen und in 100 µl autoklaviertem Wasser suspendiert. Von dieser möglichst homogenen Suspension wurden 35 µl je Feld auf ein ZnSe-Probenrad aufgetragen, welches anschließend etwa 45 Minuten bei 40 °C getrocknet wurde.

Die Messung erfolgte im IFS 28B Spektrometer (Bruker) mit folgenden Messparametern:

- 6 cm⁻¹ Auflösung

- 10 kHz scan speed
- Apodisation Blackman-Harris 3-term
- Zerofilling 4

Mit Hinblick auf die spätere Verwendung der Spektren – die Erstellung einer Datenbank bzw. die Etablierung eines KNN – wurden für jeden Stamm unabhängige Mehrfachmessungen durchgeführt.

2.2.2 Auswertung und Identifizierung der Spektren

Für die Auswertung wurde von den erhaltenen Spektren zunächst die zweite Ableitung gebildet und diese anschließend normiert. Da durch die Ableitung der Spektren das Hintergrundrauschen verstärkt wird, erfolgte zur Reduktion des Rauschens zusätzlich eine Glättung der zweiten Ableitung [102] an neun Stützpunkten. Zur Überprüfung der physikalischen Güte der Messdaten wurden die Originalspektren einem Qualitätstest [47] mit den in Tabelle 2.1 aufgeführten Parametergrenzwerten unterzogen.

Bei bestandenem Qualitätstest erfolgte die Identifizierung in Opus 3.1® (Bruker Optics GmbH) mit der bestehenden Referenzdatenbank für Hefen [60]. Verglichen wurde an dieser Stelle die zweite Ableitung innerhalb folgender drei spektralen Fenster: $3\,030\text{--}2\,830\text{ cm}^{-1}$, $1\,350\text{--}1\,200\text{ cm}^{-1}$ und $900\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ mit einer Gewichtung von eins und einem Replevel von 30. Zusätzlich wurden Spektren

Tabelle 2.1: Parametergrenzwerte für den Qualitätstest der FTIR-Spektren.

Parameter	Minimaler Grenzwert	Maximaler Grenzwert
Absorption [AU]	0,3	1,3
Rauschen [AU/cm^{-1}]		0,00015
Signal 1/Rauschen	200/1	
Signal 2/Rauschen	40/1	
Wasserdampf [AU/cm^{-1}]		0,0003
Signal 1/Wasserdampf	100/1	
Signal 2/Wasserdampf	20/1	
Fringes		0,00015

des gleichen Stammes auf Reproduzierbarkeit mittels hierarchischer Clusteranalyse untersucht. Als Grenzwert wurde eine spektrale Distanz von 0,3 festgelegt.

2.2.3 Erweiterung der Datenbank zur Identifizierung klinisch relevanter Hefearten

Von jedem Referenzstamm (Anhang A) wurden mindestens drei unabhängige Wiederholungsmessungen durchgeführt. Zwei repräsentative Spektren wurden in die bestehende Datenbank zur Identifizierung von Hefen übernommen und diese so um 212 Spektren erweitert.

2.2.4 Validierung der Datenbank zur Identifizierung klinisch relevanter Hefearten

Es wurden 104 Stämme zur Validierung der erweiterten Datenbank verwendet. Pro Stamm wurden mindestens drei Spektren getestet. Betrachtet wurden die ersten beiden Artnamen der Identifizierungshitliste, wobei zwischen drei Identifizierungsergebnissen unterschieden wurde. Als korrekte Identifizierung des einzelnen Testspektrums wurde definiert, dass die ersten beiden Ergebnisse den korrekten Artnamen enthalten mussten. Wurde unter diesen Positionen nicht der korrekte Artname angezeigt, wurde das Testspektrum als falsch identifiziert gewertet. Die Mischung des korrekten und eines falschen Artnamens wurde als nicht eindeutige Identifizierung definiert.

Da in der Datenbank zum Teil mehrere Spektren einzelner Stämme abgelegt sind, wurden zwei aufeinanderfolgende Spektren des gleichen Stammes als eine Position in der Identifizierungshitliste gewertet. In diesen Fällen wurden auch die in der Hitliste folgenden Positionen betrachtet. Ein Grenzwert für die Hitqualität wurde nicht definiert, da die Datenbank auch um neue Arten mit wenigen Stämmen erweitert wurde, bei welchen deshalb im Rahmen der Validierung entsprechend hohe Hitwerte zu erwarten waren.

2.3 Training des KNN

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

2.3.1 Zusammenstellung von Datensätzen

Vor Beginn des Trainings wurden mit den überprüften Spektren der Trainingsstämme drei Datensätze erstellt (Tabelle 2.2).

Der Validierungsdatensatz wurde von der verwendeten Software automatisch während des Trainings für eine interne Validierung genutzt. Eine weitere interne Validierung mit den Testspektren, welche zur Prüfung der gewählten Netzstruktur diente, erfolgte anschließend manuell. Zum Abschluss wurde eine externe Validierung durchgeführt. Dem *Issatchenkia-Pichia*-Netz wurden hierbei insgesamt 1 608 unbekannte Spektren von 179 Stämmen der beiden Gattungen präsentiert, dem *S. cerevisiae*-Netz 965 unbekannte Spektren von 65 Stämmen bzw. Isolaten der fünf probiotischen Futtermittelzusätze.

Tabelle 2.2: Datensätze für das Training des KNN.

Datensatz	Spektrenanzahl je Stamm	Spektrenanzahl <i>S. cerevisiae</i> - Netz	Spektrenanzahl <i>Issatchenkia</i> - <i>Pichia</i> -Netz
Training	mindestens 8	1399	2026
Validierung	1	108	237
Test	1	108	237

2.3.2 Trainingssoftware

Das Training des künstlichen neuronalen Netzes wurde mit der Software NeuroDeveloper® (Synthon GmbH, Heidelberg) durchgeführt. Diese Software wurde für die Erstellung modulierbarer neuronaler Bibliotheken für die Klassifizierung spektraler Daten entwickelt. Im Vordergrund steht die unabhängige Wahl

verschiedener Techniken der Datenvorbehandlung für jede Klassifizierungsstufe [115].

Dementsprechend dient der FeatureDeveloper, das erste von vier aufeinander aufbauenden Modulen, der Datenvorbehandlung, sowie der automatisierten Selektion der am stärksten diskriminierenden Wellenzahlen. Diese sind für eine Klassifizierung relevant, da hier wichtige Diskrepanzen für die Differenzierung zwischen den Klassen lokalisiert sind. Vorab werden im FeatureDeveloper die vorhandenen Trainingsspektren definierten Klassen zugeteilt und mit den gewählten Parametern (Tabelle 2.3) zu Datensätzen für das Training und die programminterne Validierung zur Überwachung des Trainingsprozesses verknüpft.

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

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

Im dritten Modul, dem ModuleDeveloper, lassen sich die vorher einzeln trainierten Netze in der gewünschten hierarchischen Struktur zu einem Gesamtnetz, bestehend aus einem Toplevelnetz und den entsprechenden Sublevelnetzen, zu-

Tabelle 2.3: Übersicht über die gewählten Parameter zur Datenvorbehandlung.

Parameter	Einstellung
Ableitung	Zweiter Grad mit Savitzky-Golay Algorithmus und neun Glättungspunkten
Normierung	Vektornormierung über gesamten Spektralbereich
Spektralbereiche	Fenster 1: 700–1 800 cm^{-1} / 900–1 800 cm^{-1} Fenster 2: 2 800–3 100 cm^{-1}
Algorithmus zur Auswahl der Wellenlänge/Bestpoints	Covar
Lernalgorithmus	Resilient propagation (Rprop)

sammenstellen.

Das jeweils trainierte KNN-Modell kann im Classification-Modul einer externen Validierung mit unbekanntem Spektren unterzogen werden. Die hierbei getesteten Stämme sind in Anhang B und C aufgelistet.

2.4 Biochemische und molekularbiologische Methoden

2.4.1 Methoden zur Artidentifizierung

API ID32C (bioMérieux)

Als Ausgangsmaterial zur Anwendung des API ID32C wurde eine junge Vor-
kultur (24–48 Stunden) benötigt, die auf YGCB-Agar für etwa 40 Stunden bei
30 °C angezogen wurde. Die Teststreifen wurden nach Anleitung des Herstel-
lers beimpft und nach 24, sowie 48 Stunden abgelesen. Die Auswertung erfolgte
mittels apiweb Software (bioMérieux, <http://apiweb.biomerieux.com>).

26S rDNS-Sequenzierung

Die Zellanzucht erfolgte auf YGCB-Agar bei 27 °C für 48 Stunden. Für die Her-
stellung von Zell-Lysaten wurde eine definierte Menge Zellmaterial in 200 µl
sterilem MilliQ Wasser suspendiert und mittels Zirkoniumsilikatperlen (0,5 mm,
Roth) in einem FastPrep®-24 Gerät (MP Biomedicals) bei 6,5 m/s zweimal 45 Se-
kunden aufgeschlossen. Diese Suspension wurde bei 13 000 U/min für 3,5 Minuten
zentrifugiert und der Überstand bei -21 °C bis zum weiteren Gebrauch tiefgefro-
ren.

Die spezifische Vervielfältigung des 579 bp langen DNS-Abschnittes der va-
riablen D1/D2 Domäne am 5'-Ende der 26S rDNS erfolgte mittels PCR und
wurde nach Kurtzman & Robnett [65] unter Verwendung der Primer NL-1 (5'-
GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') und NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAG
ACGG-3') durchgeführt. Der 50 µl Ansatz enthielt 8 µl Lysat als Template, 0,5 µl
je Primer [50 pmol/µl], 5 µl 10x Thermoprime Standard Buffer (ABgene), 2 µl dNTP
Mix [20 mM] (ABgene), 3 µl MgCl₂ [25 mM] (ABgene), 0,1 µl Thermoprime Taq
Polymerase® (ABgene) und 30,9 µl steriles MilliQ Wasser. Die Amplifizierung er-
folgte in einem T3000 Thermocycler (Biometra) unter folgenden PCR-Bedingung-
en:

Initiale Denaturierung	1 Zyklus	95 °C, 5 Minuten
Denaturierung		95 °C, 20 Sekunden
Annealing	30 Zyklen	55 °C, 40 Sekunden
Elongation		72 °C, 2 Minuten
Finale Elongation		72 °C, 7 Minuten

Zur Überprüfung der PCR wurde eine Agarosegelelektrophorese in horizontalen Elektrophoresekammern der Firma Peqlab durchgeführt. Zur Herstellung von 1%igen (w/v) Agarosegelen wurde die entsprechende Menge Agarose (Sea-Kem® Agarose, Roth) mit 1x TAE Puffer versetzt, in der Mikrowelle gelöst und nach dem Abkühlen auf Handwärme luftblasenfrei in den Gelträger gegossen. Nach der Polymerisierung des Geles wurde dieses vollständig mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die PCR-Produkte wurden vor dem Auftragen mit 6x LoadingDye (MBI Fermentas) im Verhältnis 5:1 vermengt und in die Taschen pipettiert. Diese wurde so mit jeweils 6 µl PCR-Produkt geladen. Für die spätere Auswertung wurden zusätzlich 4 µl GeneRuler DNA Ladder Mix (#SM1173, MBI-Fermentas) als Standard auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNS-Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 90 V (Standard Power Pack P25, Biometra) für etwa 45 min. Anschließend wurden die Gele für die fotografische Auswertung in einer Ethidiumbromidlösung (EtBr-Färbelösung) 20-30 min gefärbt und durch UV-Transillumination im Imagemaster® VDS (Pharmacia Biotech) visualisiert.

50x TAE-Puffer

(Stammlösung) 2 M Tris Base
 50 mM EDTA
 mit konzentrierter Essigsäure auf pH 8,0 einstellen

EtBr-Färbelösung

0,5 µg/ml EtBr in Aqua dest.

Wurden die spezifischen PCR-Produkte mit etwa 579 bp Länge erhalten, folgte die Reinigung des verbleibenden Volumens nach Protokoll des QIA-quick PCR Purification Kits (QIAGEN). Die Sequenzier-PCR wurde extern durch die Firma GATC Biotech AG durchgeführt. Die Identifizierung der erhaltenen Nukleotidsequenzen erfolgte über eine Datenbankrecherche mit BlastN bei NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Zur zusätzlichen Überprüfung der

Blast-Ergebnisse wurden mit den Sequenzen Alignments in ClustalX 1.81 [109] errechnet und die entsprechenden phylogenetischen Bäume in TREECON für Windows 3.1b visualisiert [85]. Es wurden auch Referenzsequenzen offizieller Stämme von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) in die Berechnungen aufgenommen.

2.4.2 Methoden zur Stammdifferenzierung

δ -PCR

Die Stämme wurden in 5 ml HDB über Nacht bei 27 °C angezogen. Zur Isolation genomischer DNS aus Zellen wurde das NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel) mit den Protokollangaben für kultivierte Zellen verwendet.

Um für die spätere PCR-Reaktion eine definierte Konzentration an DNS einstellen zu können, wurde die Menge der erhaltenen DNS in $\text{ng}/\mu\text{l}$ mit Hilfe des NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometers (NanoDrop Technologies) ermittelt. Hierzu wurden 2 μl Elutionspuffer als Referenz bzw. 2 μl je PCR-Produkt aufgetragen.

Die PCR-Amplifizierung erfolgte nach Ness et al. [80] unter Verwendung des Primerpaares δ -1 (5'-CAAATTCACCTATA/TCTCA-3') und δ -2 (5'-GTGGATT TTATTCCAACA-3') im 50 μl Ansatz. Für jeden Ansatz wurden 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ DNS, 0,5 μl je Primer [50 $\text{pmol}/\mu\text{l}$], 5 μl 10x Thermoprime Standard Buffer (ABgene), 2 μl dNTP Mix [20 mM] (ABgene), 3 μl MgCl_2 [25 mM] (ABgene), 0,1 μl Thermoprime Taq Polymerase® (ABgene) und 30,9 μl steriles MilliQ Wasser eingesetzt. Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese, je Ansatz wurde ein Volumen von 7 μl auf ein 2%iges (w/v) Gel geladen. Die Auftrennung der PCR-Fragmente erfolgte bei 100 V für 90–120 Minuten.

dHPLC

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

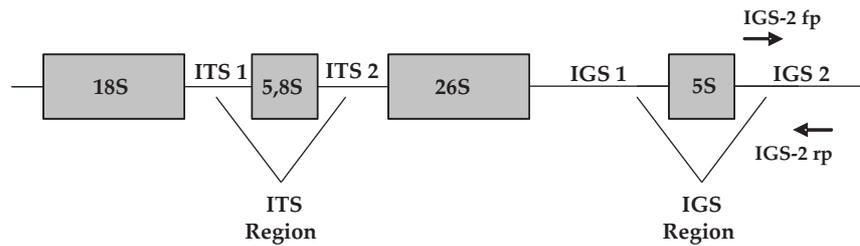


Abbildung 2.1: Ribosomale Genstruktur bei Hefen. Die Lage der beiden IGS-2 Primer ist mit Pfeilen markiert.

DNS wurde bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zum weiteren Gebrauch tiefgefroren.

Für die Amplifizierung eines 200 bp langen rDNS-Fragmentes der IGS 2-Region (Abbildung 2.1) wurden die für *S. cerevisiae* spezifischen Primer pIGS2-fp (5'-CGGGTAACCCAGTTCCTCACT-3') und pIGS2-rp (5'-GTAGCATATATTTCTTG TGTGAGAAAGGT-3') verwendet [51]. Der 25 μl Ansatz enthielt 2,5 μl DNA als Template, 1,5 μl je Primer [$600\text{ nmol}/\mu\text{l}$], 2,5 μl 10x Optimase Reaction Buffer mit 15 mM MgSO_4 (Transgenomic), 2,5 μl dNTP Mix [2 mM] (Transgenomic), 0,5 μl Optimase® [2,5 units] (Transgenomic) und 14 μl AMPU-Wasser (Fresenius Kabi Deutschland GmbH). Die Amplifizierung wurde in einem T3 Thermocycler (Biometra) unter folgenden PCR-Bedingungen durchgeführt und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese überprüft:

Initiale Denaturierung	1 Zyklus	95 $^{\circ}\text{C}$, 5 Minuten
Denaturierung		95 $^{\circ}\text{C}$, 30 Sekunden
Annealing	30 Zyklen	54 $^{\circ}\text{C}$, 30 Sekunden
Elongation		72 $^{\circ}\text{C}$, 40 Sekunden
Finale Elongation		72 $^{\circ}\text{C}$, 5 Minuten

Die dHPLC-Analyse wurde von Dipl.-Ing. Mathias Hutzler am Lehrstuhl für Brauereitechnologie II (Technische Universität München) durchgeführt [51]. Sie erfolgte am WAVE® System 3500 (Transgenomic), wobei je PCR-Produkt 3 μl auf den automatisierten Probennehmer des Systems aufgetragen wurden. Während der dHPLC wurde dieses Fragment über eine DNASep-HT-Säule (Transgenomic) temperaturbedingt aufgetrennt und durch die Pufferlösungen A (0,1 M Trimethylammoniumacetat) und B (0,1 M Triammoniumacetat in 25% Acetonitril, beide Transgenomic) abgewaschen. Aufgrund der polymorphen DNS-Sequenz

kann das amplifizierte Fragment stammabhängig unterschiedlich stark an die Säule binden, wobei die Bindeaffinität umso höher ist, je größer der GC-Anteil innerhalb dieses Sequenzabschnittes ist. Mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes kann der Denaturierungszeitpunkt gemessen werden und als Peakprofil dargestellt werden. Zur Datenanalyse wurde die NavigatorTM Software Version 1.5.4 (Transgenomic) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung einer Datenbank zur Identifizierung klinisch relevanter Hefearten

3.1.1 Entwicklung und Bewertung der Datenbank

Zur Erschließung der bestehenden FTIR-Datenbank für den Bereich der klinischen Diagnostik musste zunächst eine Erweiterung um Spektren klinischer Isolate erfolgen. Da die lehrstuhleigene Stammsammlung vorwiegend Lebensmittelisolate enthält, wurden klinische Stämme, isoliert aus Patientenproben, von zwei externen Kooperationspartnern bezogen. Dies war das Mykologische Labor der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München sowie das Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums der RWTH Aachen. Alle erhaltenen Stämme waren im Vorfeld durch die im jeweiligen Labor etablierten Methoden identifiziert worden.

Eine Gesamtliste aller Stämme findet sich in Anhang A. Diese Liste umfasst weiterhin offizielle Sammlungsstämme für Arten, die neu in die Sammlung aufgenommen wurden. Insgesamt wurden 210 Stämme von 30 klinisch relevanten Arten zur Erweiterung und Validierung der FTIR-Datenbank verwendet. Im Zuge der Isolatsammlung wurde darauf geachtet, dass neben den häufig auftretenden *Candida*-Arten auch Arten selten auftretender Gattungen, wie *Cryptococcus* und *Trichosporon*, vertreten waren.

In Tabelle 3.1 ist ein Überblick über die verwendeten Spezies gegeben. Die Identität aller Stämme wurde nach Erhalt nochmals überprüft. Bei Arten, die bereits in der Datenbank enthalten waren, erfolgte dies mit Hilfe der bestehenden FTIR-Datenbank. Die Identität von Stämmen, deren Spezies nicht in der Datenbank enthalten war, wurde mittels 26S rDNS-Sequenzierung überprüft (Tabelle 3.1). Hierzu wurde eine HCA der FTIR-Spektren durchgeführt und anhand der sich ergebenden Clusterbildung repräsentative Stämme für eine Sequenzierung ausgewählt. Ebenso wurden einzelne atypische Stämme, deren Spektren nicht in ein Cluster mit Spektren anderer Stämmen der gleichen Art fielen, mittels 26S rDNS-Sequenzierung hinsichtlich ihrer Identität überprüft.

Tabelle 3.1: Stammübersicht über die klinisch relevanten Hefearten.

Spezies	Anzahl der Stämme insgesamt	Anzahl der sequenzierten Stämme
<i>C. africana</i>	11	5
<i>C. albicans</i>	74	13
<i>C. catenulata</i>	1	1
<i>C. dubliniensis</i>	14	9
<i>C. glabrata</i>	12	6
<i>C. inconspicua</i>	2	–
<i>C. parapsilosis</i>	12	7
<i>C. pararugosa</i>	1	1
<i>C. rugosa</i>	1	–
<i>C. tropicalis</i>	10	6
<i>C. zeylanoides</i>	6	6
<i>Cl. lusitaniae</i>	5	4
<i>Cr. albidus</i>	1	1
<i>Cr. carnescens</i>	1	1
<i>Cr. diffluens</i>	1	1
<i>Cr. laurentii</i>	2	2
<i>Cr. neoformans</i>	7	5
<i>Cr. terreus</i>	2	2
<i>Cr. uniguttulatus</i>	6	4
<i>D. hansenii</i>	5	3
<i>G. geotrichum</i>	5	–
<i>I. orientalis</i>	9	3
<i>K. marxianus</i>	2	–
<i>P. guilliermondii</i>	8	6
<i>P. jadinii</i>	2	2
<i>T. asahii</i>	3	3
<i>T. cutaneum</i>	1	–
<i>T. ovoides</i>	2	–
<i>Y. lipolytica</i>	4	4
30 Spezies	210	95

Die beiden nah verwandten Arten *C. albicans* und *C. africana* wiesen eine identische 26S rDNS-Sequenz auf und konnten auch nicht mittels aktuellen API-Systemen, in denen die Spezies *C. africana* nicht enthalten ist, differenziert werden. Da bislang auch keine *C. africana*-Spektren in der Datenbank hinterlegt sind,

wurde zur eindeutigen Differenzierung der beiden Arten eine HCA durchgeführt. Wie in Abbildung 3.1 beispielhaft für eine geringere Stammanzahl dargestellt, bildeten Stämme der beiden Spezies ein deutlich voneinander getrenntes Cluster im Dendrogramm. Zur Abschätzung des Differenzierungspotentials der FTIR-Spektroskopie wurden in Anlehnung an eine bereits veröffentlichte Studie [111] zusätzlich Spektren der ebenfalls nah verwandten Art *C. dubliniensis* in die HCA miteinbezogen. Diese Spektren wiesen eine geringere spektrale Distanz zu *C. albicans*-Spektren auf als die Spektren der *C. africana*-Stämme, bildeten aber nichtsdestotrotz ein getrenntes Cluster. Aufgrund der deutlich voneinander getrennten Cluster war die Zuordnung von Spektren zu einer dieser drei Arten und damit auch eine Differenzierung zwischen *C. albicans*- und *C. africana*-Stämmen möglich.

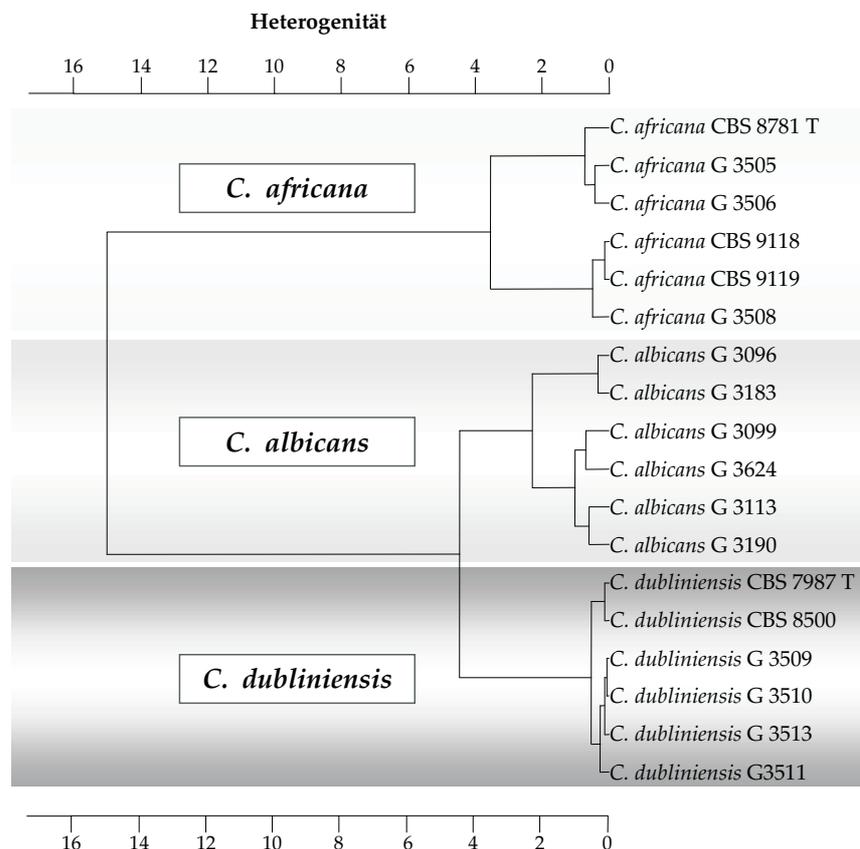


Abbildung 3.1: HCA der nahverwandten Arten *C. africana*, *C. albicans* und *C. dubliniensis*. Spektrale Fenster $3\,030\text{--}2\,800\text{ cm}^{-1}$, $1\,350\text{--}1\,200\text{ cm}^{-1}$, $900\text{--}700\text{ cm}^{-1}$, 2. Ableitung, Wards Algorithmus.

Das klinische Stammset wurde unter Berücksichtigung der in der bestehenden Datenbank bereits enthaltenen Art- und Stammzahlen in Referenz- und Validierungsstämme geteilt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass bei neu zu integrierenden Arten mehr Stämme zur Erweiterung der Datenbank als zur Validierung genutzt werden. So wurden beispielsweise mehr als 60 % der zur Verfügung stehenden *C. africana*- und *C. dubliniensis*-Stämme in die Datenbank integriert. Die Arten *C. inconspicua*, *T. cutaneum* und *T. ovoides* waren aufgrund der geringen Anzahl an klinischen Stämmen nicht in der Validierung vertreten. Aber auch bei einigen bereits in der Datenbank vertretenen Arten, wie *C. parapsilosis*, *C. glabrata* und *C. tropicalis* wurde eine höhere Anzahl an Stämmen zur Datenbanke Erweiterung verwendet, da die Spektren der klinischen Stämme deutliche Unterschiede zu Spektren von Stämmen aus dem Lebensmittelbereich aufwiesen. Bei *C. albicans* stand aufgrund des häufigen Vorkommens dieser Art eine sehr hohe Anzahl an Stämmen zur Verfügung. Anhand von HCA wurde jedoch eine geringe phänotypische Varianz festgestellt, die in Abbildung 3.1 anhand der geringen spektralen Heterogenität erkennbar ist. Daher wurden vorwiegend atypische Stämme in die Datenbank integriert und mehr als die Hälfte der Stämme für die Validierung verwendet.

Um das Potential der Datenbank testen zu können, wurden bei einigen selteneren Arten, trotz geringer Stammanzahl in der bestehenden Datenbank und geringer Anzahl an klinischen Stämmen, mehr Stämme für die Validierung verwendet. So wurden beispielsweise Spektren der Spezies *C. catenulata*, *C. pararugosa*, *C. rugosa*, *Cr. albidus*, *Cr. diffluens*, *Cr. carnescens* und *Tr. cutaneum*, von welchen jeweils nur ein Stamm aus Patientenproben vorhanden war, zur Validierung verwendet. Diese Arten waren jedoch, mit Ausnahme von *Cr. diffluens* und *Cr. carnescens* mit nur einem Stamm, bereits mit mindestens drei Stämmen in der Datenbank vertreten. Von den insgesamt 210 Stämmen wurden 107 Referenzstämme zur Erweiterung der Datenbank verwendet. Mit den verbleibenden 103 Stämmen wurde eine Validierung dieser Datenbank durchgeführt (Tabelle 3.2).

Zur Validierung der erweiterten Datenbank standen insgesamt 538 Spektren zur Verfügung. Wie aus Tabelle 3.3 hervorgeht, wurden 87,4 % dieser Spektren richtig identifiziert, 6,1 % nicht eindeutig und 6,5 % der Validierungsspektren wurden falsch identifiziert. Die Spektren von 12 Arten wurden zu 100 % richtig identifiziert, darunter waren die beiden häufig isolierten Arten *C. glabrata*

Tabelle 3.2: Stammübersicht zur Erweiterung und Validierung der Datenbank.

Spezies	Stammanzahl insgesamt	Stammanzahl für die Datenbank	Stammanzahl für die Validierung	Bisherige Stammanzahl in der Datenbank
<i>C. africana</i>	11	7	4	–
<i>C. albicans</i>	74	28	46	7
<i>C. catenulata</i>	1	–	1	3
<i>C. dubliniensis</i>	14	11	3	–
<i>C. glabrata</i>	12	8	4	19
<i>C. inconspicua</i>	2	2	–	3
<i>C. parapsilosis</i>	12	7	5	25
<i>C. pararugosa</i>	1	–	1	5
<i>C. rugosa</i>	1	–	1	7
<i>C. tropicalis</i>	10	5	5	15
<i>C. zeylanoides</i>	6	3	3	12
<i>Cl. lusitaniae</i>	5	3	2	19
<i>Cr. albidus</i>	1	–	1	8
<i>Cr. carnescens</i>	1	–	1	1
<i>Cr. diffluens</i>	1	–	1	1
<i>Cr. laurentii</i>	2	1	1	7
<i>Cr. neoformans</i>	7	5	2	–
<i>Cr. terreus</i>	2	1	1	–
<i>Cr. uniguttulatus</i>	6	3	3	–
<i>D. hansenii</i>	5	2	3	74
<i>G. geotrichum</i>	5	3	2	16
<i>I. orientalis</i>	9	4	5	134
<i>K. marxianus</i>	2	–	2	45
<i>P. guilliermondii</i>	8	5	3	35
<i>P. jadinii</i>	2	1	1	17
<i>T. asahii</i>	3	2	1	3
<i>T. cutaneum</i>	1	1	–	7
<i>T. ovoides</i>	2	2	–	20
<i>Y. lipolytica</i>	4	3	1	13
Summe	210	107	103	496

und *I. orientalis* sowie die vier neu integrierten Arten *C. africana*, *Cr. neoformans*, *Cr. terreus* und *Cr. uniguttulatus*. Die Validierungsspektren von vier Arten, darunter *C. albicans* und *C. parapsilosis*, wurden zu über 90% richtig identifiziert. Als einzige der häufig auftretenden Arten wurden Spektren von *C. tropicalis*-

Stämmen zu lediglich 44,1 % richtig identifiziert. Bei weniger häufigen Arten, die dementsprechend nur mit geringer Stammanzahl in der Datenbank vertreten sind, zeigten sich ebenfalls noch Schwachpunkte. So wurden bei sechs Arten alle Spektren nicht eindeutig bzw. falsch identifiziert. Bei den Arten *C. catenulata*, *Cr. carnescens* und *T. asahii* wurden sogar alle Spektren falsch identifiziert.

Tabelle 3.3: Validierungsergebnisse der Datenbank für klinisch relevante Hefearten.

Spezies	Gesamtanzahl der Spektren	korrekt identifizierte Spektren (%)	nicht eindeutig identifizierte Spektren (%)	falsch identifizierte Spektren (%)
<i>C. africana</i>	16	16 (100)	0	0
<i>C. albicans</i>	245	231 (94,3)	9 (3,7)	5 (2,0)
<i>C. catenulata</i>	8	0	0	8 (100)
<i>C. dubliniensis</i>	19	14 (73,7)	5 (26,3)	0
<i>C. glabrata</i>	34	34 (100)	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	42	39 (92,9)	2 (4,8)	1 (2,3)
<i>C. pararugosa</i>	4	0	1 (25,0)	3 (75,0)
<i>C. rugosa</i>	2	0	1 (50,0)	1 (50,0)
<i>C. tropicalis</i>	34	15 (44,1)	8 (23,5)	11 (32,4)
<i>C. zeylanoides</i>	14	13 (92,9)	1 (7,1)	0
<i>Cl. lusitaniae</i>	6	6 (100)	0	0
<i>Cr. albidus</i>	3	3 (100)	0	0
<i>Cr. carnescens</i>	3	0	0	3 (100)
<i>Cr. diffluens</i>	3	0	3 (100)	0
<i>Cr. laurentii</i>	4	3 (75,0)	1 (25,0)	0
<i>Cr. neoformans</i>	6	6 (100)	0	0
<i>Cr. terreus</i>	3	3 (100)	0	0
<i>Cr. uniguttulatus</i>	9	9 (100)	0	0
<i>D. hansenii</i>	9	9 (100)	0	0
<i>G. geotrichum</i>	16	16 (100)	0	0
<i>I. orientalis</i>	15	15 (100)	0	0
<i>K. marxianus</i>	20	19 (95,0)	1 (5,0)	0
<i>P. guilliermondii</i>	11	11 (100)	0	0
<i>P. jadinii</i>	3	3 (100)	0	0
<i>T. asahii</i>	3	0	0	3 (100)
<i>Y. lipolytica</i>	6	5 (83,3)	1 (16,7)	0
Summe	538	470 (87,4)	33 (6,1)	35 (6,5)

3.1.2 Vergleich mit API ID32C

Das API ID32C-System von bioMérieux kommt in der routinemäßigen Hefenidentifizierung der klinischen Diagnostik besonders häufig zum Einsatz. Es basiert auf der Assimilationsreaktion verschiedener Substrate, die anhand von Trübung visuell erkannt werden kann. Um dieses System mit der FTIR-Spektroskopie vergleichen zu können, wurden 50 Stämme, die zur Validierung der Datenbank verwendet wurden, parallel mit API ID32C identifiziert.

Die Auswahl der Stämme erfolgte in Anlehnung an die in aktuellen Studien veröffentlichten Daten zum Auftreten klinisch relevanter Arten [89, 101, 112]. So wurden vorwiegend Arten für diesen Test gewählt, die sich durch ein häufigeres Auftreten und damit verbunden einer größeren klinischen Signifikanz auszeichnen. Für *C. albicans* wurde daher eine besonders hohe Anzahl, die sowohl typische als auch atypische Stämme umfasst, ausgewählt. Ein Überblick der getesteten Stämme je Art findet sich in Tabelle 3.4. Zur Auswahl repräsentativer Stämme wurde jeweils eine HCA der FTIR-Spektren für Vertreter der gleichen Art durchgeführt. Basierend auf den sich bildenden Clustern wurden einzelne Stämme ausgesucht, sodass die phänotypische Varianz innerhalb der vorliegenden Arten möglichst abgedeckt wurde.

Die exakten Identifizierungsergebnisse für jeden Stamm sind in der Anhangstabelle A aufgeführt. Der Ansatz und die visuelle Auswertung der API-Teststreifen erfolgte entsprechend den Herstellerangaben nach 24 und 48 Stunden. Die Iden-

Tabelle 3.4: Stammübersicht für die Identifizierung mit API ID32C.

Spezies	Stammanzahl
<i>C. albicans</i>	20
<i>C. dubliniensis</i>	3
<i>C. glabrata</i>	4
<i>C. parapsilosis</i>	5
<i>C. tropicalis</i>	6
<i>Cl. lusitaniae</i>	2
<i>Cr. neoformans</i>	2
<i>Cr. uniguttulatus</i>	3
<i>I. orientalis</i>	5
9 Spezies	50

Tabelle 3.5: Übersicht der richtig identifizierten Stämme mittels FTIR-Datenbank und API ID32C.

Spezies	Stamm- anzahl im Test	FTIR- Datenbank (%)	API ID32C 24 Stunden (%)	API ID32C 48 Stunden (%)
<i>C. albicans</i>	20	19 (95,0)	12 (60,0)	20 (100)
<i>C. dubliniensis</i>	3	1 (33,3)	2 (66,7)	2 (66,7)
<i>C. glabrata</i>	4	4 (100,0)	1 (25,0)	4 (100,0)
<i>C. parapsilosis</i>	5	4 (80,0)	0	4 (80,0)
<i>C. tropicalis</i>	6	2 (33,3)	1 (16,7)	0
<i>Cl. lusitaniae</i>	2	2 (100,0)	0	0
<i>Cr. neoformans</i>	2	2 (100,0)	0	1 (50,0)
<i>Cr. uniguttulatus</i>	3	3 (100,0)	0	0
<i>I. orientalis</i>	5	5 (100,0)	5 (100,0)	5 (100,0)
9 Spezies	50	42 (84,0)	21 (42,0)	36 (72,0)

tifizierung erfolgte mittels apiweb Software, welche als Resultat die Arten angibt, deren Verwertungsschema die größte prozentuale Übereinstimmung zum vorliegenden Verwertungsmuster besitzen. Bei einer eindeutigen Identifizierung wird vom System der Speziesname mit der größten Übereinstimmung angegeben. Zusätzlich wird angezeigt, welche Art die zweitgrößte Übereinstimmung besitzt. Der prozentuale Abstand dieser beiden Namen läßt einen Rückschluss auf die Qualität der Identifizierung zu. Diese ist umso verlässlicher, je größer der Abstand zwischen den aufgeführten Arten ist. Bei nicht eindeutigen Identifizierungen tauchen mehrere Speziesnamen mit geringem prozentualen Abstand auf.

Im Gegensatz dazu wird bei der Identifizierung mittels FTIR-Datenbank für jedes Spektrum eine Liste der 12 ähnlichsten Referenzspektren mit absteigender spektraler Ähnlichkeit angezeigt. Da alle vorliegenden Spektren je Stamm mittels Datenbank identifiziert werden sollten, musste definiert werden, wann ein Stamm als korrekt bzw. falsch identifiziert gewertet wird. Dadurch konnte das Identifizierungsergebnis des API ID32C mit der Datenbankidentifizierung verglichen werden. So wurde im Vorfeld festgelegt, dass eine richtige Identifizierung des Stammes vorliegt, wenn für alle Spektren dieses Stammes an erster Position der Ergebnisliste die korrekte Artbezeichnung steht.

Mit Hilfe der FTIR-Datenbank wurden 42 (84,0 %) der insgesamt 50 getesteten

Stämme richtig identifiziert. Besonders hervorzuheben ist, dass fünf Arten zu 100 % richtig identifiziert wurden, darunter die beiden häufigen Arten *C. glabrata* und *I. orientalis*, aber auch die weniger häufigen Arten *Cl. lusitaniae*, *Cr. neoformans* und *Cr. uniguttulatus*. Bei *C. albicans* und *C. parapsilosis* wurde lediglich ein Stamm falsch identifiziert. Dagegen lag die Quote der korrekt identifizierten Stämme bei *C. dubliniensis* und *C. tropicalis* nur bei etwa 30 %.

Mittels API ID32C wurden nach 24 Stunden Inkubation lediglich 21 Stämme (42,0 %) richtig identifiziert. Die Anzahl der korrekt identifizierten Stämme stieg jedoch nach 48-stündiger Inkubation der API-Teststreifen auf 36 (72,0 %). So waren nach 48 Stunden drei der neun getesteten Arten zu 100 % richtig identifiziert. Anzumerken ist jedoch, dass ein *C. tropicalis*-Stamm nach 24 Stunden Inkubation richtig identifiziert wurde, nach 48 Stunden allerdings weitere für diese Art seltene positive Reaktionen auftraten, die schließlich zu einem falschen Endergebnis führten. Dieses Ergebnis konnte in zwei unabhängigen Experimenten reproduziert werden, der vorliegende Stamm stellt somit einen atypischen Vertreter dieser Spezies dar. Die guten Identifizierungsergebnisse mittels API ID32C beschränkten sich jedoch auf die häufig vorkommenden Arten *C. albicans*, *C. glabrata* und *I. orientalis*. Bei zwei Arten (*C. dubliniensis* und *Cr. neoformans*) wurden 50–60 % der Stämme richtig identifiziert. Die Stämme der drei Arten *C. tropicalis*, *Cl. lusitaniae* und *Cr. uniguttulatus* wurden alle falsch identifiziert.

Insgesamt wurden mehr Arten mittels FTIR-Datenbank richtig identifiziert als mittels API ID32C. Die Datenbankergebnisse weisen zudem keine komplett falsch identifizierten Arten auf. Während mit beiden Identifizierungssystemen ähnlich gute Ergebnisse für häufig auftretende Arten, wie *C. albicans* oder *C. glabrata* erzielt wurden, zeigten sich dagegen deutliche Unterschiede bei der Identifizierung weniger häufiger Arten, wie beispielsweise *Cl. lusitaniae*. Hier lag die Erfolgsrate der Datenbankidentifizierungen wesentlich höher als die der API-Identifizierungen.

3.2 Identifizierung der lebensmittelrelevanten Hefegattungen *Issatchenkia* und *Pichia*

Die Gattung *Pichia* zählt mit derzeit 91 beschriebenen Arten zu einer der größten beschriebenen Hefegattungen, die Gattung *Issatchenkia* dagegen stellt mit fünf bekannten Arten eine der kleinsten Hefegattungen dar [62]. Beide Gattungen sind im Lebensmittelbereich weit verbreitet und werden häufig aus unterschiedlichsten Produkten isoliert. Während einige Arten eine essentielle Rolle in der Produktion bestimmter Lebensmittel spielen, können andere Arten als Verderbsorganismen erheblichen Schaden verursachen. Eine eindeutige Identifizierung auf Artebene ist somit ein wichtiger Aspekt der Qualitätssicherung in diesem Bereich.

Für die Etablierung eines Identifizierungssystems basierend auf FTIR-Spektroskopie und KNN standen 237 Stämme zur Verfügung, die alle fünf derzeit beschriebenen *Issatchenkia*-Arten sowie die 16 häufigsten *Pichia*-Arten im Lebensmittelbereich repräsentieren (Tabelle 3.6). Die Auswahl der *Pichia*-Arten erfolgte in Anlehnung an eine Studie von Kurtzman & Robnett [64], in welcher die phylogenetischen Beziehungen von 500 Ascomyceten-Spezies mittels 26S rDNS-Analyse untersucht wurden. Hier wurde ein hoher Verwandtschaftsgrad zwischen den fünf *Issatchenkia*- und 11 *Pichia*-Arten, die größtenteils in Abhängigkeit ihrer Lebensmittelrelevanz in das System integriert wurden, festgestellt.

Bei der Auswahl der Stämme wurde die Häufigkeit der Spezies sowie deren Bedeutung berücksichtigt. So wurde darauf geachtet, dass beispielsweise bei der häufig auftretenden Art *I. orientalis*, die als Kahmhefe zu den Lebensmittelverderbern zählt und darüber hinaus auch als opportunistisch pathogene Hefe beschrieben ist, eine hohe Anzahl an Stämmen vertreten ist, um die phänotypische Biodiversität innerhalb der Art möglichst gut abzudecken.

Ein Großteil der Stämme konnte mit Hilfe der von Kümmerle [60] etablierten Datenbank, die zu diesem Zeitpunkt etwa 1 500 Spektren von 160 Arten umfasste, identifiziert werden. Bei etwa 35 % der Stämme konnte keine eindeutige Identifizierung mittels Datenbank erzielt werden. Daher wurde die Identität dieser Stämme durch 26S rDNS Sequenzierung ermittelt.

Tabelle 3.6: Übersicht über die mittels 26S rDNS Sequenzierung identifizierten Stämme der Gattungen *Issatchenkia* und *Pichia*.

Gattung	Art	Anzahl der Stämme insgesamt	Anzahl der sequenzierten Stämme
	<i>I. hanoiensis</i>	3	–
	<i>I. occidentalis</i>	13	8
	<i>I. orientalis</i>	142	36
	<i>I. scutulata</i>	8	–
	<i>I. terricola</i>	10	3
Summe	<i>Issatchenkia</i> 5 Arten	176	47
	<i>P. angusta</i>	13	3
	<i>P. anomala</i>	31	2
	<i>P. cactophila</i>	8	5
	<i>P. deserticola</i>	22	22
	<i>P. fabianii</i>	6	1
	<i>P. farinosa</i>	5	1
	<i>P. fermentans</i>	34	15
	<i>P. galeiformis</i>	7	3
	<i>P. guilliermondii</i>	30	6
	<i>P. jadinii</i>	12	3
	<i>P. kluyveri</i>	17	3
	<i>P. membranifaciens</i>	27	3
	<i>P. nakasei</i>	2	2
	<i>P. norvegensis</i>	9	5
	<i>P. pseudocactophila</i>	3	3
	<i>P. triangularis</i>	14	–
Summe	<i>Pichia</i> 16 Arten	240	77
Gesamt	21 Arten	416	124

3.2.1 26S rDNS-Sequenzierung

Für die Etablierung des KNN ist die eindeutige Identifikation aller Referenzstämme essentiell, da der Trainingsprozess des KNN einen Schritt zur Kalibrierung des Systems beinhaltet. Es erfolgte daher im Vorfeld die Identifizierung von insgesamt 124 Stämmen mittels 26S rDNS-Sequenzierung (Tabelle 3.6).

Die Datenbankrecherche mit BlastN bei NCBI ergab für alle sequenzierten Stämme ein eindeutiges Identifizierungsergebnis von 98–100 % Sequenzhomologie (Anhang B), wobei als ausschlaggebende Referenz ausschließlich von offiziell-

len Stammsammlungen hinterlegte Sequenzen betrachtet wurden.

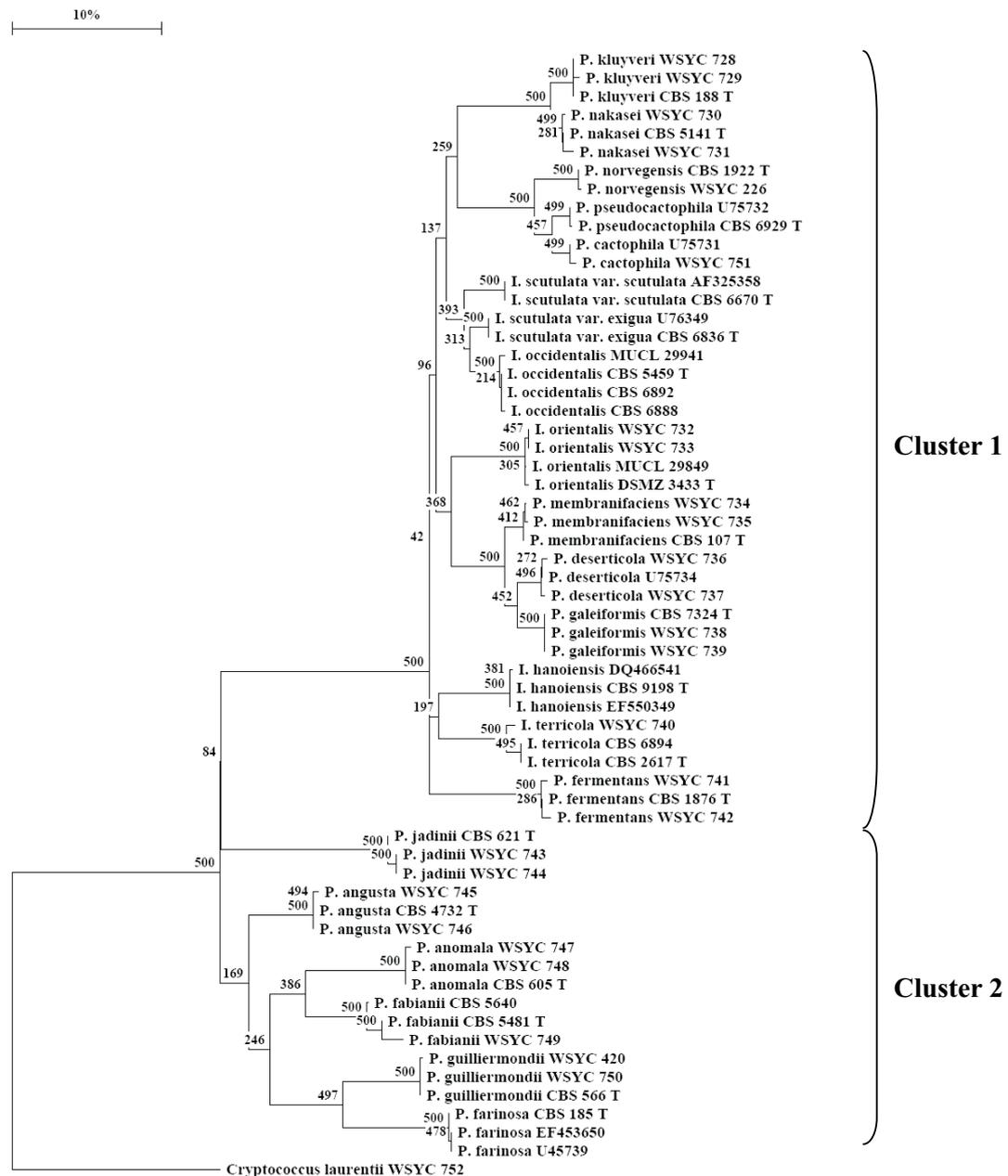


Abbildung 3.2: Phylogenetischer Baum nahverwandter *Issatchenkia*- und *Pichia*-Arten basierend auf 26S rDNS-Sequenzen. Die Berechnung erfolgte mittels Jukes-&-Cantor-Algorithmus, Neighbourjoining und Bootstrap 500. Als Außengruppe wurde der Stamm *Cr. laurentii* gewählt. Der Balken indiziert 10% Sequenzunterschied.

Mit Hilfe dieser 26S rDNS-Sequenzen wurden darüber hinaus phylogenetische Berechnungen durchgeführt, die Aufschluss über die Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der verwendeten Arten und damit einen Hinweis für den strukturellen Aufbau des KNN liefern sollten. In der entsprechenden Abbildung 3.2 ist deutlich erkennbar, dass Arten der Gattung *Issatchenkia* kein separates Cluster formen sondern eine gemischte Gruppe mit *Pichia*-Arten bilden (Cluster 1). Besonders die Spezies *I. orientalis* scheint genetisch aufgrund großer Ähnlichkeit der 26S rDNS-Sequenz näher zu den drei *Pichia*-Arten *P. membranifaciens*, *P. deserticola* und *P. galeiformis* verwandt zu sein, als zu den verbleibenden vier *Issatchenkia*-Arten.

Diese phylogenetischen Daten wurden mit einer HCA repräsentativer Spektren aller fünf *Issatchenkia*-Arten verglichen (Abbildung 3.3). Hierzu wurden die FTIR-Spektren von insgesamt 25 *Issatchenkia*-Stämmen offizieller Stammsammlungen verwendet, wobei pro Stamm ein Spektrum in die Berechnung einfluss. Die Spe-

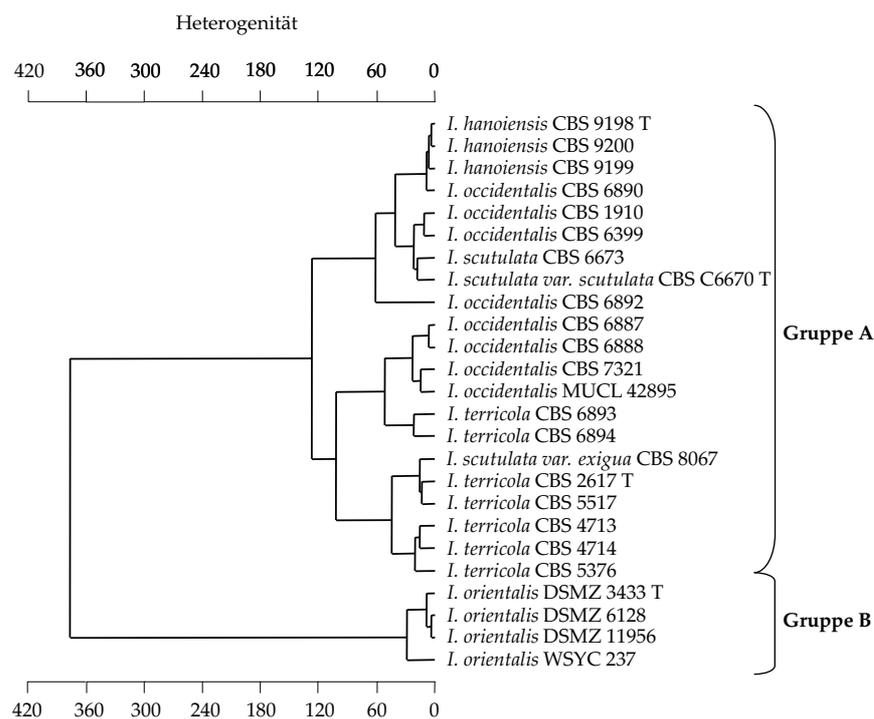


Abbildung 3.3: HCA der FTIR-Spektren von 25 *Issatchenkia*-Stämmen offizieller Stammsammlungen. Spektrale Fenster $3\,030\text{--}2\,800\text{ cm}^{-1}$, $1\,350\text{--}1\,200\text{ cm}^{-1}$, $900\text{--}700\text{ cm}^{-1}$, 2. Ableitung, Wards Algorithmus.

zies *I. orientalis* war durch vier Stämme vertreten, die beiden Arten *I. hanoiensis* sowie *I. scutulata* durch jeweils drei Stämme, *I. occidentalis* durch acht Stämme und *I. terricola* durch sieben Stämme. Ähnlich der phylogenetischen Analyse bilden die Spektren der *I. orientalis*-Stämme auch im Dendrogramm eine eigene Gruppe (Gruppe B), die einen großen spektralen Abstand zu den übrigen *Issatchenkia*-Arten (Gruppe A) aufweist.

3.2.2 Entwicklung und Bewertung des KNN

Zur Etablierung des KNN wurde die NeuroDeveloper Software® verwendet. Diese bietet den Vorteil, dass einzelne Subnetze in voneinander getrennten Trainingsprozessen trainiert werden und abschließend zu einem einzigen KNN miteinander verbunden werden können. Dadurch wird eine unabhängige Datenvorbehandlung und unabhängige Wahl der Trainingsparameter für jedes Subnetz ermöglicht [115]. Im Zuge der Datenvorbehandlung können so systematisch die Wellenzahlen mit dem größten Differenzierungspotential für die spezifischen Differenzierungsprobleme jedes Subnetzes ermittelt werden.

Training und struktureller Aufbau des KNN

Die Güte eines Systems zur Identifizierung von Mikroorganismen ist stark von der Qualität des Referenzdatensatzes abhängig. Aus diesem Grund wurde eine hohe Anzahl an Stämmen, die aus unterschiedlichsten Habitaten isoliert wurden, für die Etablierung des KNN genutzt (Anhang B). Dadurch wurde ein größtmöglicher Varianzbereich hinsichtlich der Biodiversität innerhalb der Arten abgedeckt. Insgesamt wurden 416 Stämme von 21 Arten als Referenzstämme zum Systemaufbau verwendet, wobei 237 von diesen Stämmen als Trainingsstämme eingesetzt und die verbleibenden 179 Stämme zur Validierung des Systems genutzt wurden (siehe Tabelle 3.7). Es wurde darauf geachtet, dass das Stammverhältnis zwischen den enthaltenen Arten so ausgeglichen wie möglich ist, um auch eine Identifizierung von Arten gewährleisten zu können, von denen eine geringere Anzahl an Stämmen verfügbar war. Eine Stammüberzahl einzelner Arten würde ansonsten zu Missidentifizierungen von unterrepräsentierten Arten führen.

Für die Identifizierung der nah verwandten *Issatchenkia*- und *Pichia*-Arten wurden insgesamt zehn Subnetze trainiert und miteinander verbunden. Der struk-

Tabelle 3.7: Stammübersicht zur Etablierung und Validierung des KNN.

Gattung	Art	Anzahl der Stämme insgesamt	Anzahl der Stämme im Training	Anzahl der Stämme in der Vali- dierung
	<i>I. hanoiensis</i>	3	3	–
	<i>I. occidentalis</i>	13	11	2
	<i>I. orientalis</i>	142	36	106
	<i>I. scutulata</i>	8	6	2
	<i>I. terricola</i>	10	8	2
<i>Issatchenkia</i>	5 Arten	176	64	112
	<i>P. angusta</i>	13	9	4
	<i>P. anomala</i>	31	18	13
	<i>P. cactophila</i>	8	7	1
	<i>P. deserticola</i>	22	14	8
	<i>P. fabianii</i>	6	5	1
	<i>P. farinosa</i>	5	4	1
	<i>P. fermentans</i>	34	22	12
	<i>P. galeiformis</i>	7	6	1
	<i>P. guilliermondii</i>	30	20	10
	<i>P. jadinii</i>	12	11	1
	<i>P. kluyveri</i>	17	14	3
	<i>P. membranifaciens</i>	27	21	6
	<i>P. nakasei</i>	2	2	–
	<i>P. norvegensis</i>	9	8	1
	<i>P. pseudocactophila</i>	3	3	–
	<i>P. triangularis</i>	14	9	5
<i>Pichia</i>	16 Arten	240	90	
Gesamt	21 Arten	416	237	179

turelle Aufbau des KNN ist in Abbildung 3.4 dargestellt und zeigt, dass diese zehn Subnetze in vier aufeinander folgenden Ebenen angeordnet sind. Die hierarchische Struktur wird jedoch nicht von der Trainingssoftware vorgegeben, sondern muss vom Benutzer erarbeitet werden. Dies geschieht in der Regel in Anlehnung an phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen und spektrale Ähnlichkeiten der vorliegenden Arten. So basiert die hier gewählte Struktur sowohl auf den Ergebnissen der 26S rDNS-Sequenzierung (Abbildung 3.2) als auch auf den Gruppierungen, die sich bei der Spektrenanalyse im Zuge der HCA (Abbil-

dung 3.3) ergeben haben.

Den Ergebnissen beider Analysen (Abbildung 3.2 und 3.3) entsprechend wurde die Spezies *I. orientalis* von den restlichen *Issatchenkia*-Arten getrennt und mit allen vertretenen *Pichia*-Arten in Gruppe zwei der ersten Ebene zusammengefasst (Abbildung 3.4). Die Artidentifizierung der verbleibenden vier *Issatchenkia*-Arten in Gruppe eins wurde auf der zweiten Ebene des KNN realisiert. Dagegen wurde Gruppe zwei in der darauffolgenden Ebene zwei aufgrund der großen Artanzahl und der dadurch bedingten großen Heterogenität erneut in zwei Untergruppen mit mehreren Arten unterteilt. Die Einteilung in eine *P. fermentans*-, sowie eine *P. anomala*-Gruppe entspricht den beiden Gruppierungen der phylogenetischen Analyse der 26S rDNS-Sequenz in Abbildung 3.2. Vertreter der *P. fermentans*-Gruppe bilden in Abbildung 3.2 Cluster 1, wohingegen die in der *P. anomala*-Gruppe zusammengefassten Arten den Spezies in Cluster 2 entsprechen. Aufgrund ihrer spektralen Ähnlichkeit zu Vertretern der *P. anomala*-Gruppe wurden die Arten *P. nakasei*, *P. cactophila* und *P. pseudocactophila* abweichend von den phylogenetischen Daten dieser Gruppe zugeordnet. Das Beispiel demonstriert, dass spektroskopische Daten nicht zwingend mit genetischen Daten zu Verwandtschaftsbeziehungen übereinstimmen müssen. Der Einsatz von FTIR-Spektroskopie zur Analyse genetischer Ähnlichkeitsbeziehungen ist daher nicht geeignet.

Auf Ebene drei des KNN konnten bereits fünf Vertreter der *P. anomala*-Gruppe auf Artebene identifiziert werden, was größeren Unterschieden in der 26S rDNS-Sequenz entspricht (vgl. Abbildung 3.2). *P. angusta*- und *P. jadinii*-Sequenzen waren innerhalb des Cluster 2 deutlich getrennt, wogegen *P. fabianii*- und *P. anomala*-Sequenzen eine höhere Homologie aufwiesen. Dies spiegelte sich auch in einer großen spektralen Ähnlichkeit zwischen *P. fabianii*- und *P. anomala*-Stämmen wider, die eine Trennung der Spektren mittels HCA nicht zuließ. In Bezug auf das KNN war daher eine weitere vierte Ebene zur Unterscheidung dieser Arten notwendig. Die Artidentifizierung von *P. cactophila* und *P. pseudocactophila* erfolgte ebenfalls erst auf der vierten Ebene des KNN, da diese beiden Arten die größte Homologie hinsichtlich ihrer 26S rDNS-Sequenz (siehe Abbildung 3.2) und zugleich sehr große spektrale Ähnlichkeit aufwiesen.

Im Gegensatz zur *P. anomala*-Gruppe konnte kein Vertreter der *P. fermentans*-Gruppe auf der dritten Ebene des KNN identifiziert werden, weshalb eine wei-

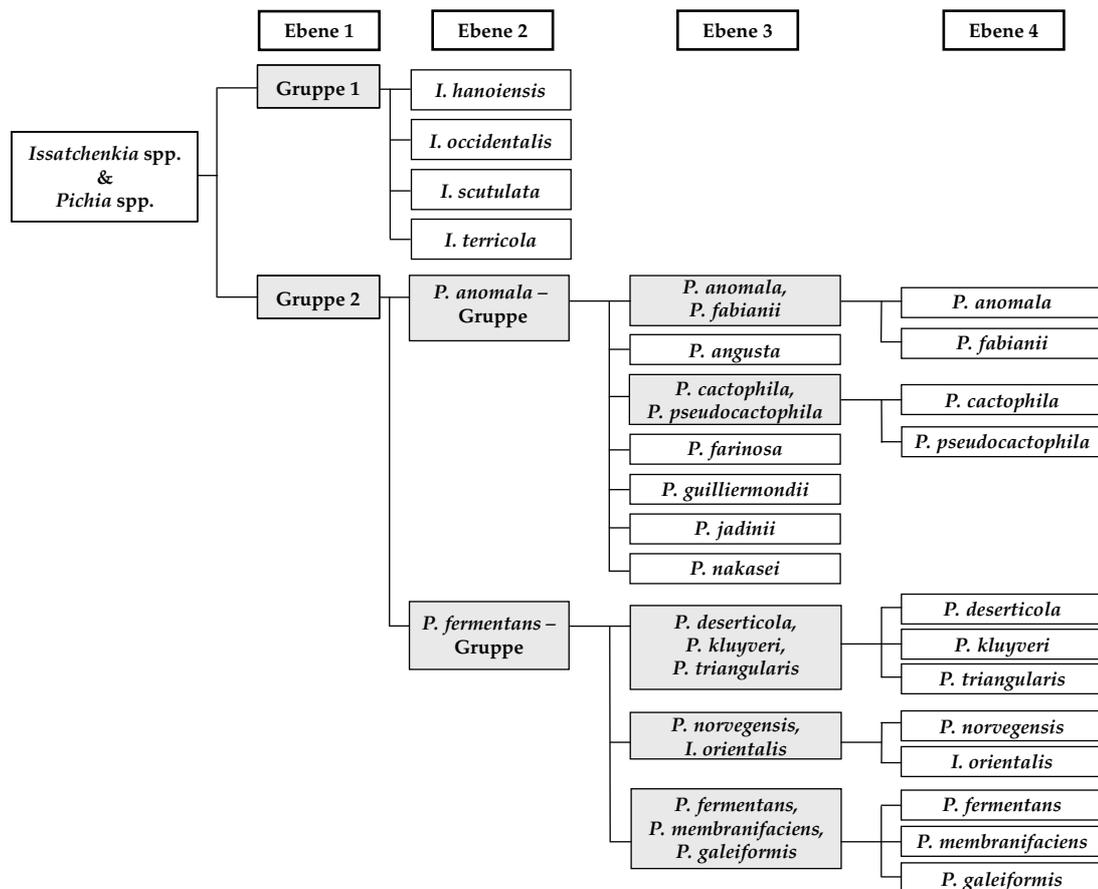


Abbildung 3.4: Hierarchische Struktur des KNN zur Differenzierung nah verwandter *Issatchenkia*- und *Pichia*-Arten. Das System umfasst zehn Subnetze, die auf vier Ebenen verteilt sind. Jedes Subnetz (grau markiert) ist speziell optimiert für die Unterscheidung der in ihm enthaltenen Arten.

tere Unterteilung der enthaltenen Arten in Untergruppen erfolgte. Dies ist auf eine sehr große Ähnlichkeit der 26S rDNS-Sequenzen der in dieser Gruppe zusammengefassten Arten zurückzuführen. Die Einteilung in die drei Untergruppen erfolgte daher ausschließlich anhand von Gruppierungen einer HCA der Spektren. Die Identifizierung der Arten wurde auf der vierten Ebene des KNN realisiert.

Validierung des KNN

Zur Prüfung der Funktionsfähigkeit sowie der Verlässlichkeit des KNN wurden zwei unterschiedliche Validierungsdatensätze verwendet. Zunächst wurde dem

Tabelle 3.8: Ergebnisse der internen Validierung des KNN.

Gattung	Gesamt- anzahl der Spektren	korrekt identifizierte Spektren (%)	nicht identifizierte Spektren (%)	falsch identifizierte Spektren (%)
<i>Issatchenkia</i>	64	64 (100,0)	0 (0)	0 (0)
<i>Pichia</i>	173	171 (98,8)	2 (1,1)	0 (0)
Summe	237	235 (99,2)	2 (0,8)	0 (0)

Netz in einer internen Validierung ein Spektrum jedes Referenzstammes präsentiert, das nicht im Trainingsdatensatz enthalten war. Zur Durchführung dieses Tests wurden dementsprechend insgesamt 237 Spektren verwendet, von denen 99,2 % richtig zugeordnet wurden (Tabelle 3.8).

Um die Funktionsfähigkeit des KNN in der Praxis zu testen, wurde daraufhin eine externe Validierung durchgeführt. Da hierbei 1 608 Spektren von 179 Stämmen verwendet wurden, die nicht im Training enthalten waren (siehe Tabelle 3.7) und dem Netz daher völlig unbekannt waren, stellt dies einen realistischeren Test als die interne Validierung dar. Wie in Tabelle 3.9 aufgeführt, wurden 98,6 % der Spektren korrekt identifiziert.

Neun der insgesamt 18 Arten, die in der externen Validierung vertreten waren, wurden zu 100 % korrekt identifiziert. Dies waren Stämme der Arten *I. occidentalis*, *I. scutulata*, *I. terricola*, *P. anomala*, *P. galeiformis*, *P. guilliermondii*, *P. jadinii*, *P. kluyveri* und *P. membranifaciens*. Lediglich 23 Spektren wurden nicht korrekt zugeordnet, von welchen 9 falsch und 14 nicht identifiziert wurden.

Tabelle 3.9: Ergebnisse der externen Validierung des KNN.

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

3.3 Differenzierung von ubiquitären und probiotischen

S. cerevisiae aus Futtermitteln

Einen weiteren Aspekt der vorliegenden Arbeit beinhaltete die Etablierung eines zuverlässigen Systems zur Identifizierung von Hefen aus Futtermitteln, welches zugleich zur Differenzierung der fünf zugelassenen probiotischen *S. cerevisiae* (CNCM I-1079, CNCM I-1077, NCYC 1026, NCYC Sc47, MUCL 39885) und ubiquitärer Stämme genutzt werden kann. Hierzu wurden insgesamt 173 *S. cerevisiae*-Isolate verwendet. Diese setzten sich aus 67 ubiquitären Isolaten aus Futtermitteln, Lebensmitteln und der Umwelt sowie aus 106 Isolaten der fünf zugelassenen Futtermittelzusatzstoffe zusammen (Anhang C). Die Isolate der probiotischen Stämme wurden unabhängig voneinander aus unterschiedlichen Futtermittelzusatzproben und Stammkonzentraten an der Staatlichen Betriebsgesellschaft für Umwelt und Landwirtschaft (Leipzig) durch Dr. Henriette Mietke-Hofmann isoliert und mittels dort etablierter Methoden identifiziert. Für diese Futtermittelzusatzproben und Stammkonzentrate waren genaue Angaben zum jeweils enthaltenen Probiotikum vorhanden, sodass die Isolate bereits im Vorfeld dem jeweiligen probiotischen Stamm zugeordnet werden konnten. Diese Angaben dienten als Referenz für die Etablierung der hier angewandten Methoden.

Da zu Beginn der Arbeit die Isolatanzahl zwischen den probiotischen Stämmen stark unterschiedlich war, wurden 11 dieser Isolate als Linien bereits isolierter *S. cerevisiae* angezogen (siehe Anhang C). Hierzu wurde je Stamm eine Einzelkolonie gepickt, als Linie definiert und mit eigener Sammlungsnummer in der Glycerinstammsammlung abgelegt. Die Identität aller Isolate wurde mit Hilfe der abteilungseigenen Datenbank zur Identifizierung von Hefen überprüft und in allen Fällen eindeutig als *S. cerevisiae* bestätigt.

Da bereits Studien zur Stammtypisierung von medizinisch relevanten Hefearten basierend auf der HCA von FTIR-Spektren bekannt sind [32, 100, 113], wurde auch das Potential der FTIR-Spektroskopie ohne KNN geprüft. Die HCA (Abbildung 3.5) zeigte jedoch, dass sich Spektren ubiquitärer und probiotischer *S. cerevisiae*-Isolate mischen. Darüberhinaus gruppierten sich auch die Spektren von vier der fünf Probiotika in gemischten Clustern. Für eine erfolgreiche Stammdifferenzierung probiotischer und ubiquitärer *S. cerevisiae* musste daher eine Kombination von FTIR-Spektroskopie und KNN eingesetzt werden.

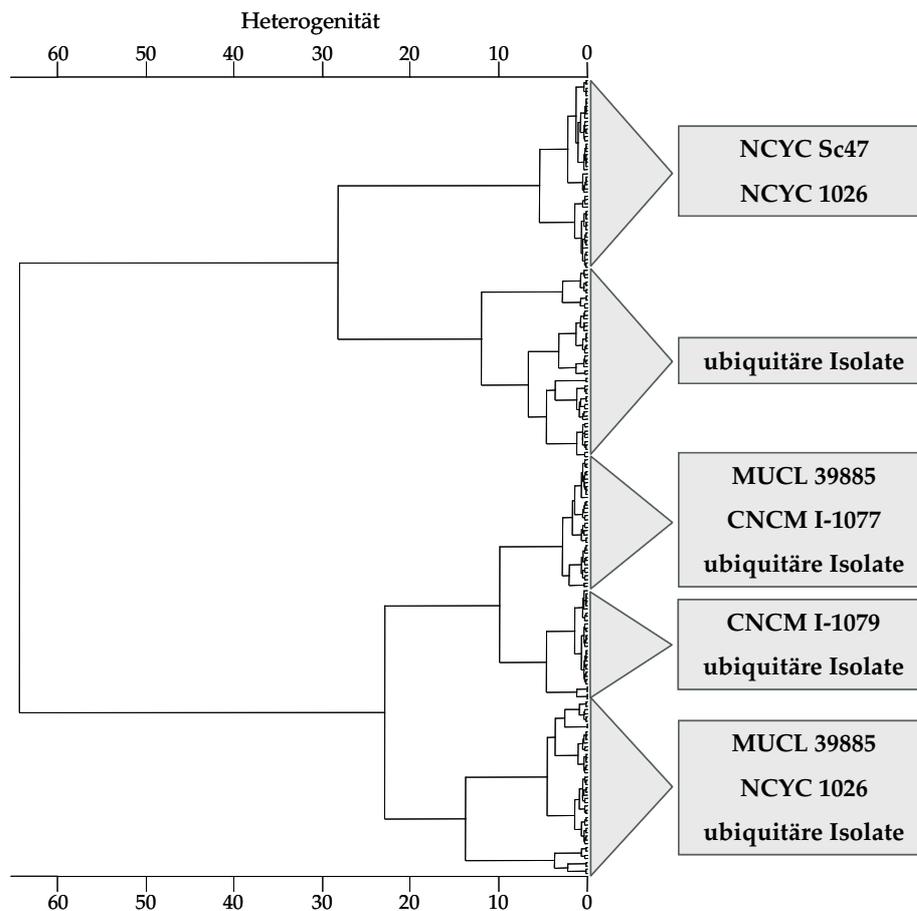


Abbildung 3.5: HCA von 63 probiotischen und 45 ubiquitären *S. cerevisiae*-Isolaten. Spektrale Fenster $3\,030\text{--}2\,800\text{ cm}^{-1}$, $1\,350\text{--}1\,200\text{ cm}^{-1}$, $900\text{--}700\text{ cm}^{-1}$, 2. Ableitung, Wards Algorithmus.

Für die Etablierung des KNN ist die exakte Klassifizierung der Isolate, die in den Trainingsprozess des Systems eingebunden werden, von besonderer Bedeutung. Als Referenzmethoden zur Stammtypisierung von *S. cerevisiae* wurden daher mehrere molekularbiologische Techniken hinsichtlich ihrer Eignung geprüft.

Zunächst wurden zwei auf PCR basierende Methoden getestet – eine PCR mit anschließender Restriktionsanalyse unter Verwendung eines *Staphylococcus aureus*-Enzyms [17] sowie eine RAPD-Analyse mit universellen M13-Primern [3]. Beide Methoden konnten allerdings aufgrund unzureichender Sensitivität bzw. Reproduzierbarkeit nicht angewandt werden. Basierend auf den erfolgreichen Ergebnissen weiterer Tests wurde stattdessen neben einer dHPLC-Analyse [51], eine δ -PCR-Analyse [80] ausgewählt.

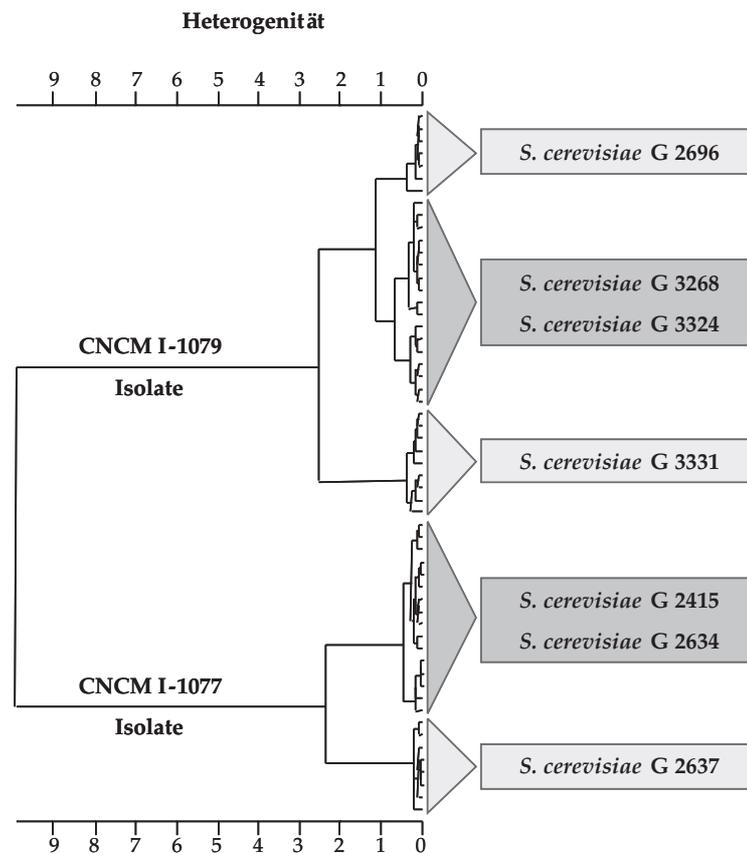


Abbildung 3.6: HCA der FTIR-Spektren von sieben probiotischen Isolaten. Je Isolat wurden mindestens sieben Spektren zur Berechnung verwendet. Cluster, in denen sich die Spektren unterschiedlicher Isolate untereinander mischten sind dunkelgrau hinterlegt. Aus diesen gemischten Clustern wurde je ein Isolat für die Analyse mittels Referenzmethode repräsentativ ausgewählt.

Beide Methoden wurden an einem Isolatset probiotischer und ubiquitärer *S. cerevisiae* (Tabelle 3.10) durchgeführt. Die Wahl repräsentativer Isolate für jeden probiotischen Stamm basierte auf der HCA der Spektren. Dies ist beispielhaft in Abbildung 3.6 dargestellt. Darin bilden die beiden CNCM I-1079-Isolate G 3268 und G 3324, sowie die beiden CNCM I-1077-Isolate G 2415 und G 2634 jeweils ein gemischtes Cluster, in welchem keine Trennung der Spektren nach Stämmen vorliegt. Aufgrund dieser hohen spektralen Ähnlichkeit wurde je Cluster nur ein Isolat, in diesem Fall G 3324 und G 2634, repräsentativ für die Analysen mittels dHPLC bzw. δ -PCR ausgewählt.

Tabelle 3.10: Auswahl von *S. cerevisiae*-Stämmen zur molekularbiologischen Stammtypisierung.

<i>S. cerevisiae</i> -Stämme	Anzahl der Isolate insgesamt	Anzahl der Isolate der dHPLC-Analyse	Anzahl der Isolate der δ -PCR-Analyse
CNCM I-1077	24	6	5
CNCM I-1079	19	7	5
MUCL 39885	18	14	11
NCYC 1026	29	9	3
NCYC Sc47	16	12	3
Summe 5 probiotische Stämme	106	48	27
ubiquitäre Stämme	67	20	4
Gesamt	173	68	31

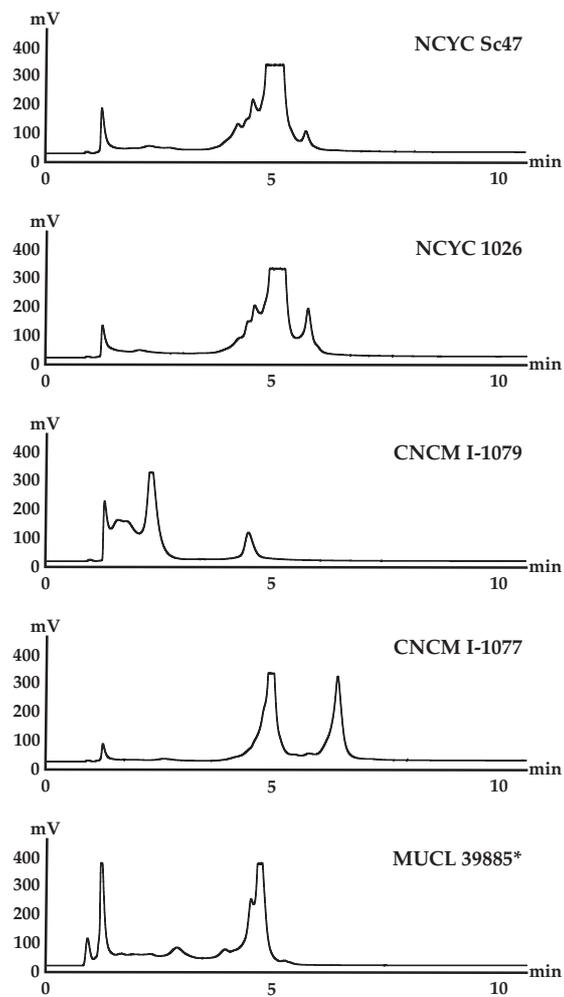
3.3.1 Stammtypisierung mittels dHPLC

Um ein möglichst zuverlässiges Stammtypisierungsergebnis zu erhalten, wurde die denaturierende Hochleistungschromatographie (dHPLC) als zusätzliche Referenztechnik zur Differenzierung von *S. cerevisiae*-Stämmen etabliert. Diese Methode zeichnet sich durch hohe Sensitivität aus und wurde bereits erfolgreich zur Identifizierung auf Art- und auch auf Stammebene eingesetzt [43,44,52].

Nach dem in dieser Studie angewandten Protokoll wurde zunächst ein Abschnitt der IGS 2-Region amplifiziert, der in Abbildung 2.1 durch die beiden für *S. cerevisiae*-spezifischen Primer IGS-2 fp und IGS-2 rp gekennzeichnet ist. Dieser eignet sich durch den hohen Grad an Sequenz-Polymorphismus sehr gut zur Stammtypisierung von *S. cerevisiae* [51]. Während der dHPLC wird das Fragment über eine Säule temperaturbedingt aufgetrennt und mittels Pufferlösungen abgewaschen. Aufgrund der polymorphen DNS-Sequenz kann das Fragment unterschiedlich stark an die Säule binden, wobei die Bindeaffinität umso höher ist, je größer der GC-Anteil innerhalb dieses Sequenzabschnittes ist. Mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes kann der Denaturierungszeitpunkt gemessen und als Peakprofil dargestellt werden.

Insgesamt wurden 68 *S. cerevisiae*-Isolate, davon 48 probiotische und 20 ubiquitäre Isolate (Tabelle 3.10), mittels dHPLC im unabhängigen Doppelansatz untersucht. Die Peakprofile waren in beiden unabhängigen Experimenten für jedes

A Probiotische Isolate



B Ubiquitäre Isolate

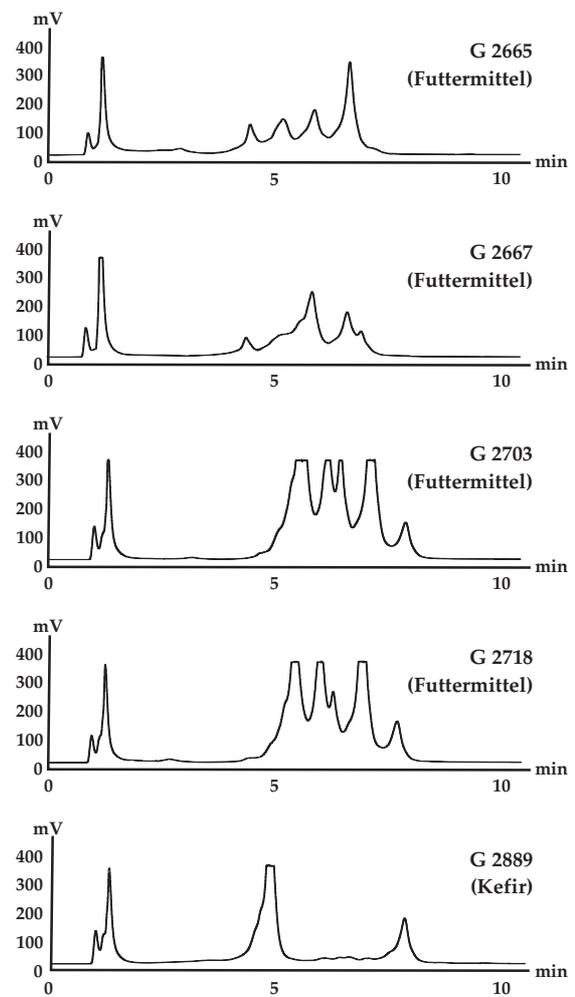


Abbildung 3.7: Repräsentative dHPLC-Peakprofile der fünf zugelassenen probiotischen *S. cerevisiae*-Futtermittelzusatzstämmen (Abbildungsteil A) sowie von fünf ubiquitären Isolatens aus unterschiedlichen Habitaten (Abbildungsteil B). MUCL 39885*: Präparat Biosprint S

Isolat reproduzierbar und sind in Abbildung 3.7 repräsentativ dargestellt. Die Abbildung zeigt die Peakprofile der fünf probiotischen Isolate (Abbildungsteil A) sowie von fünf ubiquitären Isolaten (Abbildungsteil B). Die dHPLC-Profile weiterer 15 ubiquitärer *S. cerevisiae* sind in Anhang D dargestellt.

Zwischen den dHPLC-Peakprofilen probiotischer und ubiquitärer Isolate sind deutliche Unterschiede erkennbar. Im Gegensatz zu den ubiquitären Isolaten, die eine Vielzahl an Peaks aufweisen, sind die Peakprofile der probiotischen Isolate durch eine geringe Anzahl an Peaks gekennzeichnet. Weiterhin zeigte sich in den Peakprofilen, dass die wenigen Hauptpeaks der probiotischen Isolate nach etwa 5 Minuten ab dem Zeitpunkt des dHPLC-Starts auftraten, wogegen die Peaks der ubiquitären Isolate sich über den gesamten Zeitabschnitt bis 10 Minuten verteilten.

Da alle untersuchten Isolate eines probiotischen Stammes identische Peakprofile aufwiesen, die jedoch zwischen den Stämmen unterschiedlich waren, ist die Zuordnung eines Isolates zu einem probiotischen Futtermittelzusatzstoff basierend auf den dHPLC-Profilen möglich. Lediglich die beiden probiotischen NCYC-Stämme wiesen sehr ähnliche Peakprofile auf, die eine Unterscheidung zwischen NCYC 1026- und NCYC Sc47-Isolaten nicht zuließ. Schwach erkennbare Nebenpeaks nach 4,5 und 5,5 Minuten (Abbildung 3.7) wurden nicht für alle untersuchten Isolate des jeweiligen Stammes erhalten.

Die Zuordnung der restlichen 45 Referenzisolate konnte für Isolate der Stämme CNCM I-1079, CNCM I-1077 und MUCL 39885 anhand übereinstimmender, aber zwischen den Probiotika deutlich unterschiedlicher Peakprofile erzielt werden. Die Isolate der mittels dHPLC nicht zu trennenden Stämme NCYC 1026 und NCYC Sc47 wurden in einer Gruppe zusammengefasst.

3.3.2 Stammtypisierung mittels δ -PCR

Zur zusätzlichen Überprüfung der dHPLC-Ergebnisse wurde als zweite molekularbiologische Methode die δ -PCR nach Ness [80] für eine kleinere Anzahl von 31 ausgewählten *S. cerevisiae*-Isolaten eingesetzt. Die Anwendung dieser Methode zur Stammdifferenzierung von *S. cerevisiae* wurde schon mehrfach beschrieben [67, 70, 71, 80]. Amplifiziert werden hierbei kurze direkt wiederholte DNS-Sequenzen – die δ -Elemente. Diese besitzen eine Größe von etwa 300 bp und

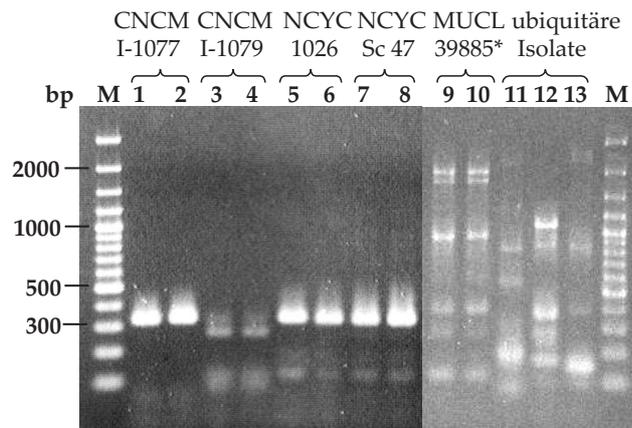


Abbildung 3.8: Fragmentmuster der δ -PCR der fünf zugelassenen probiotischen *S. cerevisiae* (Bahn 1–10) und drei ubiquitären Isolate (Bahn 11–13). Die ubiquitären Isolate stammen aus Kefir (Bahn 11), Zuckerrübenpressschnitzel (Bahn 12) und Flüssigfuttermittel (Bahn 13). M: GeneRuler™ 100 bp Plus DNS Ladder (Fermentas); * Futtermittelzusatz Biosprint S

flankieren das TY1-Retrotransposon [11, 12]. Jedes *S. cerevisiae*-Genom enthält ca. 100 Kopien dieser δ -Elemente mit einer statistischen Verteilung von einem Element je 150 kb. Die jeweils vorliegende Kopienzahl sowie deren Verteilung sind spezifisch für jeden einzelnen Stamm und führen in der PCR-Analyse mit δ -Primern zu unterschiedlichen Fragmentmustern, was eine Stammunterscheidung ermöglicht.

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu testen, wurden zwei getrennte DNS-Isolationen für jedes Isolat durchgeführt. Die PCR-Reaktion selbst erfolgte je DNS-Isolat im unabhängigen Doppelansatz. Das sich ergebende Fragmentmuster war je Isolat bei allen PCR-Ansätzen identisch und ist in Abbildung 3.8 für ein repräsentatives Isolatset dargestellt.

Für die fünf probiotischen Stämme ließen sich vier unterschiedliche Bandenmuster erkennen, die sich aufgrund geringerer Fragmentzahl deutlich von den ubiquitären Isolaten unterschieden (Abbildung 3.8). Einzige Ausnahme stellten Isolate des Probiotikums MUCL 39885 dar, deren Fragmentmuster eine höhere Anzahl an Fragmenten aufwies, als das Muster der anderen vier Probiotika. Es konnte reproduzierbar gezeigt werden, dass die einzelnen Fragmentgrößen für alle untersuchten Isolate eines probiotischen Stammes stabil waren. Diese

Fragmentmuster waren für vier der fünf Probiotika unterschiedlich, was die Zuordnung der Isolate zu einem probiotischen Futtermittelzusatz und folglich deren Unterscheidung ermöglichte. Einzig Isolate der beiden NCYC-Stämme ergaben gleiche Muster, was eine Differenzierung zwischen NCYC 1026- und NCYC Sc47-Isolaten auch mittels δ -PCR-Analyse nicht ermöglichte. Die Ergebnisse der dHPLC-Analyse konnten somit durch Anwendung der δ -PCR bestätigt werden.

3.3.3 Entwicklung und Bewertung des KNN

Training und struktureller Aufbau des KNN

Zur Etablierung des Systems wurden 173 Isolate probiotischer und ubiquitärer *S. cerevisiae*-Stämme verwendet. Als Trainingsstämme wurden 108 Isolate eingesetzt, die verbleibenden 65 Isolate wurden zur Validierung des Systems genutzt (siehe Tabelle 3.11). Im Vorfeld der Arbeit wurden alle Isolate mit Hilfe der bestehenden Datenbank zur Identifizierung von Hefen [60] hinsichtlich ihrer Identität geprüft und eindeutig als *S. cerevisiae* bestätigt.

Zur Verbesserung der Qualitätsbeurteilung von Futtermitteln ist es wichtig, probiotische und ubiquitäre *S. cerevisiae* eindeutig unterscheiden zu können. Dieses Ziel wurde in den strukturellen Aufbau des KNN miteinbezogen, ebenso die Ergebnisse der dHPLC- und δ -PCR-Analysen, die die Grundlage für eine Unterscheidung der probiotischen Stämme untereinander darstellten. Basierend auf

Tabelle 3.11: Stammübersicht zur Etablierung und Validierung des KNN.

<i>S. cerevisiae</i> -Stämme	Anzahl der Isolate insgesamt	Anzahl der Isolate im Training	Anzahl der Isolate in der Validierung
CNCM I-1077	24	12	12
CNCM I-1079	19	13	6
MUCL 39885	18	12	6
NCYC 1026	29	14	15
NCYC Sc47	16	12	4
Summe 5 probiotische Stämme	106	63	43
ubiquitäre Stämme	67	45	22
Gesamt	173	108	65

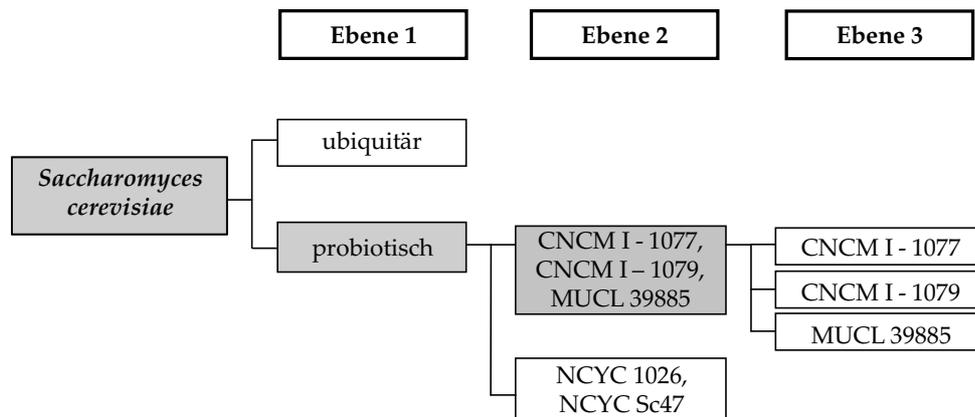


Abbildung 3.9: Erste Strukturvariante des KNN zur Differenzierung probiotischer und ubiquitärer *S. cerevisiae*. Das System umfasst das Top-levelnetz zur Unterscheidung zwischen probiotischen und ubiquitären Stämmen sowie zwei Subnetze (grau hinterlegt) auf den folgenden beiden Ebenen.

diesen Ergebnissen wurden zwei mögliche Netzstrukturen getestet. Bei beiden Varianten findet auf der ersten Ebene eine Unterscheidung zwischen probiotischen und ubiquitären *S. cerevisiae* statt (Abbildungen 3.9 und 3.10). Eine weiterführende Differenzierung zwischen den probiotischen Stämmen erfolgt auf den darauf folgenden Ebenen, wobei die beiden NCYC-Stämme in beiden Strukturvarianten eine gemeinsame Klasse bilden, da keine Differenzierung zwischen NCYC Sc47 und NCYC 1026 mit Hilfe der Referenzmethoden möglich war.

Die erste Struktur wurde in Anlehnung an die Gruppierung in der HCA der FTIR-Spektren (Abbildung 3.11) gewählt. Zur Berechnung des Dendrogramms wurden je zwei Spektren aller 108 Isolate, die im Trainingsdatensatz des KNN enthalten waren, verwendet.

In Abbildung 3.11 lassen sich deutlich vier Cluster mit einer größeren spektralen Distanz zueinander erkennen. Mit Ausnahme zweier NCYC 1026-Isolate, deren Spektren sich in eine Gruppe mit Spektren von MUCL 39885-Isolaten eingliederten, bildeten die beiden NCYC-Stämme ein gesondertes Cluster mit einer großen spektralen Distanz zu den restlichen drei Clustern. Die Spektren der MUCL 39885-Isolate teilten sich ebenfalls auf zwei Cluster auf und mischten sich mit den bereits erwähnten NCYC 1026-Spektren, aber auch mit Spektren der CNCM I-1077-Isolate. Lediglich Spektren der CNCM I-1079-Isolate bildeten ein

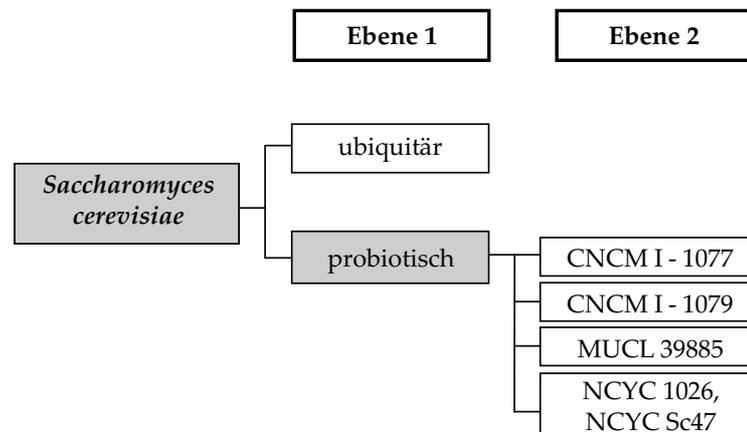


Abbildung 3.10: Zweite Strukturvariante des KNN zur Differenzierung probiotischer und ubiquitärer *S. cerevisiae*. Das System umfasst zwei Subnetze (grau hinterlegt) auf zwei aufeinander folgenden Ebenen.

gesondertes Cluster ohne sich mit Spektren anderer Probiotika zu mischen.

Diesen Gruppierungen entsprechend (Abbildung 3.11), wurde in der ersten Variante der KNN-Struktur eine Teilung in zwei probiotische Gruppen innerhalb der zweiten Ebene vorgenommen. In der ersten Gruppe wurden die Probiotika CNCM I-1077, CNCM I-1079 und MUCL 39885 zusammengefasst, in der zweiten Gruppe die beiden NCYC-Stämme. Durch eine zusätzliche dritte Ebene sollte die Differenzierung zwischen MUCL 39885 und den beiden Stämmen CNCM I-1077 und CNCM I-1079 realisiert werden (Abbildung 3.9). Dieses KNN setzt sich folglich aus drei Einzelnetzen für die drei Ebenen zusammen.

Parallel wurde eine zweite Strukturvariante getestet, die die Unterscheidung zwischen den probiotischen Stämmen MUCL 39885, CNCM I-1077 und CNCM I-1079 bereits auf der zweiten Ebene vorsieht. Für diese Variante wurden somit zwei Subnetze trainiert und zu einem Gesamtnetz mit zwei aufeinander folgenden Ebenen verbunden (Abbildung 3.10).

Validierung der KNN-Varianten

Um beide KNN-Strukturvarianten auf ihre Funktionsfähigkeit zu überprüfen und zu vergleichen, wurden beide Systeme einer internen und externen Validierung mit den gleichen Spektren unterzogen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Wahl der endgültigen KNN-Struktur getroffen.

Für die interne Validierung wurden bei beiden KNN-Varianten 108 Spektren

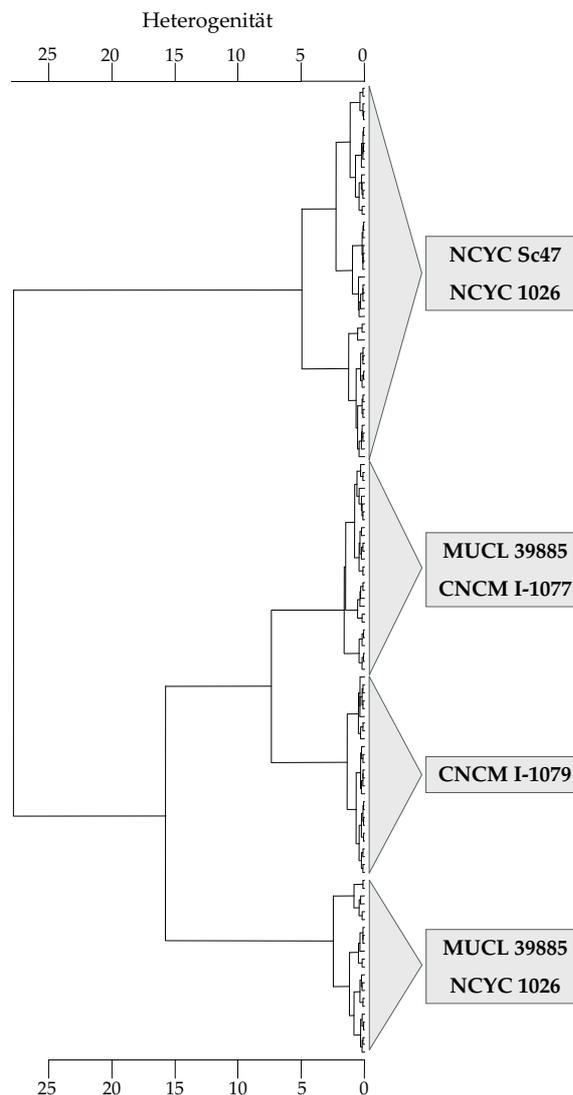


Abbildung 3.11: HCA der probiotischen *S. cerevisiae*-Trainingsisolate. Spektrale Fenster $3\,030\text{--}2\,800\text{ cm}^{-1}$, $1\,350\text{--}1\,200\text{ cm}^{-1}$, $900\text{--}700\text{ cm}^{-1}$, 2. Ableitung, Wards Algorithmus.

verwendet, wobei das Ergebnis identisch war mit jeweils 107 (99,1%) richtig zugeordneten Spektren (Abbildung 3.12). In beiden Validierungen konnte lediglich ein Spektrum eines ubiquitären Stammes keiner der gegebenen Klassen zugeordnet werden, somit wurde kein Spektrum falsch identifiziert.

Die externe Validierung wurde mit 965 Spektren von 65 Isolaten, die nicht im Training enthalten waren, durchgeführt (Tabelle 3.11). Wie in Abbildung 3.12 dargestellt, wurden in der ersten Variante des KNN mit insgesamt drei Ebenen 905

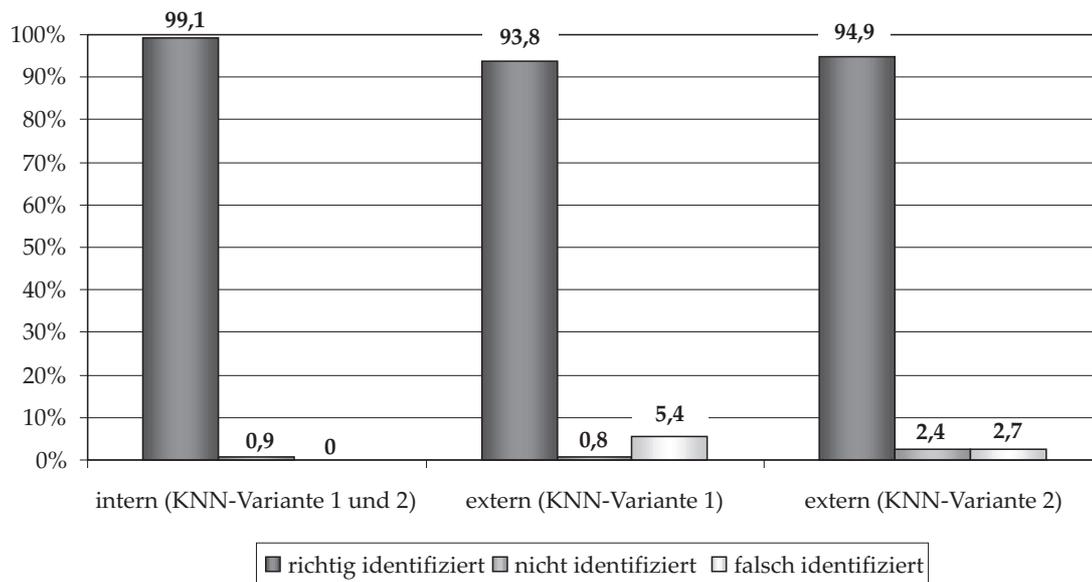


Abbildung 3.12: Ergebnisse der internen und externen Validierung der KNN-Varianten 1 (drei Ebenen) und 2 (zwei Ebenen).

Spektren korrekt zugeordnet (93,8%), 8 Spektren konnten keiner der gegebenen Klassen zugewiesen werden (0,8%) und 52 Spektren wurden falsch zugeordnet (5,4%). Die externe Validierung der zweiten KNN-Variante mit zwei Ebenen ergab 916 korrekt zugeordnete Spektren (94,9%), 23 nicht zugeordnete Spektren (2,4%) und 26 falsch zugeordnete Spektren (2,7%).

Trotz der annähernd gleich hohen Quote an korrekten Zuordnungen in beiden KNN-Varianten, war die Zahl der falsch zugeordneten Validierungsspektren in der ersten KNN-Variante doppelt so hoch wie in der zweiten Variante. Aus diesem Grund wurde der strukturelle Aufbau der zweiten Variante mit insgesamt zwei Ebenen der ersten Variante mit drei Ebenen vorgezogen.

Um eine genaue Analyse der gewählten Netzvariante durchführen zu können, wurde das Ergebnis der externen Validierung für die beiden Ebenen einzeln betrachtet. Durch diese getrennte Begutachtung konnte das Differenzierungspotential des KNN geprüft werden, da die aufeinander folgenden Ebenen auf verschiedenen Unterscheidungszielen beruhen.

Die Ergebnisse der externen Validierung für die erste Ebene des KNN zur Unterscheidung zwischen probiotischen und ubiquitären *S. cerevisiae*-Isolaten sind in Tabelle 3.12 zusammengefasst und zeigen eine korrekte Zuordnung von 98,2%.

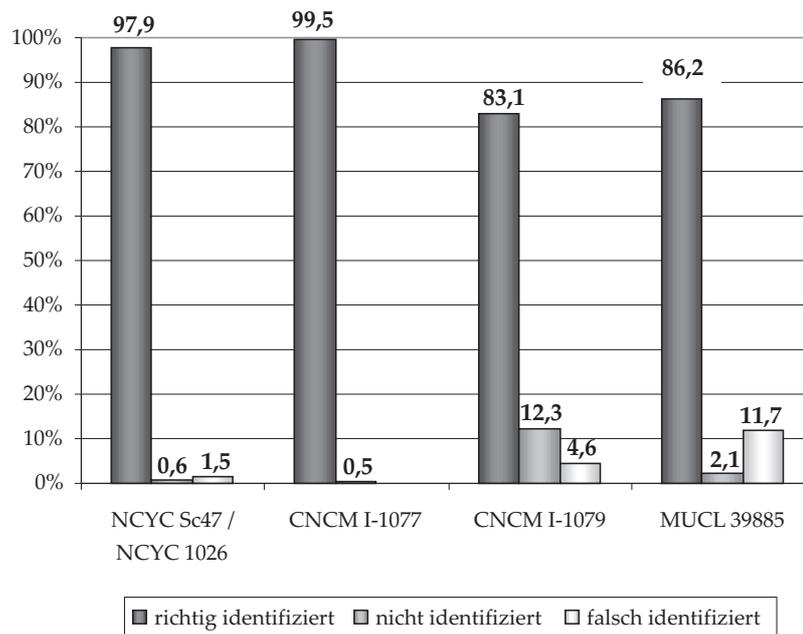


Abbildung 3.13: Ergebnisse der externen Validierung der zweiten Ebene der KNN-Variante 2.

Lediglich 17 Spektren wurden keiner bzw. der falschen Klasse zugeordnet.

Die zweite Ebene des KNN realisiert die Differenzierung zwischen vier Probiotika-Klassen. Für diese Ebene wurde in der externen Validierung eine Erfolgsquote von annähernd 100 % korrekter Klassifizierung für Spektren der Stämme CNCM I-1077 und den beiden NCYC-Stämmen (Abbildung 3.13), die aufgrund sehr großer Ähnlichkeit in einer Klasse zusammengefasst wurden, erzielt. Die korrekte Zuordnung von CNCM I-1079- und MUCL 39885-Spektren lag dagegen unter 90 %.

Tabelle 3.12: Ergebnisse der externen Validierung der ersten Ebene der KNN-Variante 2.

<i>S. cerevisiae</i>	Gesamtanzahl der Spektren	korrekt identifizierte Spektren (%)	nicht identifizierte Spektren (%)	falsch identifizierte Spektren (%)
probiotisch	699	698 (99,9)	0	1 (0,1)
ubiquitär	266	250 (94,0)	10 (3,8)	6 (2,2)
Summe	965	948 (98,2)	10 (1,0)	7 (0,8)

4 Diskussion

4.1 Etablierung einer Datenbank zur Identifizierung klinisch relevanter Hefearten

Bislang werden in der klinischen Diagnostik vorwiegend biochemische Methoden, wie API- oder Vitek-Systeme [36, 90, 96], die sich auf die Verwertung bestimmter Substrate beschränken, zur Identifizierung von Hefen angewandt. Daneben ist auch die Anwendung von chromogenen Medien häufig beschrieben [41, 93, 105]. Diesen Systemen gemein ist, dass sie in der Regel lediglich eine begrenzte Anzahl an Arten umfassen, die sich auf häufig auftretende Arten konzentriert. Nach aktuellen Studien [89, 101, 112] sind über 60 % der Mykosen auf *C. albicans* zurückzuführen. Ebenfalls häufiger auftretende Arten sind *C. glabrata* (12,0 %), *C. tropicalis* (7,5 %), *C. parapsilosis* (7,3 %) und *I. orientalis* (2,7 %). Diese Zahlen sind Durchschnittswerte aus mehreren Studien, die weltweit über mehrere Jahre durchgeführt wurden [49, 86–89] und daher leichten geographischen Schwankungen unterworfen sind. Nichtsdestotrotz wurde in allen Einzelstudien festgestellt, dass die Zahl der Erkrankungen durch nicht-*C. albicans*-Arten im Laufe der letzten Jahre immer mehr zunahm, wodurch auch ihre klinische Bedeutung wuchs. Ebenso steigt auch die Zahl der durch *Cryptococcus* und *Trichosporon* verursachten Mykosen. Dementsprechend ist die Etablierung eines Identifizierungssystems, das möglichst viele Arten umfasst, von steigender Bedeutung.

4.1.1 Entwicklung und Bewertung

Die Entwicklung einer möglichst raschen und verlässlichen Identifizierungsmethode für klinisch relevante Mikroorganismen spielt seit Jahren eine große Rolle in der Forschung. Die Ansätze umfassen vorwiegend molekularbiologische Methoden, wie Sequenzierung von ribosomalen DNS-Abschnitten [14, 63, 66], real-time PCR-Systeme [8] und dHPLC-Analysen [43]. Aber auch die Anwendung der FTIR-Spektroskopie wurde bereits sowohl für Hefen als auch Bakterien beschrieben [76, 121].

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine für den Lebensmittelbereich bereits erfolgreich eingesetzte FTIR-Referenzdatenbank mit Spektren klinischer

Stämme erweitert, um die Datenbank auch für einen Einsatz in der medizinischen Diagnostik erschließen zu können. Eine Sammlung klinischer Isolate aus unterschiedlichen Patientenproben erfolgte über einen Zeitraum von etwa 18 Monaten an den klinischen Untersuchungslaboratorien der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München sowie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums der RWTH Aachen.

Insgesamt wurden 30 Arten, repräsentiert durch 107 Stämme, in die Datenbank eingegliedert. Die Arten *Cr. adeliensis*, *Cr. magnus*, *Tr. inkin* und *Kl. heterogenica* wurden dabei als neue Spezies aufgenommen. Die bereits existierende Datenbank umfasste 217 Arten von 54 unterschiedlichen Gattungen. Sie setzte sich bislang aus 1710 Spektren zusammen und wurde um 214 Spektren auf insgesamt 1924 Spektren erweitert. Je Stamm wurden zwei Spektren in die Datenbank integriert.

Die Validierung der Datenbank erfolgte mit 103 Stämmen. Unter Berücksichtigung bereits in der Datenbank hinterlegter Arten wurden auch Stämme zur Validierung verwendet, von denen lediglich eine geringe Anzahl klinischen Ursprungs gesammelt werden konnte. Auf diese Weise konnte eine erste Einschätzung des Potentials der Referenzdatenbank erfolgen, die zugleich Schwachpunkte hinsichtlich der Stammanzahl erkennen ließ.

Wie in Tabelle 3.3 dargestellt, wurden 87,4 % der 538 Validierungsspektren richtig identifiziert. Besonders hervorzuheben ist, dass 12 der 26 in der Validierung enthaltenen Arten zu 100 % korrekt identifiziert wurden. Darunter waren auch die neu in die Datenbank aufgenommenen Arten *C. africana* sowie die beiden *Cryptococcus*-Arten *Cr. terreus* und *Cr. uniguttulatus*. Die Spektren von vier der fünf häufigsten *Candida*-Arten wurden zu mindestens 93 % richtig identifiziert. Einzige Ausnahme stellt die Spezies *C. tropicalis* dar, von welcher über 50 % der Validierungsspektren nicht eindeutig bzw. falsch identifiziert wurden. Da bereits 15 Stämme dieser Art in der Datenbank vertreten waren und weitere 5 klinische Stämme integriert wurden, handelt es sich hierbei um eine Hefenart mit großer phänotypischer Varianz. Zur Verbesserung der *C. tropicalis*-Identifizierung muss daher eine hohe Anzahl an klinischen Stämmen in die Datenbank aufgenommen werden.

Die Validierungsspektren von insgesamt sieben Arten wurden nicht eindeutig bzw. falsch identifiziert (Tabelle 3.3). Allen diesen Stämmen ist gemeinsam,

dass bislang lediglich eine sehr geringe Anzahl an Stämmen in der Datenbank vorhanden ist. Die phänotypische Varianz dieser Stämme kann mit der aktuellen Stammanzahl von maximal drei Stämmen je Art nicht repräsentativ abgedeckt sein. Gerade bei den *Cryptococcus*-Arten müssen weitere Stämme integriert werden, da sich die Vertreter dieser Gattung durch einen sehr hohen Grad an phänotypischer Heterogenität auf Gattungs- und Speziesebene auszeichnen. Dies zeigt beispielhaft das folgende Dendrogramm einer HCA von Spektren mehrerer *Cr. neoformans*-Stämme (Abbildung 4.1). Obwohl es sich um eine Spezies handelt, sind große Unterschiede hinsichtlich der Koloniemorphologie zu erkennen, die zu einer verhältnismäßig großen spektralen Distanz zwischen Stämmen derselben Art führen. Während der Typstamm CBS 7229 sowie das klinische Isolat G 3550 eine starke Exopolysaccharidbildung aufweisen, die in Abbildung 4.1 an einer oberflächlichen glänzenden Schleimbildung der Kolonien erkennbar ist, ist diese bei Stämmen des zweiten Clusters kaum erkennbar.

Die Validierungsergebnisse zeigen, dass die erweiterte Referenzdatenbank bereits sehr gute Identifizierungsergebnisse für die am häufigsten auftretenden *Candida*-Arten erzielt hat. Nichtsdestotrotz muss für eine Verbesserung der Identifizierung der nicht-*Candida*-Arten, die eine hohe phänotypische Heterogenität aufweisen, eine größere Anzahl an Stämmen in die Datenbank integriert werden.

4.1.2 Identifizierungsvergleich zwischen FTIR-Spektroskopie und API ID32C

Das API ID32C-System von bioMérieux stellt eines der am häufigsten angewandten Identifizierungssysteme in der klinischen Diagnostik dar. Dieses miniaturisierte Identifizierungssystem für Hefen basiert auf der Assimilationsreaktion 32 verschiedener Substrate und einer Datenbasis, die 62 Verwertungsschemata unterscheidet. Das System deckt damit insgesamt 59 Spezies ab, wobei für *C. albicans* zwei unterschiedliche Verwertungsmuster angegeben werden. Für die Gattung *Zygosaccharomyces* kann mit Hilfe dieses Systems keine Identifizierung auf Speziesebene durchgeführt werden, ebenso kann das System nicht zwischen den Arten *C. inconspicua*/*P. norvegensis*, *D. etchellsii*/*D. carsonii* und *H. guilliermondii*/*uvarum* unterscheiden.

Nach Herstellerangaben ist die Auswertung der Teststreifen nach 24 Stunden, sowie nach 48 Stunden durchzuführen. Es wird jedoch bezüglich der Auswer-

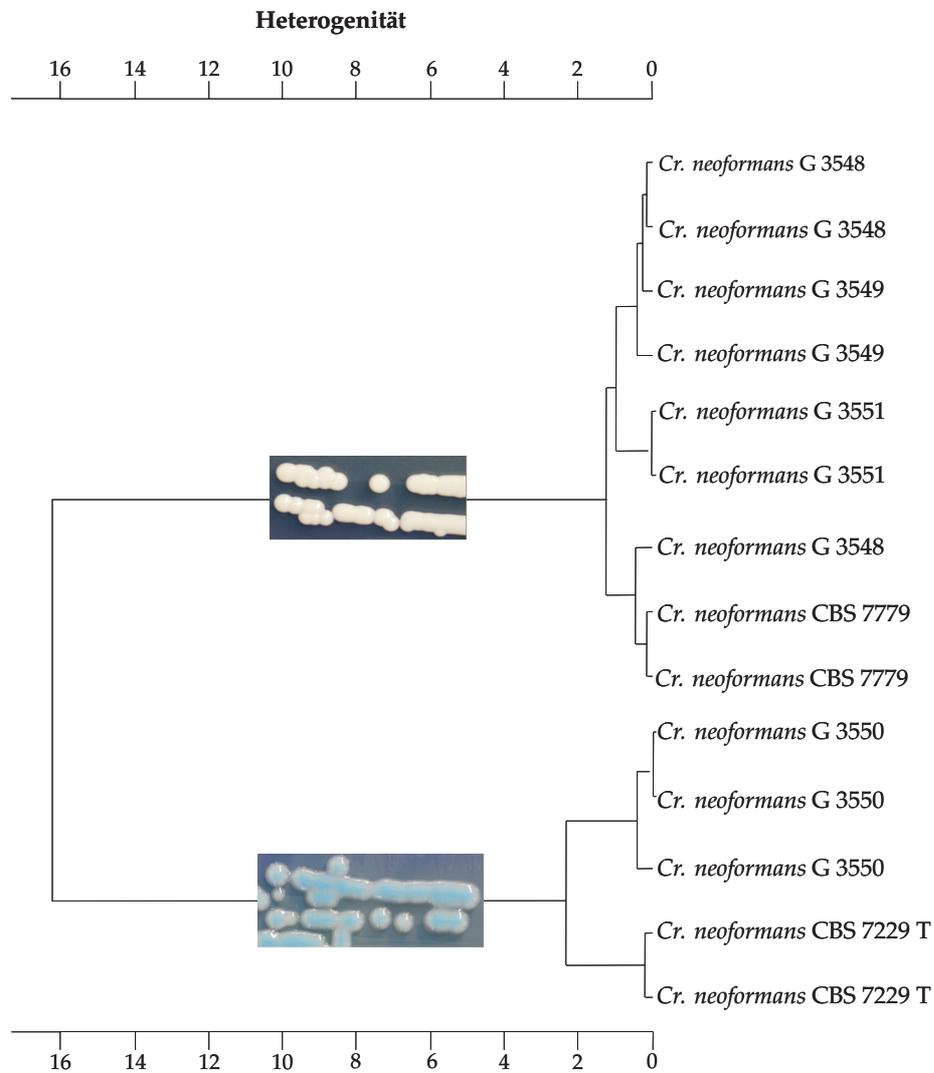


Abbildung 4.1: HCA der FTIR-Spektren von sechs *Cr. neoformans*-Stämmen. Spektrale Fenster $3\,030\text{--}2\,800\text{ cm}^{-1}$, $1\,350\text{--}1\,200\text{ cm}^{-1}$, $900\text{--}700\text{ cm}^{-1}$, 2. Ableitung, Wards Algorithmus. Kolonien auf YGCB-Agar nach 48 Stunden Inkubation bei $27\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die im unteren Bild gezeigten blauen glänzenden Einzelkolonien weisen eine deutliche Schleim- und damit Exopolysaccharidbildung auf, die den weißen matten Kolonien des oberen Bildes fehlt.

tung nach 24 Stunden Inkubation betont, dass das Ergebnis zu diesem Zeitpunkt noch nicht sicher ist. Die vorliegenden Testergebnisse bestätigten die Unsicherheit der Resultate nach 24-stündiger Inkubation (Abbildung 4.2). So wurden lediglich 42 % der getesteten Stämme nach 24 Stunden richtig identifiziert, während nach 48 Stunden annähernd die doppelte Menge korrekt identifiziert wurde. Der Grund hierfür ist im standardisierten Probenansatz zu suchen, der nur eine sehr geringe Zelldichte von $2 \cdot 10^7 \text{ KBE/ml}$ (entspricht McFarland-Standard 2) zu Inkubationsbeginn vorsieht und dabei keinerlei Unterschied zwischen langsam und schnell wachsenden Hefearten zulässt. Dies führte gerade bei den getesteten *Cryptococcus*-Stämmen, die generell durch langsames Wachstum charakterisiert sind, dazu, dass keinerlei Wachstum nach 24 Stunden und kaum Wachstum nach 48 Stunden sichtbar war. Im Gegensatz dazu ermöglicht der standardisierte Ansatz für die FTIR-Messung, bei welchem eine größere Zellmenge eingesetzt wird, auch bei langsam wachsenden Stämmen ein ausreichendes Wachstum für eine erfolgreiche Spektrenaufnahme und Identifizierung. So wurden bereits nach 24 Stunden alle *Cryptococcus*-Stämme des Testsets mit Hilfe der FTIR-Datenbank richtig identifiziert.

In Tabelle 3.5 ist ein Überblick der Ergebnisse nach beiden API-Auswertungszeitpunkten gegeben. Im direkten Vergleich wurde festgestellt, dass einige Arten mittels API ID32C nicht richtig identifiziert wurden. So wurden alle Stämme

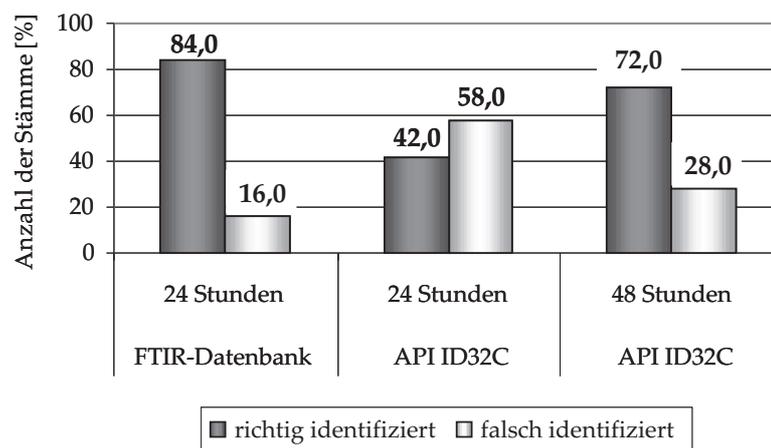


Abbildung 4.2: Ergebnisse der Identifizierung von 50 Validierungsstämmen mit API ID32C und FTIR-Datenbank. Die Auswertungsergebnisse der API-Teststreifen erfolgte nach 24 und 48 Stunden Inkubation.

der Spezies *C. tropicalis*, *Cl. lusitaniae* und *Cr. uniguttulatus* falsch identifiziert. Im Gegensatz dazu wurden mindestens zwei Stämme aller getesteten Arten mittels FTIR-Datenbank richtig identifiziert. Die häufig auftretenden Spezies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* und *I. orientalis* wurden mit Hilfe beider Methoden zu annähernd 100 % richtig identifiziert. Die hier erzielte Quote an korrekten Identifizierungen mittels API ID32C stimmen mit vergleichbaren Studien überein, in welchen ebenfalls hohe Erfolgszahlen für *C. albicans* erzielt werden konnten [73,90,96].

Die Grenzen des API ID32C-Systems zeigten sich beim *C. tropicalis*-Stamm, der zwar nach 24 Stunden korrekt, nach 48 Stunden allerdings falsch identifiziert wurde. Hier führten vier für diese Art seltener vorkommende positive Reaktionen zum falschen Ergebnis (*C. guilliermondii*), das zudem mit über 90 % Übereinstimmung im Verwertungsschema ein zuverlässiges Ergebnis suggerierte. Es handelt sich hierbei somit eindeutig um einen atypischen Stamm, der im standardisierten API-System nicht richtig erkannt werden kann. Da dieser Stamm auch mit der FTIR-Datenbank nicht richtig identifiziert werden konnte, muss er zwingend in diese integriert werden, um eine Verbesserung der *C. tropicalis*-Identifizierung zu erzielen.

Die Ergebnisse des vergleichenden Tests belegen, dass der Einsatz von FTIR-Spektroskopie in der klinischen Diagnostik einen deutlichen Zeitvorteil gegenüber dem API ID32C-System bietet. Zudem lag die Quote der korrekt identifizierten Stämme auch nach der vom API-Hersteller vorgeschriebenen 48 stündigen Inkubation um 12 % niedriger. Somit war auch die Qualität der Identifizierungsergebnisse mittels FTIR-Datenbank besser.

4.1.3 Bewertung der Einsatzmöglichkeit der Datenbank in der klinischen Diagnostik

Die Validierungsergebnisse der neuen Datenbank unterstreichen das Potential der FTIR-Spektroskopie für den Anwendungsbereich der klinischen Diagnostik, für welchen bereits weitere spektroskopische Techniken publiziert worden sind. So wurde beispielsweise die Anwendung von FTIR-Mikrospektroskopie [31,76], Raman-Spektroskopie [53,74–76] sowie in jüngerer Zeit MALDI-TOF-MS [95] beschrieben. Im Gegensatz zu diesen Studien, deren Hauptaugenmerk auf der Iden-

tifizierung der sechs bis acht häufigsten Arten liegt, deckt die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erweiterte Datenbank jedoch ein wesentlich breiteres Spektrum an Arten ab. Der Anteil an Isolaten aus zusätzlichen Habitaten wie beispielsweise Lebensmittel und Umwelt erhöht zudem das Identifizierungspotential für atypische Stämme, da eine höhere phänotypische Biodiversität in dieser gemischten Datenbank abgedeckt wird.

Im direkten Vergleich mit einem häufig angewandten biochemischen Identifizierungssystem, dem API ID32C, zeigten sich deutliche Vorteile der FTIR-Spektroskopie. Bei beiden Methoden ist die Anzucht einer Reinkultur für die Identifizierung erforderlich. Das Ergebnis liegt jedoch bei der FTIR-Spektroskopie bereits nach 24 Stunden vor, während im API-System mindestens 48 Stunden für eine verlässliche Identifizierung benötigt werden, bei sehr langsam wachsenden Arten sogar bis zu 72 Stunden. Zudem zeigte sich, dass die Rate an falschen Identifizierungen durch das API ID32C auch nach 48-stündiger Inkubation der Teststreifen relativ hoch lag. Einen weiteren negativen Aspekt biochemischer Identifizierungssysteme stellt der Ansatz der Proben dar, der im Vergleich zur FTIR-Spektroskopie deutlich komplizierter und fehleranfälliger ist. Zudem werden teure Reagenzien und Teststreifen benötigt, während bei der Probenaufbereitung für die spektroskopische Messung lediglich geringe laufende Kosten anfallen.

In der klinischen Diagnostik finden auch weitere Identifizierungssysteme ihre Anwendung, die dem API-System hinsichtlich Probenaufbereitung, Untersuchungskriterien und Auswertung ähnlich sind und sich nur durch Erweiterungen, wie pH-Indikatoren oder zusätzliche Antibiotikaresistenztests unterscheiden. Beispiele hierfür sind das AUXACOLOR-System (Sanofi Diagnostics Pasteur) oder das *Microbial Identification System* (MIS; Microbial ID Inc.) [19, 21, 57]. Trotz der erleichterten Auswertung durch Farbumschlag und der verbesserten Unterscheidung durch die Antibiotikaresistenzanalyse dieser Systeme, weisen auch sie den gleichen negativen Zeit- und Kostenfaktor wie das API-System auf. Ihre Konkurrenzfähigkeit gegenüber dem Einsatz von FTIR-Spektroskopie scheint daher ebenfalls gering zu sein.

Die Anwendung der FTIR-spektroskopischen Referenzdatenbank zur Identifizierung klinisch relevanter Hefearten erscheint aufgrund der dargestellten Vorteile sowie der gezeigten Ergebnisse vielversprechend.

4.2 Identifizierung der lebensmittelrelevanten Hefegattungen

Issatchenkia und *Pichia*

Vertreter der Gattungen *Issatchenkia* und *Pichia* können aus einer Vielzahl unterschiedlichster Habitats, wie Boden, Wasser und Früchte isoliert werden [62]. Die dementsprechend notwendige Anpassung an unterschiedliche Lebensbedingungen resultiert in einer großen phänotypischen Varianz zwischen den Arten, die häufig eine Identifizierung auf Artebene mit Hilfe klassischer physiologischer und biochemischer Identifizierungssysteme erschwert. Um eine zuverlässige Identifizierung von nah verwandten *Issatchenkia*- und *Pichia*-Arten, die als häufige Lebensmittelverderber in Erscheinung treten, zu ermöglichen, wurde ergänzend zur FTIR-spektroskopischen Datenbank ein KNN zur Differenzierung etabliert. Das System enthält alle fünf beschriebenen *Issatchenkia*-Arten, sowie 16 *Pichia*-Arten, die häufig im Lebensmittelbereich auftreten.

4.2.1 Identifizierung der Referenzstämme

Als erster Schritt wurden 124 Referenzstämme, die zum Training des KNN verwendet werden sollten, hinsichtlich ihrer Identität mittels 26S rDNS-Sequenzierung überprüft. Zu diesen sequenzierten Stämmen zählten auch mehrere Stämme aus offiziellen Stammsammlungen, deren Identität aufgrund von atypischen FTIR-Spektren überprüft wurde. Drei dieser Stämme mussten basierend auf den Sequenzierungsergebnissen umbenannt werden. Zwei *I. occidentalis*-Stämme, der Typstamm CBS 5459 sowie der Stamm CBS 2107, wiesen eine 26S rDNS-Sequenz auf, die zu 100 % identisch war zur 26S rDNS-Sequenz des *I. orientalis*-Stammes CBS 573 (BLAST Zugriffsnummer AY497684). Das Identifizierungsergebnis wurde durch die CBS bestätigt. Der ursprüngliche *I. occidentalis*-Typstamm konnte allerdings nicht nachgeliefert werden und ist daher nicht im Stammset zur Etablierung des KNN enthalten. Des Weiteren wurde der *I. orientalis*-Stamm DSMZ 70086 mit 100 % Sequenzhomologie zum CBS-Stamm 1876 (BLAST Zugriffsnummer AY497672) eindeutig als *P. fermentans*-Stamm identifiziert. Aufgrund dieser eindeutigen Sequenzierungsergebnisse wurden alle drei Stämme in den Trainingsprozess des KNN integriert.

Zusätzlich zum Datenbankvergleich bei NCBI wurden für sehr nah verwandte

Arten basierend auf den 26S rDNS-Sequenzen Ähnlichkeitsanalysen durchgeführt und ein phylogenetischer Baum erstellt (Abbildung 3.2). Dies ermöglichte die Unterscheidung zwischen Arten mit hoher genetischer Ähnlichkeit. Im dargestellten phylogenetischen Baum bildeten sich keine zwei getrennten Gattungscluster, die Arten beider Gattungen mischten sich zum Teil aufgrund hoher genetischer Ähnlichkeit. Dies bestätigt bereits veröffentlichte Daten von Kurtzman & Robnett [64], die vermuten, dass es sich bei der Gattung *Issatchenkia* um ein Synonym der Gattung *Pichia* handeln könnte.

Neben der phylogenetischen Analyse wurde auch eine HCA für die fünf derzeit beschriebenen *Issatchenkia*-Arten durchgeführt (Abbildung 3.3), in welcher sich anhand der hohen spektralen Heterogenität deutliche Unterschiede zwischen den Spektren der *I. orientalis*-Stämme und den Spektren der restlichen vier *Issatchenkia*-Arten erkennen lassen. Trotz dieser übereinstimmenden Daten zwischen phylogenetischen Berechnungen und HCA für die Ähnlichkeit von *I. orientalis* zu den restlichen vier *Issatchenkia*-Arten, zeigten frühere Studien, dass sich FTIR-spektroskopische Daten nur bedingt für phylogenetische Studien eignen [60, 83]. In diesen Arbeiten wurde gezeigt, dass die spektralen Distanzwerte, die den Phänotyp des Mikroorganismus widerspiegeln, nicht zwangsläufig mit den Ähnlichkeitswerten molekularbiologischer Sequenzierungen, welchen den Genotyp aufzeigen, korrelieren müssen. Dies konnte auch mit den hier erarbeiteten Daten bestätigt werden.

Hierzu wurde eine HCA mit einer Auswahl an Arten, die basierend auf der phylogenetischen Berechnung in Abbildung 4.3 getroffen wurde, durchgeführt. Für die vergleichende HCA wurden so vier *Issatchenkia*- und zehn *Pichia*-Arten ausgewählt. Jede Art wurde durch drei Stämme repräsentiert von denen jeweils ein Spektrum in die Clusteranalyse miteinbezogen wurde (Abbildung 4.4). Im direkten Vergleich der beiden Abbildungen 4.3 und 4.4 werden Überschneidungen aber auch Unterschiede offensichtlich. So zeigen beide Berechnungen, dass die in Gruppe A enthaltenen Arten zueinander phänotypisch und genetisch ähnlicher sind als zu den restlichen Arten. Die in den Gruppen B und C zusammengefassten Spezies dagegen zeigen in der HCA andere Ähnlichkeitsbeziehungen als in der phylogenetischen Berechnung. Ein Beispiel stellen die Arten *P. angusta* und *P. kluyveri* (beide Gruppe B) dar, die eine sehr hohe spektrale Ähnlichkeit in Abbildung 4.4 aufweisen, deren 26S rDNS-Sequenz jedoch deutliche Unterschiede

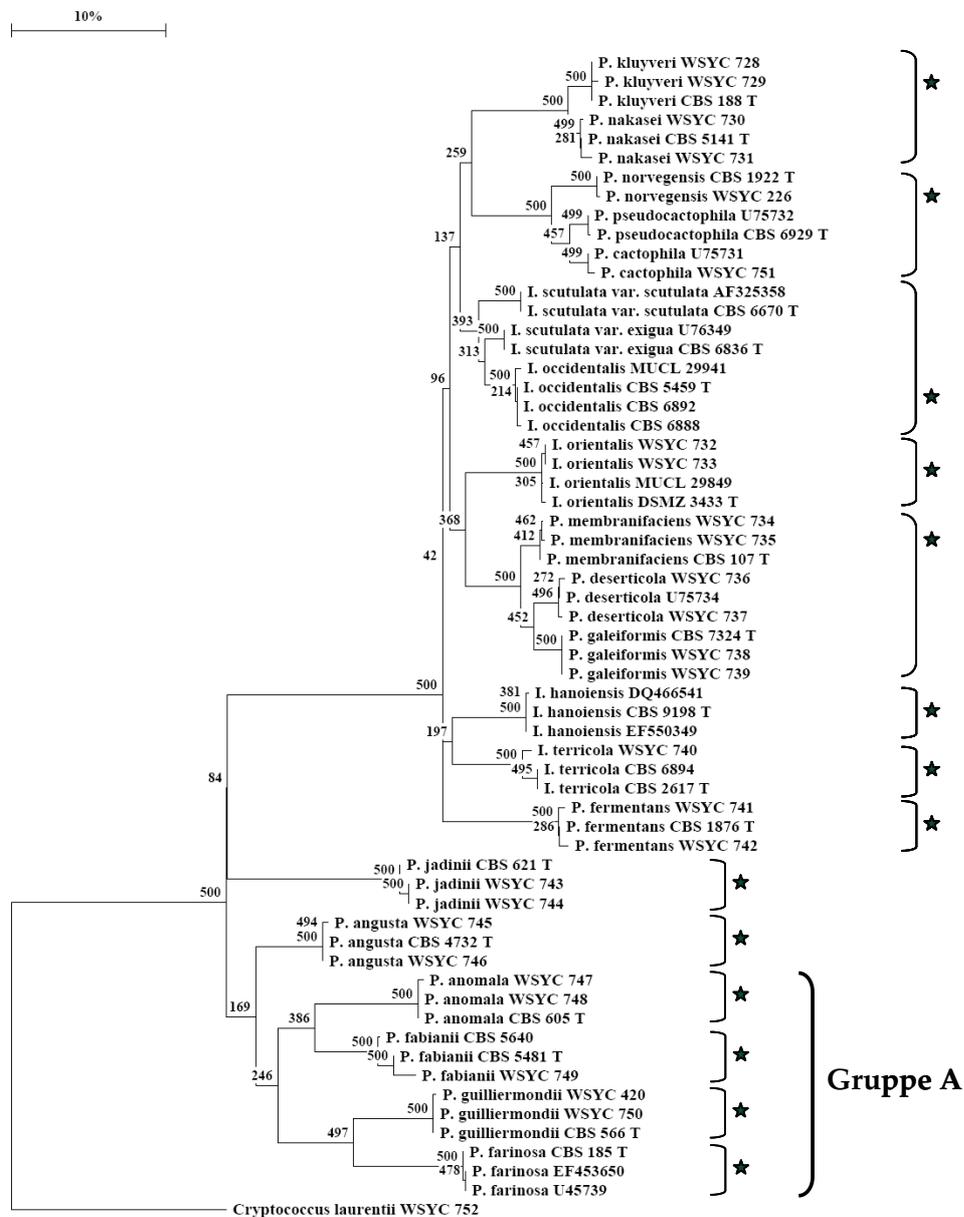


Abbildung 4.3: Phylogenetischer Baum nah verwandter *Issatchenkia*- und *Pichia*-Arten basierend auf 26S rDNA-Sequenzen. Die Berechnung erfolgte mittels Jukes & Cantor-Algorithmus, Neighbourjoining und Bootstrap 500. Als Außengruppe wurde der Stamm *Cr. laurentii* gewählt. Der Balken indiziert 10 % Sequenzunterschied. Die mit einem Stern markierten Arten wurden für eine vergleichende Clusteranalyse ausgewählt.

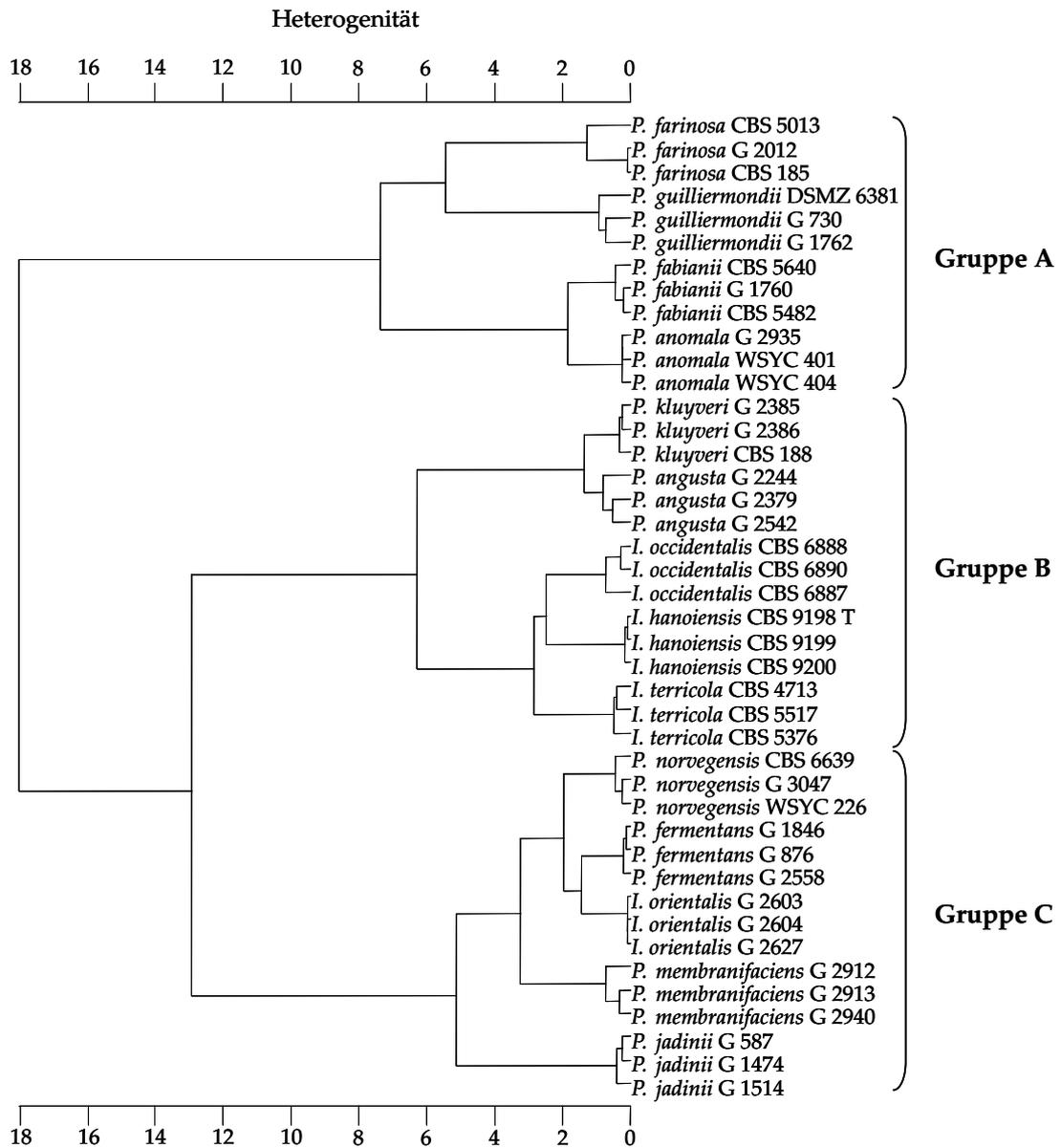


Abbildung 4.4: HCA der FTIR-Spektren von 12 *Issatchenkia*- und 30 *Pichia*-Stämmen. Spektrale Fenster $3\,030\text{--}2\,800\text{ cm}^{-1}$, $1\,350\text{--}1\,200\text{ cm}^{-1}$, $900\text{--}700\text{ cm}^{-1}$, 2. Ableitung, Wards Algorithmus.

besitzt, was zu einer großen genotypischen Distanz in Abbildung 4.3 führt.

Für eine erfolgreiche Entwicklung der hierarchischen Struktur des KNN wurden entsprechend dieser Erkenntnisse sowohl die phylogenetischen als auch die spektralen Ähnlichkeitsbeziehungen der untersuchten *Issatchenkia*- und *Pichia*-Arten berücksichtigt.

4.2.2 Entwicklung und Bewertung des KNN

Insgesamt wurden zehn Einzelnetze trainiert und abschließend zu einem Gesamtnetz miteinander verbunden. Bei sechs dieser Subnetze wurde der sogenannte Fingerprintbereich zwischen 900 cm^{-1} und 700 cm^{-1} als Spektralbereich mit dem größten Differenzierungspotential ermittelt. Dieser Fingerprintbereich zeichnet sich durch schwache, aber sehr charakteristische Peaks der aromatischen Ringe einzelner Aminosäuren und Nukleotide aus [78]. In einer Studie zur Differenzierung von Bakterien mittels FTIR-Spektroskopie und KNN wurde gezeigt, dass dieser Spektralbereich eine große Bedeutung für die Unterscheidung auf Stammebene besitzt [114]. Dagegen wurde zur Differenzierung der Arten *P. anomala* und *P. fabianii* bzw. *P. cactophila* und *P. pseudocactophila* beispielsweise vorwiegend ein Abschnitt des gemischten Bereiches bei 1300 cm^{-1} genutzt. Die Unterscheidung anderer Arten wie *I. orientalis* und *P. norvegensis* erforderte hingegen Wellenzahlen, die sich über den gesamten mittleren Infrarotbereich erstreckten.

Die Überprüfung der Funktionsfähigkeit, Genauigkeit und auch der Stabilität des etablierten KNNs stellte einen wichtigen abschließenden Aspekt dar. Um diese Kriterien ausreichend zu testen, wurde neben einer internen Validierung auch eine externe Validierung des Systems durchgeführt. Im Rahmen der internen Validierung wurden Spektren der Trainingsstämme verwendet, die nicht in den Trainingsprozess integriert waren. Getestet wurde demzufolge, ob dem System unbekannte Spektren bereits bekannter Stämme richtig zugeordnet werden. Auf diese Weise sollte das Erkennen einer fehlerhaft gewählten Netzstruktur ermöglicht werden. Die darauf folgende externe Validierung entspricht einem praxisnäheren Test des Systems, da ausschließlich Spektren von Stämmen verwendet werden, die nicht im Trainingsstammset enthalten waren und daher dem System nicht bekannt sind. Durch diese Validierung kann die Robustheit überprüft und eventuell vorhandene Schwachstellen aufgedeckt werden.

Die interne Validierung des Systems mit 237 Spektren ergab eine korrekte Identifizierung von 99,2%. Diese hohe Prozentzahl an korrekten Identifizierungen belegt, dass ein geeigneter struktureller Aufbau des KNN gewählt wurde. Hervorzuheben ist, dass kein Spektrum falsch identifiziert wurde und bei lediglich zwei Spektren keine Zuordnung getroffen werden konnte. Da es sich hierbei um *P. cactophila*- bzw. *P. pseudocactophila*-Spektren handelte, wurde eine eindeutige Identifizierung durch den hohen Grad an genetischer, phänotypischer und damit auch spektraler Ähnlichkeit verhindert. Nichtsdestotrotz spricht die hohe Rate an korrekten Identifizierungen der internen Validierung für das Potential und die Verlässlichkeit des etablierten KNNs.

Im Zuge der externen Validierung wurden dem System 1 608 Spektren von 179 Stämmen präsentiert. Wie in Tabelle 3.9 aufgeführt, wurden 98,6% dieser Spektren korrekt identifiziert. Dies bestätigt erneut die geeignete hierarchische Struktur des KNN sowie das große Potential und die Genauigkeit des Systems. Darüber hinaus ist die Rate an korrekten Identifizierungen in der externen Validierung annähernd so hoch wie in der vorausgegangenen internen Validierung. Frühere Studien auf diesem Gebiet, in denen Bakterien verwendet wurden [97], folgerten aus vergleichbaren Ergebnissen der internen und externen Validierung einen Beleg für die Stabilität des KNN. Dies zeigt, dass eine repräsentative Zahl an Stämmen im Training genutzt wurde, welche die phänotypische Biodiversität ausreichend abdeckt.

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

4.2.3 Beurteilung des KNN für den Einsatz in der Lebensmittelindustrie

Derzeit kommen im Lebensmittelbereich noch vielfach phänotypische Methoden, wie das API-System von bioMérieux und chromogene Medien zur Anwendung. Diese Methoden ermöglichen allerdings lediglich die Identifizierung einer begrenzten Anzahl an Arten und sind gerade für die Unterscheidung nah verwandter Arten häufig nicht ausreichend sensitiv. Um mit Hilfe der biochemischen Systeme ein unbekanntes Isolat identifizieren zu können, muss dieses in der Regel ein speziestypisches Wachstum aufweisen. Atypische Stämme können daher oft nicht der korrekten Art zugeordnet werden, z. T. scheitert selbst die Zuordnung auf Gattungsebene. Zudem erfolgt die Auswertung oftmals visuell und kann aufgrund der subjektiven Wahrnehmung zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Gerade bei Systemen mit Trübungsvergleich ohne Farbumschlag durch pH-Indikator sind positive Reaktionen häufig nicht eindeutig erkennbar. Zudem muss bei diesen Methoden eine längere Inkubationszeit von 24 bis zu 72 Stunden eingehalten werden, um auch langsam wachsende Arten identifizieren zu können. Dagegen bietet der Einsatz von FTIR-Spektroskopie eine wesentlich anwenderfreundlichere Art der Datenauswertung ohne diffizile visuelle Auswertung, deren Ergebnis nach 24 Stunden vorliegt. Durch flexibel anpassbare Datenbanken können zudem die Spektren atypischer Stämme integriert werden, was das Identifizierungspotential weiter steigert.

Auch molekularbiologische Methoden, wie die häufig angewandte 26S rDNS-Sequenzierung [63, 64], die hier als Referenzmethode genutzt wurde, oder der Einsatz von ARDRA [10] stellen mögliche Alternativmethoden zur Identifizierung von Hefen dar und werden auch eingesetzt. Im Gegensatz zu den zeitaufwändigen Probenaufbereitungen und kostenintensiven Analysen, die bei diesen Methoden auftreten, zeichnet sich die FTIR-Spektroskopie durch eine kostengünstige und rasche Identifizierung aus, da durch die einfache Probenaufbereitung ohne teure Reagenzien die laufenden Kosten und der Zeitaufwand gering gehalten werden.

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte KNN zur Identifizierung der nah verwandten Gattungen *Issatchenkia* und *Pichia* bietet die Möglichkeit einer raschen und verlässlichen Identifizierung der enthaltenen Arten. Darüber hinaus kann das KNN als Ergänzung zur spektralen Referenzdatenbank eingesetzt wer-

den, wodurch ein sehr breites Spektrum an Gattungen und Arten identifiziert werden kann. Durch die Kombination der FTIR-Spektroskopie mit KNN kann zudem eine Differenzierung von nah verwandten, phänotypisch ähnlichen Arten realisiert werden. Der Einsatz von FTIR-Spektroskopie und KNN stellt somit eine kostengünstige, schnelle und zuverlässige Methode zur Identifizierung von Hefen im Lebensmittelbereich dar.

4.3 Differenzierung von ubiquitären und probiotischen

S. cerevisiae aus Futtermitteln

Die mikrobiologische Beurteilung von Futtermitteln wird durch die in der Futtermittelindustrie vermehrt eingesetzten probiotischen *S. cerevisiae*-Stämme, welche von unerwünschten Wildstämmen zu unterscheiden sind, erschwert. Laut Gesetz ist jede detektierbare Hefe als verderbnisanzeigend einzustufen, probiotische Mikroorganismen sollen jedoch nicht in die Zellzahlbestimmung, die die Grundlage der Qualitätsbeurteilung von Futtermitteln darstellt, einbezogen werden [28]. Mit herkömmlichen biochemischen Methoden sind probiotische *S. cerevisiae* allerdings nicht voneinander zu trennen und können auch bisher nicht von ubiquitär im Futtermittel auftretenden *S. cerevisiae* unterschieden werden. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein System zur Differenzierung von *S. cerevisiae* auf Stammebene basierend auf FTIR-Spektroskopie und KNN etabliert.

4.3.1 Stammtypisierung mittels dHPLC und δ -PCR

Eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Entwicklung des Stammtypisierungssystems war die zuverlässige Klassifizierung der Referenzisolate, die mittels molekularbiologischer Methoden durchgeführt wurde. Vorversuche zeigten, dass mit Hilfe dHPLC- und δ -PCR-Analyse ausreichend sensitive und reproduzierbare Resultate erzielt werden können. Beide Methoden wurden daher zur Klassifizierung der Referenzisolate verwendet. Die Kombination von unterschiedlichen Stammtypisierungsmethoden entspricht Studien, die belegen, dass die Anwendung mehrerer Methoden zur Differenzierung auf Stammebene notwendig ist, um verlässliche Ergebnisse zu erzielen [3,5].

Primär erfolgte die Klassifizierung der Referenzstämme über dHPLC-Analyse,

die δ -PCR nach Ness [80] wurde lediglich als zusätzliche Kontrolle der dHPLC eingesetzt. Dementsprechend wurde ein größeres Stammset von 48 probiotischen und 20 ubiquitären *S. cerevisiae*-Isolaten mittels dHPLC untersucht, wohingegen zur Überprüfung dieser Ergebnisse die δ -PCR-Analyse von 27 probiotischen und vier ubiquitären Isolaten ausreichend war.

Die dHPLC-Analyse der getesteten *S. cerevisiae*-Isolate zeigte deutliche Unterschiede zwischen probiotischen Isolaten, die eine relative geringe Anzahl an Hauptpeaks aufwiesen, und ubiquitären Isolaten, deren Profil in der Regel durch eine höhere Anzahl an Peaks charakterisiert waren. Darüber hinaus ergaben sich zwischen den probiotischen Isolaten unterschiedliche Peakprofile, die für alle Isolate des gleichen probiotischen Stammes reproduzierbar identisch waren. So konnten vier der fünf Probiotika voneinander unterschieden werden. Lediglich die beiden NCYC-Stämme 1026 und Sc47 wiesen ein identisches Peakprofil auf, wodurch eine Unterscheidung nicht möglich war. Die hier erzielten Ergebnisse belegen die hohe Sensitivität der dHPLC-Analyse, die ursprünglich vorwiegend im medizinischen Bereich zur Detektion von Mutationen in der DNS-Sequenz eingesetzt wurde [37] und in jüngerer Zeit auch vermehrt Anwendung bei der Artidentifizierung von Bakterien [6,26,30] und Hefen [44,52] findet. Hinsichtlich der Stammtypisierung beschränkte sich ihr Einsatz bislang auf klinisch relevante Bakterien [56] und Hefen [43] sowie auf Hefen aus dem Brauereibereich [51].

Zur Überprüfung der dHPLC-Ergebnisse wurden insgesamt 31 Isolate mittels δ -PCR untersucht. Obwohl das Bandenmuster der δ -PCR vergleichsweise weniger klar erkennbar ist als die deutlichen Peakprofile der dHPLC-Analyse, waren die Anzahl und Größe der erhaltenen Fragmente reproduzierbar in zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Auch bei dieser Methode zeigte das Bandenmuster der probiotischen Isolate weniger Fragmente als das Muster der untersuchten ubiquitären Isolate. Die Isolate der probiotischen Stämme CNCM I-1077, CNCM I-1079 und MUCL 39885 waren eindeutig voneinander zu unterscheiden, wohingegen die Stämme NCYC 1026 und NCYC Sc47 ein identisches Fragmentmuster aufwiesen, welches jedoch von den restlichen drei probiotischen Mustern differenziert werden kann. In einer bereits veröffentlichten Studie aus dem Jahr 2004 [69], in welcher ebenfalls eine δ -PCR-Analyse – allerdings mit modifizierten δ -Primern zur Differenzierung von probiotischen *S. cerevisiae* – angewandt wurde, konnten Isolate der beiden NCYC-Stämme auch nicht voneinander un-

terschieden werden.

Somit war basierend auf den Ergebnissen der hier vorgestellten übereinstimmenden δ -PCR- und dHPLC-Analyse keine erfolgreiche Unterscheidung dieser beiden Stämme möglich. Es sind daher weitere Stammdifferenzierungsmethoden, wie beispielsweise RFLP [3, 33, 104, 119] oder der Einsatz von Mikrosatelliten-Primern [5, 48, 55, 68, 92], zu testen. Nur so kann gezeigt werden, dass es sich bei NCYC 1026 und NCYC Sc47 tatsächlich um zwei unterschiedliche Stämme handelt. Nichtsdestotrotz konnten mit Hilfe der angewandten Methoden in dieser Studie probiotische und ubiquitäre *S. cerevisiae* sowie vier der fünf zugelassenen probiotischen Futtermittelzusatzstämme klar voneinander differenziert werden.

4.3.2 Entwicklung und Bewertung des KNN

Zur Etablierung des KNN wurde ebenfalls die NeuroDeveloper Software® verwendet, wodurch während des Trainingsprozesses Wellenzahlen mit dem größtmöglichen Differenzierungspotential für jedes Subnetz ermittelt werden konnten [115]. Hierbei zeigte sich, dass zur Unterscheidung zwischen probiotischen und ubiquitären Stämmen Wellenzahlen zwischen 750 cm^{-1} und 900 cm^{-1} , also des Fingerprintbereichs, genutzt wurden. Dieser enthält schwache, aber sehr charakteristische Peaks der aromatischen Ringe einzelner Aminosäuren und Nukleotide [78]. Für Bakterien ist bereits bekannt, dass sich dieser Bereich gut zur Differenzierung auf Stammebene eignet [114].

Für die Differenzierung der einzelnen probiotischen Stämme waren dagegen Wellenzahlen von 1500 cm^{-1} bis 1490 cm^{-1} entscheidend, die spektrale Information über mehrere Zellbestandteile wie Polysaccharide, Fettsäuren und Proteine enthalten. Weiterhin absorbieren auch RNS bzw. DNS und phosphattragende Gruppen in diesem Spektralbereich [78].

Aufgrund der unterschiedlichen hierarchischen Struktur der Netzvarianten 1 mit drei Ebenen und 2 mit zwei Ebenen (Abbildung 3.9 und 3.10), wurde für die zweite Ebene der ersten Strukturvariante ein zusätzliches Subnetz zur Einteilung der probiotischen Stämme in die Gruppen CNCM I-1077/CNCM I-1079/MUCL 39885 und NCYC Sc47/NCYC 1026 trainiert. Für diese Unterteilung waren Wellenzahlen von 1030 cm^{-1} bis 1130 cm^{-1} sowie Wellenzahlen des Phospholipidbereichs zwischen 1730 cm^{-1} und 1760 cm^{-1} entscheidend.

Diese Daten zeigen, dass für eine Differenzierung zwischen probiotischen und ubiquitären Isolaten die Betrachtung eines kleinen, zugleich aber sehr variablen Spektralbereichs ausreichend ist. Für die Unterscheidung zwischen einzelnen probiotischen Stämmen bedarf es dagegen spektraler Information, die sich über einen größeren Spektralbereich verteilt.

Die Validierung des KNN zur Differenzierung von probiotischen und ubiquitären *S. cerevisiae* sollte zum Einen Aufschluss über die Funktionsfähigkeit des Systems geben, zum Anderen sollte dadurch die geeignetere Strukturvariante gefunden werden.

In der internen Validierung des Systems wurde bei beiden Netzstrukturen dasselbe Ergebnis von 99,1 % korrekten Zuordnungen erzielt. Lediglich ein Spektrum eines ubiquitären Isolates aus Flüssigfuttermittel konnte weder der ubiquitären noch der probiotischen Klasse zugeordnet werden. Es wurde jedoch kein Spektrum falsch klassifiziert.

In der externen Validierung wies sowohl das KNN mit drei als auch die Variante mit zwei Ebenen eine hohe Quote von etwa 94 % korrekten Klassifizierungen auf. Die KNN-Variante mit zwei Ebenen war dabei um lediglich 1,1 % besser. Hinsichtlich der falsch bzw. nicht klassifizierten Spektren zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede. Während die KNN-Variante mit drei Ebenen mit 5,4 % eine relativ hohe Quote an Fehlklassifizierungen aufwies, wurden lediglich 2,7 % der Spektren mit der zweiten KNN-Variante falsch zugeordnet. Aufgrund dessen wurde die KNN-Variante mit drei Ebenen fallen gelassen. Im Folgenden wird daher das Ergebnis der besseren Strukturvariante mit zwei Ebenen genauer beleuchtet.

Für die Differenzierung der probiotischen und ubiquitären Stämme ergibt sich auf Ebene 1 eine Erfolgsquote von 98,2 % korrekter Zuordnungen. Besonders hervorzuheben ist, dass 99,9 % aller Spektren der enthaltenen probiotischen Stämme als solche erkannt und korrekt klassifiziert wurden. Diese Klassifizierungsrate ist nahezu identisch zu der der internen Validierung und unterstreicht dadurch die Stabilität des KNN in Bezug auf die Unterscheidung zwischen ubiquitären und probiotischen Isolaten. Eine zusätzliche Bestätigung stellen die Erfolgsquoten der ubiquitären Isolate dar, die in beiden Validierungen ebenfalls annähernd gleich waren. Die externe Validierung umfasste nicht nur ubiquitäre *S. cerevisiae* aus Futtermitteln, sondern enthielt auch Stämme aus verschiedensten Habitaten,

darunter Lebensmittel-, Getränke- und Umweltisolate. Vor diesem Hintergrund zeigt die korrekte Klassifizierung von 94,0 % der Spektren ubiquitärer Isolate in der externen Validierung, dass die phänotypische Varianz ubiquitärer *S. cerevisiae* noch nicht ausreichend abgedeckt ist. Zehn Spektren konnten keiner Klasse zugeordnet werden, stammten jedoch von unterschiedlichen Isolaten, was ebenfalls für eine nicht ausreichend abgedeckte phänotypische Biodiversität spricht. Zur Verbesserung dieses KNN Bereiches müssen weitere ubiquitäre Isolate integriert werden. Alle sechs falsch zugeordneten Spektren auf der ersten Ebene stammten von *S. cerevisiae* CBS 1464, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um einen atypischen Stamm handelt, dessen Spektren ebenfalls in das System integriert werden müssen. Zwei Isolate, die im Vorfeld nicht mittels dHPLC- bzw. δ -PCR-Analyse klassifiziert wurden, wurden in der externen Validierung vermeintlich fehlklassifiziert, da alle Spektren des jeweiligen Isolates der anscheinend falschen Klasse zugeordnet wurden. So klassifizierte das KNN ein ubiquitäres Isolat (G 2905) als probiotisches CNCM I-1079-Isolat und ordnete ein vermeintliches NCYC 1026-Isolat (G 3373) der ubiquitären Klasse zu. In beiden Fällen konnte diese Klassifizierung durch nachfolgend durchgeführte dHPLC- und δ -PCR-Analysen bestätigt werden, was die Zuverlässigkeit des etablierten KNN belegt.

Für die zweite Ebene zur Unterscheidung der probiotischen Stämme untereinander wurde in der externen Validierung eine Erfolgsquote von annähernd 100 % korrekter Klassifizierung für Spektren der Stämme CNCM I-1077 und den beiden NCYC Stämmen, die aufgrund sehr großer Ähnlichkeit in einer Klasse zusammengefasst wurden, erzielt (Abbildung 3.13). Die Validierungsspektren der CNCM I-1079- und MUCL 39885-Isolate wurden dagegen nur zu 83 % bzw. 86 % der richtigen Klasse zugeordnet. Für beide Probiotika waren weniger Isolate verfügbar als für die anderen drei Stämme (Tabelle 3.10). Da sich MUCL 39885-Isolate durch einen sehr hohen Grad an Heterogenität auszeichnen, der im KNN bislang nicht ausreichend durch die Trainingsspektren repräsentiert wurde, führte die geringe Isolatanzahl zu einer vergleichsweise hohen Fehlklassifizierung. Bei Spektren der CNCM I-1079-Isolate wurde hingegen eine höhere Rate an nicht identifizierten Spektren in der externen Validierung erreicht. Bei beiden Probiotika-Klassen ist eine Verbesserung durch Erhöhung der Isolat- und damit Spektrenanzahl im Training zu erwarten.

4.3.3 Einsatz des KNN zur Stammtypisierung im Futtermittelbereich

Das Potential der FTIR-Spektroskopie für eine Differenzierung auf Stammebene ist bereits mehrfach beschrieben worden und umfasst sowohl Bakterien [42, 98, 99], als auch Hefen [1, 32, 100, 113]. Der Fokus der bislang veröffentlichten Studien zur Stammtypisierung von Hefen lag jedoch hauptsächlich auf den medizinisch relevanten Hefearten *C. albicans* und *C. glabrata*, deren Stämme vorwiegend mittels HCA der Spektren voneinander unterschieden wurden. Daneben wurde eine Studie zur Unterscheidung von *S. cerevisiae*-Mutanten mittels FTIR-Spektroskopie veröffentlicht [39]. Bei keiner dieser Studien wurde allerdings eine ergänzende mathematische Methode zur Datenverarbeitung verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde somit erstmals der Einsatz von FTIR-Spektroskopie in Kombination mit KNN zur Unterscheidung von Hefen auf Stammebene erfolgreich durchgeführt.

Das entwickelte KNN ist ergänzend zur Referenzdatenbank für die Identifizierung von Hefen anzuwenden. Neben *S. cerevisiae* können so weitere Hefearten, die im Futtermittel vorhanden sein können, verlässlich identifiziert werden. Somit kann durch eine einzige Probenaufbereitung für die Messung im FTIR-Spektrometer sowohl die Identifizierung auf Art- als auch auf Stammebene realisiert werden. Diese Art der Probenaufbereitung zeichnet sich zudem im Vergleich zu den hier angewandten molekularbiologischen Referenzmethoden durch einen geringeren zeitlichen Arbeitsaufwand und wesentlich geringere laufende Kosten aus.

Die realisierte Differenzierungsmöglichkeit von probiotischen und ubiquitären *S. cerevisiae* stellt eine erhebliche Verbesserung der Qualitätsbeurteilung von Futtermitteln dar, da durch eine genaue Bezeichnung der vorliegenden Spezies auch Rückschlüsse auf die Herkunft sowie die potentielle Pathogenität für das Tier und die tatsächliche Gefahr als Verderbniskeim möglich sind. Darüber hinaus ist zusätzlich die Möglichkeit gegeben, probiotische Keime, die in hohen Zellzahlen im Futtermittel vorliegen, von der Keimzahlbestimmung zur Qualitätseinschätzung auszuschließen. Dies verfeinert die Beurteilung der Futtermittel, da die Keimzahlen der tatsächlich unerwünschten *S. cerevisiae* ermittelt werden können. Auch eine Überprüfung der probiotischen Futtermittelzusätze hinsichtlich ihrer Reinheit ist denkbar, da das KNN zwischen vier der fünf zugelassenen probiotischen

Stämmen unterscheiden kann. Gerade bei Anlagen, in welchen unterschiedliche Zusätze zeitlich versetzt produziert werden, können so Kontaminationen leichter detektiert werden.

4.4 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei Identifizierungssysteme für unterschiedliche Anwendungsbereiche etabliert, deren Validierungen bereits sehr gute Ergebnisse erzielten. Nichtsdestotrotz ist es erforderlich, dass diese Systeme weiterbearbeitet werden, um die Identifizierungsqualität künftig noch zu steigern.

So müssen die beiden Systeme zur Artidentifizierung aufgrund der immer noch anhaltenden molekularbiologischen Überprüfung der Hefentaxonomie und der damit verbundenen Änderungen stets aktualisiert werden. Dies kann einerseits Namensänderungen der bereits enthaltenen Spezies, aber auch eine Ergänzung um neu beschriebene bzw. den enthaltenen Gattungen neu zugeteilte Arten umfassen.

Die Referenzdatenbank für klinisch relevante Hefen muss mit Spektren weiterer Isolate ergänzt werden, um der großen phänotypischen Biodiversität gerecht werden zu können. Eine erste Erweiterung kann durch die Integration der Validierungsspektren erfolgen, die Sammlung weiterer Isolate ist jedoch unabdingbar. Damit gerade auch seltener auftretende Hefearten in ausreichender Stammzahl in der Datenbank integriert werden können, sollte ein längerer Zeitraum für diese Sammlung in Betracht gezogen werden. Darüber hinaus sollte ein praxisnaher Test der Datenbank in einem klinischen Untersuchungslabor erfolgen, um die tatsächliche Erfolgsquote in der klinischen Diagnostik feststellen zu können.

Um das KNN zur Identifizierung von *Issatchenkia*- und *Pichia*-Arten zu verbessern, sollte ein weiteres Training mit erweiterter Stammzahl durchgeführt werden. In dieses Training sollten vor allem Spektren der in der externen Validierung nicht korrekt zugeordneten Stämme integriert werden. Weiterhin empfiehlt es sich, zusätzlich Stämme in das Training mit einzubeziehen, die außerhalb des bereits abgedeckten phänotypischen Varianzbereiches liegen.

Literatur

- [1] ADT, I., D. TOUBAS, J. M. PINON, M. MANFAIT und G. D. SOCKALINGUM: *FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of Candida albicans*. Arch. Microbiol., 185(4):277–285, 2006.
- [2] AMIEL, C., L. MARIEY, M. CURK-DAUBIE, P. PICHON und J. TRAVERT: *Potentiality of Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) for discrimination and identification of dairy lactic acid bacteria*. Lait, 80:445–459, 2000.
- [3] ANDRADE, M. J., M. RODRIGUEZ, B. SANCHEZ, E. ARANDA und J. J. CORDOBA: *DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products*. Int. J. Food Microbiol., 107(1):48–58, 2006.
- [4] AUSSCHUSS FÜR BIOLOGISCHE ARBEITSTOFFE: *TRBA 460 – Einstufung von Pilzen in Risikogruppen*. Bundesarbeitsblatt, (10), 2002.
- [5] BALEIRAS COUTO, M. M., B. EIJSMA, H. HOFSTRA, J. H. J. HUIS IN'T VELD und J. M. B. M. VAN DER VOSSEN: *Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among Saccharomyces cerevisiae strains*. Appl. Environ. Microbiol., 62(1):41–46, 1996.
- [6] BARLAAN, E. A., M. SUGIMORI, S. FURUKAWA und K. TAKEUCHI: *Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography*. J. Microbiol. Methods, 61(3):399–412, 2005.
- [7] BARNETT, J., R. PAYNE und D. YARROW: *Yeasts: Characteristics and identification*. Cambridge University Press, Cambridge, 3. Aufl., 2000.
- [8] BERGMAN, A., V. FERNANDEZ, K. O. HOLMSTROM, B. E. CLAESSON und H. ENROTH: *Rapid identification of pathogenic yeast isolates by real-time PCR and two-dimensional melting-point analysis*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 26(11):813–818, 2007.
- [9] BLUMBERG, H. M., W. R. JARVIS, J. M. SOUCIE, J. E. EDWARDS, J. E. PATTERSON, M. A. PFALLER, M. S. RANGEL-FRAUSTO, M. G. RINALDI, L. SAIMAN, R. T. WIBLIN und R. P. WENZEL: *Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study*.

- The National Epidemiology of Mycosis Survey*. Clin. Infect. Dis., 33(2):177–186, 2001.
- [10] BOCKELMANN, W., M. HELLER und K. HELLER: *Identification of yeasts of dairy origin by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)*. Int. Dairy J., 18:1066–1071, 2008.
- [11] BOEKE, J. D., D. EICHINGER, D. CASTRILLON und G. R. FINK: *The Saccharomyces cerevisiae genome contains functional and nonfunctional copies of transposon Ty1*. Mol. Cell. Biol., 8(4):1432–1442, 1988.
- [12] BOEKE, J. D., H. XU und G. R. FINK: *A general method for the chromosomal amplification of genes in yeast*. Science, 239(4837):280–282, 1988.
- [13] BOEKHOUT, T. und V. ROBERT: *Yeasts in Food - Beneficial and Detrimental Aspects*. B. Behr's Verlag, Hamburg, 1. Aufl., 2003.
- [14] BORMAN, A. M., C. J. LINTON, S. J. MILES und E. M. JOHNSON: *Molecular identification of pathogenic fungi*. J. Antimicrob. Chemother., 61:7–12, 2008.
- [15] BOSCH, A., M. A. GOLOWCZYC, A. G. ABRAHAM, G. L. GARROTE, G. L. DE ANTONI und O. YANTORNO: *Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy*. Int. J. Food Microbiol., 111(3):280–287, 2006.
- [16] BOSCH, A., A. MINAN, C. VESCINA, J. DEGROSSI, B. GATTI, P. MONTANARO, M. MESSINA, M. FRANCO, C. VAY, J. SCHMITT, D. NAUMANN und O. YANTORNO: *Fourier transform infrared spectroscopy for rapid identification of nonfermenting gram-negative bacteria isolated from sputum samples from cystic fibrosis patients*. J. Clin. Microbiol., 46(8):2535–2546, 2008.
- [17] COCOLIN, L., V. PEPE, F. COMITINI, G. COMI und M. CIANI: *Enological and genetic traits of Saccharomyces cerevisiae isolated from former and modern wineries*. FEMS Yeast Res., 5(3):237–245, 2004.
- [18] CORTE, L., M. LATTANZI, P. BUZZINI, A. BOLANO, F. FATICHENTI und G. CARDINALI: *Use of RAPD and killer toxin sensitivity in Saccharomyces cerevisiae strain typing*. J. Appl. Microbiol., 99(3):609–617, 2005.

- [19] CRIST, A. E., J., L. M. JOHNSON und P. J. BURKE: *Evaluation of the Microbial Identification System for identification of clinically isolated yeasts*. J. Clin. Microbiol., 34(10):2408–2410, 1996.
- [20] CZERUCKA, D., T. PICHE und P. RAMPAL: *Review article: yeast as probiotics – Saccharomyces boulardii*. Aliment. Pharmacol. Ther., 26(6):767–778, 2007.
- [21] DAVEY, K. G., P. M. CHANT, C. S. DOWNER, C. K. CAMPBELL und D. W. WARNOCK: *Evaluation of the AUXACOLOR system, a new method of clinical yeast identification*. J. Clin. Pathol., 48(9):807–809, 1995.
- [22] DEAK, T.: *Simplified techniques for identifying foodborne yeasts*. Int. J. Food Microbiol., 19:15–26, 1993.
- [23] DEAK, T. und L. R. BEUCHAT: *Comparison of SIM, API20C and ID32C systems for identification of yeasts isolated from fruit juice concentrates and beverages*. J. Food Protec., 56:585–592, 1993.
- [24] DEAK, T. und L. R. BEUCHAT: *Evaluation of the MicroScan enzyme-based system for the identification of foodborne yeasts*. J. Appl. Bacteriol., 79(4):439–446, 1995.
- [25] DEAK, T., J. CHEN und L. R. BEUCHAT: *Molecular characterization of Yarrowia lipolytica and Candida zeylanoides isolated from poultry*. Appl. Environ. Microbiol., 66(10):4340–4344, 2000.
- [26] DOMANN, E., G. HONG, C. IMIRZALIOGLU, S. TURSCHNER, J. KUHLE, C. WATZEL, T. HAIN, H. HOSSAIN und T. CHAKRABORTY: *Culture-independent identification of pathogenic bacteria and polymicrobial infections in the genitourinary tract of renal transplant recipients*. J. Clin. Microbiol., 41(12):5500–5510, 2003.
- [27] ECKLES, C. und V. WILLIAMS: *Yeast as a supplementary feed for lactating cows*. J. Dairy Sci., 8:89–93, 1925.
- [28] EFSA: *Technical Guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed (FEEDAP) on the Compatibility of zootechnical microbial additives with other additives showing antimicrobial activity*. The EFSA Journal, 658:1–5, 2008.

- [29] EGGIMANN, P., J. GARBINO und D. PITTET: *Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients*. *Lancet. Infect. Dis.*, 3:685–702, 2003.
- [30] ERCOLINI, D., G. FRISSE, G. MAURIELLO, F. SALVATORE und S. COPPOLA: *Microbial diversity in natural whey cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese*. *Int. J. Food Microbiol.*, 124(2):164–170, 2008.
- [31] ESSENDOUBI, M., D. TOUBAS, M. BOUZAGGOU, J. M. PINON, M. MANFAIT und G. D. SOCKALINGUM: *Rapid identification of Candida species by FT-IR microspectroscopy*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1724(3):239–247, 2005.
- [32] ESSENDOUBI, M., D. TOUBAS, C. LEPOUSE, A. LEON, F. BOURGEADE, J. M. PINON, M. MANFAIT und G. D. SOCKALINGUM: *Epidemiological investigation and typing of Candida glabrata clinical isolates by FTIR spectroscopy*. *J. Microbiol. Methods*, 71(3):325–331, 2007.
- [33] ESTEVE-ZARZOSO, B., C. BELLOCH, F. URUBURU und A. QUEROL: *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, 1999.
- [34] FELL, J. W., T. BOEKHOUT, A. FONSECA, G. SCORZETTI und A. STATZELL-TALLMAN: *Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis*. *Int. J. Syst. Evol. Micro.*, 50:1351–1371, 2000.
- [35] FLEET, G. H.: *Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18(2):170–175, 2007.
- [36] FREYDIERE, A. M., R. GUINET und P. BOIRON: *Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods*. *Med. Mycol.*, 39(1):9–33, 2001.
- [37] FRUEH, F. W. und M. NOYER-WEIDNER: *The use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: impact for diagnostics and pharmacogenetics*. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 41(4):452–461, 2003.
- [38] FULLER, R.: *Probiotics in man and animals*. *J. Appl. Bacteriol.*, 66:365–378, 1989.

- [39] GALICHET, A., G. D. SOCKALINGUM, A. BELARBI und M. MANFAIT: *FTIR spectroscopic analysis of Saccharomyces cerevisiae cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype*. FEMS Microbiol. Lett., 197(2):179–186, 2001.
- [40] GANLEY, A., K. HAYASHI, T. HORIUCHI und T. KOBAYASHI: *Identifying gene-independent noncoding functional elements in the yeast ribosomal DNA by phylogenetic footprinting*. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 102, S. 11787–11792, 2005.
- [41] GHELARDI, E., G. PICHIERRI, B. CASTAGNA, S. BARNINI, A. TAVANTI und M. CAMPA: *Efficacy of Chromogenic Candida Agar for isolation and presumptive identification of pathogenic yeast species*. Clin. Microbiol. Infect., 14(2):141–147, 2008.
- [42] GOERGES, S., J. MOUNIER, M. C. REA, R. GELSOMINO, V. HEISE, R. BEDUHN, T. M. COGAN, M. VANCANNEYT und S. SCHERER: *Commercial Ripening Starter Microorganisms Inoculated into Cheese Milk Do Not Successfully Establish Themselves in the Resident Microbial Ripening Consortia of a South German Red Smear Cheese*. Appl. Environ. Microbiol., 74(7):2210–2217, 2008.
- [43] GOLDENBERG, O., S. HERRMANN, T. ADAM, G. MARJORAM, G. HONG, U. B. GOBEL und B. GRAF: *Use of denaturing high-performance liquid chromatography for rapid detection and identification of seven Candida species*. J. Clin. Microbiol., 43(12):5912–5915, 2005.
- [44] GOLDENBERG, O., S. HERRMANN, G. MARJORAM, M. NOYER-WEIDNER, G. HONG, S. BERESWILL und U. B. GOBEL: *Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography*. J. Microbiol. Methods, 68(1):94–105, 2007.
- [45] GUARRO, J., J. GENÉ und A. STCHIGEL: *Developments in Fungal Taxonomy*. Clin. Microbiol. Rev., 12(3):454–500, 1999.
- [46] GUENZLER, H. und H. GREMLICH: *IR-Spektroskopie*. Wiley-VCH, Weinheim, 4. Aufl., 2003.

- [47] HELM, D., H. LABISCHINSKI, G. SCHALLEHN und D. NAUMANN: *Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy*. J. Gen. Microbiol., 137(1):69–79, 1991.
- [48] HENNEQUIN, C., A. THIERRY, G. F. RICHARD, G. LECOINTRE, H. V. NGUYEN, C. GAILLARDIN und B. DUJON: *Microsatellite typing as a new tool for identification of Saccharomyces cerevisiae strains*. J. Clin. Microbiol., 39(2):551–559, 2001.
- [49] HORN, D. L., J. A. FISHMAN, W. J. STEINBACH, E. J. ANAÏSSIE, K. A. MARR, A. J. OLYAEI, M. A. PFALLER, M. A. WEISS, K. M. WEBSTER und D. NEOFYTOS: *Presentation of the PATH Alliance registry for prospective data collection and analysis of the epidemiology, therapy, and outcomes of invasive fungal infections*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 59(4):407–414, 2007.
- [50] HURLEY, R., J. DE LOUVOIS und M. MULHALL: *Yeasts as Human and Animal Pathogens*. In: ROSE, A. und J. ROSE (Hrsg.): *The Yeasts*, S. 207–277. Academic Press, London, 2. Aufl., 1989.
- [51] HUTZLER, M.: *Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von getränkerelevanten Hefen*. Doktorarbeit, Technische Universität München, Im Druck.
- [52] HUTZLER, M. und O. GOLDENBERG: *PCR-DHPLC (Polymerase Chain Reaction - Denaturing High Performance Liquid Chromatography): a potential novel method for rapid screening of mixed yeast populations*. In: *31st EBC Congress*, S. 131, Venice, 2007.
- [53] IBELINGS, M. S., K. MAQUELIN, H. P. ENDTZ, H. A. BRUINING und G. J. PUPPELS: *Rapid identification of Candida spp. in peritonitis patients by Raman spectroscopy*. Clin. Microbiol. Infect., 11(5):353–358, 2005.
- [54] JAKOBSEN, M. und J. NARVHUS: *Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products*. Int. Dairy J., 6:755–768, 1996.
- [55] JUBANY, S., I. TOMASCO, I. PONCE DE LEON, K. MEDINA, F. CARRAU, N. ARRAMBIDE, H. NAYA und C. GAGGERO: *Toward a global database for the molecular typing of Saccharomyces cerevisiae strains*. FEMS Yeast Res., 8(3):472–484, 2008.

- [56] JURY, F., M. AL-MAHROUS, M. APOSTOLOU, S. SANDIFORD, A. FOX, W. OLLIER und M. UPTON: *Rapid cost-effective subtyping of meticillin-resistant Staphylococcus aureus by denaturing HPLC*. J. Med. Microbiol., 55(8):1053–1060, 2006.
- [57] KELLOGG, J. A., D. A. BANKERT und V. CHATURVEDI: *Limitations of the current microbial identification system for identification of clinical yeast isolates*. J. Clin. Microbiol., 36(5):1197–1200, 1998.
- [58] KHATIB, R., K. RIEDERER, J. RAMANATHAN und J. BARA: *Faecal fungal flora in healthy volunteers and inpatients*. Mycoses, 44:151–156, 2001.
- [59] KLINGBERG, T. D., U. LESNIK, N. ARNEBERG, P. RASPOR und L. JESPERSEN: *Comparison of Saccharomyces cerevisiae strains of clinical and nonclinical origin by molecular typing and determination of putative virulence traits*. FEMS Yeast Res., 8(4):631–640, 2008.
- [60] KUEMMERLE, M., S. SCHERER und H. SEILER: *Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy*. Appl. Environ. Microbiol., 64(6):2207–2214, 1998.
- [61] KURTZMAN, C. P.: *Synonymy of the yeast genera Hansenula and Pichia demonstrated through comparisons of deoxyribonucleic acid relatedness*. Antonie van Leeuwenhoek, 50:209–217, 1984.
- [62] KURTZMAN, C. P. und J. FELL: *The Yeasts, A Taxonomic Study*, Bd. 1. Elsevier Science, Amsterdam, 4. Aufl., 1998.
- [63] KURTZMAN, C. P. und C. J. ROBNETT: *Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene*. J. Clin. Microbiol., 35(5):1216–1223, 1997.
- [64] KURTZMAN, C. P. und C. J. ROBNETT: *Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences*. Antonie van Leeuwenhoek, 73(4):331–371, 1998.
- [65] KURTZMAN, C. P. und C. J. ROBNETT: *Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses*. FEMS Yeast Res., 3(4):417–432, 2003.

- [66] LEAW, S. N., H. C. CHANG, H. F. SUN, R. BARTON, J. P. BOUCHARA und T. C. CHANG: *Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions*. J. Clin. Microbiol., 44(3):693–699, 2006.
- [67] LEGRAS, J. L. und F. KARST: *Optimisation of interdelta analysis for Saccharomyces cerevisiae strain characterisation*. FEMS Microbiol. Lett., 221(2):249–255, 2003.
- [68] LEGRAS, J. L., O. RUH, D. MERDINOGLU und F. KARST: *Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of Saccharomyces cerevisiae strains*. Int. J. Food Microbiol., 102(1):73–83, 2005.
- [69] LEUSCHNER, R. G., J. BEW, P. FOURCASSIER und G. BERTIN: *Validation of the official control method based on Polymerase Chain Reaction (PCR) for identification of authorised probiotic yeast in animal feed*. Syst. Appl. Microbiol., 27(4):492–500, 2004.
- [70] LLANOS, R. DE, A. QUEROL, J. PEMAN, M. GOBERNADO und M. T. FERNANDEZ-ESPINAR: *Food and probiotic strains from the Saccharomyces cerevisiae species as a possible origin of human systemic infections*. Int. J. Food Microbiol., 110(3):286–290, 2006.
- [71] LLANOS, R. DE, A. QUEROL, A. M. PLANES und M. T. FERNANDEZ-ESPINAR: *Molecular characterization of clinical Saccharomyces cerevisiae isolates and their association with non-clinical strains*. Syst. Appl. Microbiol., 27(4):427–435, 2004.
- [72] MACKENZIE, D. A., M. DEFERNEZ, W. B. DUNN, M. BROWN, L. J. FULLER, S. R. DE HERRERA, A. GUNTHER, S. A. JAMES, J. EAGLES, M. PHILO, R. GOODACRE und I. N. ROBERTS: *Relatedness of medically important strains of Saccharomyces cerevisiae as revealed by phylogenetics and metabolomics*. Yeast, 25(7):501–512, 2008.
- [73] MAEHNSS, B., F. STEHR, W. SCHAEFER und K. NEUBER: *Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate Candida albicans and C. dubliniensis*. Mycoses, 48(1):55–61, 2005.

- [74] MAQUELIN, K., L. P. CHOO-SMITH, H. P. ENDTZ, H. A. BRUINING und G. J. PUPPELS: *Rapid identification of Candida species by confocal Raman microscopy*. J. Clin. Microbiol., 40(2):594–600, 2002.
- [75] MAQUELIN, K., C. KIRSCHNER, L. P. CHOO-SMITH, N. VAN DEN BRAAK, H. P. ENDTZ, D. NAUMANN und G. J. PUPPELS: *Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy*. J. Microbiol. Methods, 51(3):255–271, 2002.
- [76] MAQUELIN, K., C. KIRSCHNER, L. P. CHOO-SMITH, N. A. NGO-THI, T. VAN VREESWIJK, M. STAEMMLER, H. P. ENDTZ, H. A. BRUINING, D. NAUMANN und G. J. PUPPELS: *Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures*. J. Clin. Microbiol., 41(1):324–329, 2003.
- [77] MITTERDORFER, G., H. K. MAYER, W. KNEIFEL und H. VIERNSTEIN: *Clustering of Saccharomyces boulardii strains within the species S. cerevisiae using molecular typing techniques*. J. Appl. Microbiol., 93(4):521–530, 2002.
- [78] NAUMANN, D.: *Infrared Spectroscopy in Microbiology*. In: MEYERS, R. A. (Hrsg.): *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, S. 102–131. John Wiley & Sons, Chichester, 2000.
- [79] NAUMANN, D., D. HELM und H. LABISCHINSKI: *Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy*. Nature, 351(6321):81–82, 1991.
- [80] NESS, F., F. LAVALLÉE, D. DUBOURDIEU, M. AIGLE und L. DULAU: *Identification of Yeast Strains Using the Polymerase Chain Reaction*. J. Sci. Food Agric., 62:89–94, 1993.
- [81] NOLTING, S.: *Mykosen des Verdauungstraktes*. Promedico, Hamburg, 1995.
- [82] NOUT, M.: *Traditional fermented products from Africa, Latin America and Asia*. In: BOEKHOUT, T. und V. ROBERT (Hrsg.): *Yeasts in Food - Beneficial and Detrimental Aspects*, S. 451–473. B. Behr's Verlag, Hamburg, 1. Aufl., 2003.
- [83] OBERREUTER, H., J. CHARZINSKI und S. SCHERER: *Intraspecific diversity of Breuibacterium linens, Corynebacterium glutamicum and Rhodococcus erythropolis*

- based on partial 16S rDNA sequence analysis and Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. Microbiology, 148(5):1523–1532, 2002.*
- [84] OBERREUTER, H., H. SEILER und S. SCHERER: *Identification of coryneform bacteria and related taxa by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52:91–100, 2002.*
- [85] PEER, Y. VAN DE und R. DE WACHTER: *Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites. Comput. Appl. Biosci., 13:227–230, 1997.*
- [86] PERES-BOTA, D., H. RODRIGUEZ-VILLALOBOS, G. DIMOPOULOS, C. MELOT und J. VINCENT: *Potential risk factors for infection with Candida spp. in critically ill patients. Clin. Microbiol. Infect., 10(6):550–555, 2004.*
- [87] PFALLER, M. A. und D. J. DIEKEMA: *Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. J. Clin. Microbiol., 40(10):3551–3557, 2002.*
- [88] PFALLER, M. A. und D. J. DIEKEMA: *Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond Candida albicans and Aspergillus fumigatus. J. Clin. Microbiol., 42(10):4419–4431, 2004.*
- [89] PFALLER, M. A. und D. J. DIEKEMA: *Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin. Microbiol. Rev., 20(1):133–163, 2007.*
- [90] PINCUS, D. H., D. C. COLEMAN, W. R. PRUITT, A. A. PADHYE, I. F. SALKIN, M. GEIMER, A. BASSEL, D. J. SULLIVAN, M. CLARKE und V. HEARN: *Rapid identification of Candida dubliniensis with commercial yeast identification systems. J. Clin. Microbiol., 37(11):3533–3539, 1999.*
- [91] PITT, J. I. und A. D. HOCKING: *Fungi and food spoilage. Blackie Academic and Professional, London, 2. Aufl., 1997.*
- [92] POSTERARO, B., M. SANGUINETTI, L. ROMANO, R. TORELLI, L. NOVARESE und G. FADDA: *Molecular tools for differentiating probiotic and clinical strains of Saccharomyces cerevisiae. Int. J. Food Microbiol., 103(3):295–304, 2005.*

- [93] POWELL, H., C. SAND und R. RENNIE: *Evaluation of CHROMagar Candida for Presumptive Identification of Clinically Important Candida Species*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 32:201–204, 1998.
- [94] PRILLINGER, H., O. MOLNAR, F. ELISKASES-LECHNER und K. LOPANDIC: *Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 75(4):267–283, 1999.
- [95] QIAN, J., J. E. CUTLER, R. B. COLE und Y. CAI: *MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 392(3):439–449, 2008.
- [96] RAMANI, R., S. GROMADZKI, D. H. PINCUS, I. F. SALKIN und V. CHATURVEDI: *Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates*. *J. Clin. Microbiol.*, 36(11):3396–3398, 1998.
- [97] REBUFFO, C. A., J. SCHMITT, M. WENNING, F. VON STETTEN und S. SCHERER: *Reliable and rapid identification of Listeria monocytogenes and Listeria species by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(2):994–1000, 2006.
- [98] REBUFFO-SCHEER, C. A., C. KIRSCHNER, M. STAEMMLER und D. NAUMANN: *Rapid species and strain differentiation of non-tuberculous mycobacteria by Fourier-Transform Infrared microspectroscopy*. *J. Microbiol. Methods*, 68(2):282–290, 2007.
- [99] REBUFFO-SCHEER, C. A., J. SCHMITT und S. SCHERER: *Differentiation of Listeria monocytogenes serovars by using artificial neural network analysis of Fourier-transformed infrared spectra*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(3):1036–1040, 2007.
- [100] SANDT, C., G. D. SOCKALINGUM, D. AUBERT, H. LEPAN, C. LEPOUSE, M. JAUSAUD, A. LEON, J. M. PINON, M. MANFAIT und D. TOUBAS: *Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of Candida albicans strains isolated in intensive care units*. *J. Clin. Microbiol.*, 41(3):954–959, 2003.
- [101] SANDVEN, P.: *Epidemiology of candidemia*. *Rev. Iberoam. Micol.*, 17(3):73–81, 2000.

- [102] SAVITZKY, A. und M. GOLAY: *Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures*. Anal. Chem., 36:1627–1639, 1964.
- [103] SCHMITT, J. und T. UDELHOVEN: *Use of Artificial Neural Networks in Biomedical Diagnosis*. In: GREMLICH, H. U. und B. YAN (Hrsg.): *Infrared and Raman Spectroscopy of Biomedical Materials*, S. 379–419. Marcel Dekker, New York, 2001.
- [104] SCORZETTI, G., J. W. FELL, A. FONSECA und A. STATZELL-TALLMAN: *Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions*. FEMS Yeast Res., 2(4):495–517, 2002.
- [105] SENDID, B., N. FRANCOIS, A. STANDAERT, E. DEHECQ, F. ZERIMECH, D. CAMUS und D. POULAIN: *Prospective evaluation of the new chromogenic medium CandiSelect 4 for differentiation and presumptive identification of the major pathogenic Candida species*. J. Med. Microbiol., 56(4):495–499, 2007.
- [106] SIMON, O., A. JADAMUS und W. VAHJEN: *Probiotic feed additives - effectiveness and expected modes of action*. J. Anim. Feed Sci., 10(1):51–67, 2001.
- [107] SPENCER, J. und D. SPENCER: *Yeasts in natural and artificial habitats*. Springer Verlag, Berlin, 1. Aufl., 1997.
- [108] STANLEY, G.: *New developments in functional starters*. The dairy industry, Symp. Proc., 53:162–191, 1991.
- [109] THOMPSON, J., T. GIBSON, F. PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN und D. HIGGINS: *The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool*. Nucleic Acids Res., 25:4876–4882, 1997.
- [110] TIMMINS, E. M., D. E. QUAIN und R. GOODACRE: *Differentiation of brewing yeast strains by pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy*. Yeast, 14(10):885–893, 1998.
- [111] TINTELNOT, K., G. HAASE, M. SEIBOLD, F. BERGMANN, M. STAEMMLER, T. FRANZ und D. NAUMANN: *Evaluation of Phenotypic Markers for Selection and Identification of Candida dubliniensis*. J. Clin. Microbiol., 38(4):1599–1608, 2000.

- [112] TORTORANO, A. M., J. PEMAN, H. BERNHARDT, L. KLINGSPOR, C. C. KIBBLER, O. FAURE, E. BIRAGHI, E. CANTON, K. ZIMMERMANN, S. SEATON und R. GRILLOT: *Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 23(4):317–322, 2004.
- [113] TOUBAS, D., M. ESSENDOUBI, I. ADT, J. M. PINON, M. MANFAIT und G. D. SOCKALINGUM: *FTIR spectroscopy in medical mycology: applications to the differentiation and typing of Candida*. Anal. Bioanal. Chem., 387(5):1729–1737, 2007.
- [114] UDELHOVEN, T., D. NAUMANN und J. SCHMITT: *Development of a hierarchical classification system with artificial neural networks and FT-IR spectra for the identification of bacteria*. Appl. Spectrosc., 54(10):1471–1479, 2000.
- [115] UDELHOVEN, T., M. NOVOZHILOV und J. SCHMITT: *The NeuroDeveloper: a tool for modular neural classification of spectroscopic data*. Chemom. Intell. Lab. Syst., 66:219–226, 2003.
- [116] VALENTE, P., J. P. RAMOS und O. LEONCINI: *Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy*. Can. J. Microbiol., 45(11):949–958, 1999.
- [117] VASDINYEI, R. und T. DEAK: *Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques*. Int. J. Food Microbiol., 86(1-2):123–130, 2003.
- [118] VDLUFA: *Standard operating procedure for identifying bacteria, yeasts, moulds and dematiaceae as product-typical or spoilage-indicating indicator-microorganisms*. In: *Method Book*, Bd. III, 7. Suppl., Kap. 28.1.3. VDLUFA Verlag, Darmstadt, 2007.
- [119] VILLA-CARVAJAL, M., A. QUEROL und C. BELLOCH: *Identification of species in the genus Pichia by restriction of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S ribosomal DNA gene*. Antonie Van Leeuwenhoek, 90(2):171–181, 2006.

-
- [120] VRESE, M. DE und J. SCHREZENMEIR: *Probiotics, prebiotics, and synbiotics*. In: *Food Biotechnology*, Bd. 111 d. Reihe *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, S. 1–66. Springer, Berlin, 2008.
- [121] WENNING, M., S. SCHERER und D. NAUMANN: *Infrared spectroscopy in the identification of microorganisms*. In: DIEM, M., P. GRIFFITH und J. CHALMER (Hrsg.): *Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis*, S. 71–96. John Wiley & Sons, Chichester, 2008.
- [122] WENNING, M., H. SEILER und S. SCHERER: *Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(10):4717–4721, 2002.

A Stammliste der klinischen Isolate

Die folgende Stammliste umfasst alle 210 Isolate der 30 klinisch relevanten Hefearten, die zum Aufbau einer Datenbank für den Einsatz in der klinischen Diagnostik verwendet wurden. Desweiteren sind die Identifizierungsergebnisse der neu erstellten FTIR-Referenzdatenbank sowie des Identifizierungssystems API ID32C von bioMérieux aufgeführt.

Die Isolate wurden von folgenden Quellen bezogen:

¹ Dr. H.-P. Seidl, Mykologisches Labor, Dermatologische Klinik und Poliklinik der TU München

² apl. Prof. Dr. G. Haase, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum der RWTH Aachen

^T Typstamm

* Diese Arten weisen eine identische 26S rDNS-Sequenz auf, ihre Unterscheidung ist jedoch mittels HCA möglich.

CBS: Centralbureau voor Schimmelcultures, Niederlande

Stamm	Stammsammlung	Glyzerin	26S rDNS-Sequenzierung	Datenbank	Validierung	Ergebnis FTIR-Datenbank	Ergebnis API ID 32C
<i>C. africana</i>		3125 ¹			X	<i>C. africana</i>	
<i>C. africana</i>		3450 ¹		X			
<i>C. africana</i>	CBS 8781 ^T	3485		X			
<i>C. africana</i>	CBS 9118	3486		X			
<i>C. africana</i>	CBS 9119	3487		X			
<i>C. africana</i>		3504 ²	* <i>C. africana</i> / <i>C. albicans</i> 99 %		X	<i>C. africana</i>	
<i>C. africana</i>		3505 ²	* <i>C. africana</i> / <i>C. albicans</i> 99 %	X			
<i>C. africana</i>		3506 ²	* <i>C. africana</i> / <i>C. albicans</i> 99 %	X			
<i>C. africana</i>		3507 ²	* <i>C. africana</i> / <i>C. albicans</i> 99 %		X	<i>C. africana</i>	
<i>C. africana</i>		3508 ²	* <i>C. africana</i> / <i>C. albicans</i> 99 %	X			
<i>C. africana</i>		3644 ¹			X	<i>C. africana</i>	
<i>C. albicans</i>		3091 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3092 ¹			X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 99,9 %
<i>C. albicans</i>		3093 ¹			X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 99,9 %
<i>C. albicans</i>		3094 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3095 ¹			X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 99,9 %
<i>C. albicans</i>		3096 ¹	<i>C. albicans</i> 100 %	X			
<i>C. albicans</i>		3098 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3099 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3100 ¹			X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 99,9 %
<i>C. albicans</i>		3102 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3103 ¹	<i>C. albicans</i> 100 %	X			
<i>C. albicans</i>		3104 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3105 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3106 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3107 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3108 ¹			X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 99,9 %
<i>C. albicans</i>		3109 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3111 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3112 ¹			X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 99,9 %
<i>C. albicans</i>		3113 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3114 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3182 ¹	<i>C. albicans</i> 100 %		X	nicht eindeutig	

Stamm	Stammsammlung	Glycerin	26S rDNS-Sequenzierung	Datenbank	Validierung	Ergebnis FTIR-Datenbank	Ergebnis API ID 32C
<i>C. albicans</i>		3183 ¹	<i>C. albicans</i> 100 %	X			
<i>C. albicans</i>		3184 ¹			X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 99,9 %
<i>C. albicans</i>		3186 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3187 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3188 ¹			X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 99,9 %
<i>C. albicans</i>		3189 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3190 ¹	<i>C. albicans</i> 99 %	X			
<i>C. albicans</i>		3191 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3192 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3193 ¹			X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 99,9 %
<i>C. albicans</i>		3194 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3195 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3197 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3426 ¹	<i>C. albicans</i> 99 %		X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 99,9 %
<i>C. albicans</i>		3606 ¹			X	nicht eindeutig	
<i>C. albicans</i>		3607 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3608 ¹	<i>C. albicans</i> 99 %	X			
<i>C. albicans</i>		3609 ¹			X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 99,9 %
<i>C. albicans</i>		3610 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3611			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3612 ¹			X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 99,9 %
<i>C. albicans</i>		3613 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3614 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3615 ¹			X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 99,9 %
<i>C. albicans</i>		3616 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3617 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3618 ¹			X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 99,9 %
<i>C. albicans</i>		3619 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3620 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3621 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3622 ¹			X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 99,9 %
<i>C. albicans</i>		3623 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3624 ¹	<i>C. albicans</i> 99 %	X			

Stamm	Stammsammlung	Glycerin	26S rDNS-Sequenzierung	Datenbank	Validierung	Ergebnis FTIR-Datenbank	Ergebnis API ID 32C
<i>C. albicans</i>		3625 ¹			X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 99,9%
<i>C. albicans</i>		3626 ¹	<i>C. albicans</i> 100%		X	nicht eindeutig	
<i>C. albicans</i>		3627 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3629 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3630 ¹			X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 99,9%
<i>C. albicans</i>		3631 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3632 ¹	<i>C. albicans</i> 99%	X			
<i>C. albicans</i>		3633 ¹			X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 99,9%
<i>C. albicans</i>		3634 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3635 ¹			X	nicht eindeutig	
<i>C. albicans</i>		3636 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3637 ¹	<i>C. albicans</i> 99%		X	FALSCH	
<i>C. albicans</i>		3638 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3639 ¹	<i>C. albicans</i> 99%		X	nicht eindeutig	<i>C. albicans</i> 99,9%
<i>C. albicans</i>		3640 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3641 ¹		X			
<i>C. albicans</i>		3110 ¹			X	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>		3134 ¹	<i>C. albicans</i> 100%	X			
<i>C. albicans</i>		3469 ¹			X	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> 99,9%
<i>C. catenulata</i>		3395 ¹	<i>C. catenulata</i> 98%		X	FALSCH	
<i>C. dubliniensis</i>		3097 ¹	<i>C. dubliniensis</i> 100%	X			
<i>C. dubliniensis</i>		3101 ¹	<i>C. dubliniensis</i> 100%		X	nicht eindeutig	<i>C. dubliniensis</i> 99,9%
<i>C. dubliniensis</i>		3196 ¹	<i>C. dubliniensis</i> 100%		X	nicht eindeutig	unzulässiges Profil
<i>C. dubliniensis</i>		3451 ¹		X			
<i>C. dubliniensis</i>	CBS 7987 ^T	3488		X			
<i>C. dubliniensis</i>	CBS 7988	3489		X			
<i>C. dubliniensis</i>	CBS 8500	3490		X			
<i>C. dubliniensis</i>	CBS 8501	3491		X			
<i>C. dubliniensis</i>		3509 ²	<i>C. dubliniensis</i> 96%	X			
<i>C. dubliniensis</i>		3510 ²	<i>C. dubliniensis</i> 100%	X			
<i>C. dubliniensis</i>		3511 ²	<i>C. dubliniensis</i> 96%	X			
<i>C. dubliniensis</i>		3512 ²	<i>C. dubliniensis</i> 97%	X			
<i>C. dubliniensis</i>		3513 ²	<i>C. dubliniensis</i> 100%	X			

Stamm	Stammsammlung	Glycerin	26S rDNS-Sequenzierung	Datenbank	Validierung	Ergebnis FTIR-Datenbank	Ergebnis API ID 32C
<i>C. dubliniensis</i>		3628 ¹	<i>C. dubliniensis</i> 99 %		X	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i> 99,9 %
<i>C. glabrata</i>		3115 ¹			X	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i> 99,1 %
<i>C. glabrata</i>		3116 ¹			X	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i> 99,1 %
<i>C. glabrata</i>		3117 ¹		X			
<i>C. glabrata</i>		3198 ¹			X	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i> 99,1 %
<i>C. glabrata</i>		3199 ¹			X	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i> 99,1 %
<i>C. glabrata</i>		3200 ¹	<i>C. glabrata</i> 99 %	X			
<i>C. glabrata</i>		3452 ¹		X			
<i>C. glabrata</i>		3514 ²	<i>C. glabrata</i> 99 %	X			
<i>C. glabrata</i>		3515 ²	<i>C. glabrata</i> 99 %	X			
<i>C. glabrata</i>		3516 ²	<i>C. glabrata</i> 98 %	X			
<i>C. glabrata</i>		3517 ²	<i>C. glabrata</i> 95 %	X			
<i>C. glabrata</i>		3518 ²	<i>C. glabrata</i> 99 %	X			
<i>C. inconspicua</i>		3464 ¹		X			
<i>C. inconspicua</i>		3465 ¹		X			
<i>C. parapsilosis</i>		3126 ¹	<i>C. parapsilosis</i> 100 %	X			
<i>C. parapsilosis</i>		3127 ¹			X	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i> 99,9 %
<i>C. parapsilosis</i>		3128 ¹			X	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i> 99,9 %
<i>C. parapsilosis</i>		3430 ¹	<i>C. parapsilosis</i> 100 %		X	nicht eindeutig	<i>C. parapsilosis</i> 99,9 %
<i>C. parapsilosis</i>		3455 ¹		X			
<i>C. parapsilosis</i>		3519 ²	<i>C. parapsilosis</i> 95 %	X			
<i>C. parapsilosis</i>		3520 ²	<i>C. parapsilosis</i> 98 %	X			
<i>C. parapsilosis</i>		3521 ²	<i>C. parapsilosis</i> 95 %	X			
<i>C. parapsilosis</i>		3522 ²	<i>C. parapsilosis</i> 99 %	X			
<i>C. parapsilosis</i>		3523 ²	<i>C. parapsilosis</i> 100 %	X			
<i>C. parapsilosis</i>		3642 ¹			X	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i> 99,9 %
<i>C. parapsilosis</i>		3643 ¹			X	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i> 99,6 %
<i>C. pararugosa</i>		3524 ²	<i>C. pararugosa</i> 98 %		X	FALSCH	
<i>C. rugosa</i>		3204 ¹			X	FALSCH	
<i>C. tropicalis</i>		3203 ¹	<i>C. tropicalis</i> 99 %	X			
<i>C. tropicalis</i>		3205 ¹			X	nicht eindeutig	unzulässiges Profil
<i>C. tropicalis</i>		3206 ¹			X	<i>C. tropicalis</i>	unzulässiges Profil
<i>C. tropicalis</i>		3207 ¹			X	<i>C. tropicalis</i>	unzulässiges Profil

Stamm	Stammsammlung	Glyzerin	26S rDNS-Sequenzierung	Datenbank	Validierung	Ergebnis FTIR-Datenbank	Ergebnis API ID 32C
<i>C. tropicalis</i>		3525 ²	<i>C. tropicalis</i> 93 %	X			
<i>C. tropicalis</i>		3526 ²	<i>C. tropicalis</i> 100 %	X			
<i>C. tropicalis</i>		3527 ²	<i>C. tropicalis</i> 100 %	X			
<i>C. tropicalis</i>		3528 ²	<i>C. tropicalis</i> 100 %	X			
<i>C. tropicalis</i>		3529 ²	<i>C. tropicalis</i> 95 %		X	FALSCH	unzulässiges Profil
<i>C. tropicalis</i>		3578 ²			X	FALSCH	<i>C. intermedia</i> 96,8 %
<i>C. zeylanoides</i>		3185 ¹	<i>C. zeylanoides</i> 99 %		X	<i>C. zeylanoides</i>	
<i>C. zeylanoides</i>		3530 ²	<i>C. zeylanoides</i> 99 %	X			
<i>C. zeylanoides</i>		3531 ²	<i>C. zeylanoides</i> 100 %		X	<i>C. zeylanoides</i>	
<i>C. zeylanoides</i>		3532 ²	<i>C. zeylanoides</i> 100 %	X			
<i>C. zeylanoides</i>		3533 ²	<i>C. zeylanoides</i> 100 %		X	<i>C. zeylanoides</i>	
<i>C. zeylanoides</i>		3534 ²	<i>C. zeylanoides</i> 100 %	X			
<i>Cl. lusitaniae</i>		3535 ²	<i>Cl. lusitaniae</i> 96 %	X			
<i>Cl. lusitaniae</i>		3536 ²	<i>Cl. lusitaniae</i> 99 %		X	<i>Cl. lusitaniae</i>	unzulässiges Profil
<i>Cl. lusitaniae</i>		3537 ²	<i>Cl. lusitaniae</i> 99 %	X			
<i>Cl. lusitaniae</i>		3538 ²			X	<i>Cl. lusitaniae</i>	<i>C. intermedia</i> 99,1 %
<i>Cl. lusitaniae</i>		3539 ²	<i>Cl. lusitaniae</i> 99 %	X			
<i>Cr. albidus</i>		3540 ²	<i>Cr. albidus</i> 100 %		X	<i>Cr. albidus</i>	
<i>Cr. carnescens</i>		3543 ²	<i>Cr. carnescens</i> 100 %		X	FALSCH	
<i>Cr. diffluens</i>		3542 ²	<i>Cr. diffluens</i> 99 %		X	nicht eindeutig	
<i>Cr. laurentii</i>		3544 ²	<i>Cr. laurentii</i> 100 %		X	<i>Cr. laurentii</i>	
<i>Cr. laurentii</i>		3545 ²	<i>Cr. laurentii</i> 97 %	X			
<i>Cr. neoformans</i>		3547 ²	<i>Cr. neoformans</i> 100 %	X			
<i>Cr. neoformans</i>		3548 ²	<i>Cr. neoformans</i> 100 %		X	<i>Cr. neoformans</i>	<i>Cr. neoformans</i> 99,9 %
<i>Cr. neoformans</i>		3549 ²	<i>Cr. neoformans</i> 98 %	X			
<i>Cr. neoformans</i>		3550 ²	<i>Cr. neoformans</i> 99 %		X	<i>Cr. neoformans</i>	unzulässiges Profil
<i>Cr. neoformans</i>		3551 ²	<i>Cr. neoformans</i> 98 %	X			
<i>Cr. neoformans</i> <i>var. gattii</i>	CBS 7229 ^T	3494		X			
<i>Cr. neoformans</i> <i>var. neoformans</i>	CBS 7779	3495		X			
<i>Cr. terreus</i>		3552 ²	<i>Cr. terreus</i> 99 %	X			
<i>Cr. terreus</i>		3553 ²	<i>Cr. terreus</i> 99 %		X	<i>Cr. terreus</i>	

Stamm	Stammsammlung	Glycerin	26S rDNS-Sequenzierung	Datenbank	Validierung	Ergebnis FTIR-Datenbank	Ergebnis API ID 32C
<i>Cr. uniguttulatus</i>	CBS 1730 ^T	3496		X			
<i>Cr. uniguttulatus</i>	CBS 2994	3497		X			
<i>Cr. uniguttulatus</i>		3554 ²	<i>Cr. uniguttulatus</i> 100 %		X	<i>Cr. uniguttulatus</i>	unzulässiges Profil
<i>Cr. uniguttulatus</i>		3555 ²	<i>Cr. uniguttulatus</i> 100 %		X	<i>Cr. uniguttulatus</i>	unzulässiges Profil
<i>Cr. uniguttulatus</i>		3556 ²	<i>Cr. uniguttulatus</i> 100 %		X	<i>Cr. uniguttulatus</i>	unzulässiges Profil
<i>Cr. uniguttulatus</i>		3557 ²	<i>Cr. uniguttulatus</i> 100 %	X			
<i>D. hansenii</i>		3558 ²	<i>D. hansenii</i> 96 %		X	<i>D. hansenii</i>	
<i>D. hansenii</i>		3559 ²		X			
<i>D. hansenii</i>		3560 ²	<i>D. hansenii</i> 99 %	X			
<i>D. hansenii</i>		3561 ²	<i>D. hansenii</i> 100 %		X	<i>D. hansenii</i>	
<i>D. hansenii</i>		3562 ²			X	<i>D. hansenii</i>	
<i>Galactomyces geotrichum</i>		3208 ¹		X			
<i>Galactomyces geotrichum</i>		3209 ¹			X	<i>Galactomyces geotrichum</i>	
<i>Galactomyces geotrichum</i>		3210 ¹		X			
<i>Galactomyces geotrichum</i>		3211 ¹			X	<i>Galactomyces geotrichum</i>	
<i>Galactomyces geotrichum</i>		3212 ¹		X			
<i>I. occidentalis</i>		3463 ¹		X			
<i>I. orientalis</i>		3121 ¹			X	<i>I. orientalis</i>	<i>I. orientalis</i> 99,7 %
<i>I. orientalis</i>		3122 ¹		X			
<i>I. orientalis</i>		3123 ¹			X	<i>I. orientalis</i>	<i>I. orientalis</i> 99,7 %
<i>I. orientalis</i>		3124 ¹			X	<i>I. orientalis</i>	<i>I. orientalis</i> 99,7 %
<i>I. orientalis</i>		3453 ¹		X			
<i>I. orientalis</i>		3566 ²	<i>I. orientalis</i> 100 %		X	<i>I. orientalis</i>	<i>I. orientalis</i> 99,7 %
<i>I. orientalis</i>		3454 ¹	<i>I. orientalis</i> 100 %	X			
<i>I. orientalis</i>		3574 ²	<i>I. orientalis</i> 98 %		X	<i>I. orientalis</i>	<i>I. orientalis</i> 97,8 %
<i>Kluyveromyces marxianus</i>		3201 ¹			X	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	

Stamm	Stammsammlung	Glycerin	26S rDNS-Sequenzierung	Datenbank	Validierung	Ergebnis FTIR-Datenbank	Ergebnis API ID 32C
<i>Kluyveromyces marxianus</i>		3202 ¹			X	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>P. guilliermondii</i> 92,1 %
<i>P. guilliermondii</i>		3118 ¹	<i>P. guilliermondii</i> 100 %	X			
<i>P. guilliermondii</i>		3119 ¹	<i>P. guilliermondii</i> 99 %	X			
<i>P. guilliermondii</i>		3120 ¹			X	<i>P. guilliermondii</i>	
<i>P. guilliermondii</i>		3503 ²			X	<i>P. guilliermondii</i>	
<i>P. guilliermondii</i>		3563 ²	<i>P. guilliermondii</i> 95 %	X			
<i>P. guilliermondii</i>		3564 ²	<i>P. guilliermondii</i> 100 %		X	<i>P. guilliermondii</i>	
<i>P. guilliermondii</i>		3565 ²	<i>P. guilliermondii</i> 96 %	X			
<i>P. guilliermondii</i>		3567 ²	<i>P. guilliermondii</i> 98 %	X			
<i>P. jadinii</i>		3568 ²	<i>P. jadinii</i> 99 %	X			
<i>P. jadinii</i>		3569 ²	<i>P. jadinii</i> 99 %		X	<i>P. jadinii</i>	
<i>T. asahii</i>		3570 ²	<i>T. asahii</i> 100 %	X			
<i>T. asahii</i>		3571 ²	<i>T. asahii</i> 100 %		X	FALSCH	
<i>T. asahii</i>		3572 ²	<i>T. asahii</i> 100 %	X			
<i>T. cutaneum</i>	CBS 8191	3493 ¹		X			
<i>T. ovoides</i>		3427 ¹		X			
<i>T. ovoides</i>		3428 ¹		X			
<i>Y. lipolytica</i>		3645 ¹	<i>Y. lipolytica</i> 100 %	X			
<i>Y. lipolytica</i>		3575 ²	<i>Y. lipolytica</i> 99 %	X			
<i>Y. lipolytica</i>		3576 ²	<i>Y. lipolytica</i> 99 %	X			
<i>Y. lipolytica</i>		3577 ²	<i>Y. lipolytica</i> 99 %		X	<i>Y. lipolytica</i>	

B Stammliste der Gattungen *Issatchenkia* und *Pichia*

Die folgende Stammliste umfasst 416 *Issatchenkia*- und *Pichia*-Stämme, die zur Etablierung und Validierung des KNN verwendet wurden. Zusätzliche Angaben finden sich über ihre Herkunft sowie Ergebnisse der 26S rDNS-Sequenzierung.

¹ Stamm wird in der CBS Stammsammlung unter der Bezeichnung *I. occidentalis* geführt

² Stamm wird in der DSMZ Stammsammlung unter der Bezeichnung *I. orientalis* geführt

^{NT} Neo-Typstamm

^T Typstamm

CBS: Centralbureau voor Schimmelcultures, Niederlande

DSMZ: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

MUCL: Industrial Fungi and Yeasts Collection, Belgien

WSYC: Weihenstephan Yeast Collection

Stamm	Herkunft	Stammsammlung	Glycerin	26S rDNS- SSequenzierung	Training	externe Validierung
<i>I. hanoiensis</i>	<i>Conopomorpha cramei</i> Snellen (javanische Kakaomotte)	CBS 9198 ^T			X	
<i>I. hanoiensis</i>	<i>Conopomorpha cramei</i> Snellen (javanische Kakaomotte)	CBS 9199			X	
<i>I. hanoiensis</i>	<i>Conopomorpha cramei</i> Snellen (javanische Kakaomotte)	CBS 9200			X	
<i>I. occidentalis</i>	Käse		3236	<i>I. occidentalis</i> 100 %		X
<i>I. occidentalis</i>	Luftkeim		357 K	<i>I. occidentalis</i> 100 %	X	
<i>I. occidentalis</i>	Bier		B 95-76		X	
<i>I. occidentalis</i>	Traubensaft	CBS 10322				X
<i>I. occidentalis</i>	<i>Drosophila crucigera</i> (Fruchtfliege)	CBS 1910			X	
<i>I. occidentalis</i>	Boden	CBS 6399			X	
<i>I. occidentalis</i>	keine Angaben	CBS 6887		<i>I. occidentalis</i> 100 %	X	
<i>I. occidentalis</i>	NRRL Y-7552	CBS 6888		<i>I. occidentalis</i> 100 %	X	
<i>I. occidentalis</i>	Mutante	CBS 6890			X	
<i>I. occidentalis</i>	Mutante von NRRL Y-7767	CBS 6892		<i>I. occidentalis</i> 100 %	X	
<i>I. occidentalis</i>	Boden	CBS 7321		<i>I. occidentalis</i> 100 %	X	
<i>I. occidentalis</i>	<i>Drosophila crucigera</i> (Fruchtfliege)	MUCL 29941		<i>I. occidentalis</i> 100 %	X	
<i>I. occidentalis</i>	Lebensmittel	MUCL 42895		<i>I. occidentalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		30			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		61			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		78			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		87	<i>I. orientalis</i> 100 %		X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		383			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		384			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		386			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		387			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		389			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		392			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		633			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		705			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		735		X	
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		801		X	

Stamm	Herkunft	Stammsammlung	Glycerin	26S rDNS- SSequenzierung	Training	externe Validierung
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		900			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		915			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		966		X	
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1034			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1110			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1144			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1145			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1149			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1158			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1196			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1231			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1260			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1268			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1270			X
<i>I. orientalis</i>	Luftkeim		1323			X
<i>I. orientalis</i>	Luftkeim		1348			X
<i>I. orientalis</i>	Molke und Käse		1386			X
<i>I. orientalis</i>	Molke und Käse		1387			X
<i>I. orientalis</i>	Molke und Käse		1396			X
<i>I. orientalis</i>	Molke und Käse		1397		X	
<i>I. orientalis</i>	Molke und Käse		1412			X
<i>I. orientalis</i>	Molke und Käse		1413			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1446			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1499	<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1503			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1513			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1560			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1830			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1831			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1863			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		1927	<i>I. orientalis</i> 100 %		X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		2170			X
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		2171			X

Stamm	Herkunft	Stammsammlung	Glycerin	26S rDNS- SSequenzierung	Training	externe Validierung
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel		2174	<i>I. orientalis</i> 100 %		X
<i>I. orientalis</i>	Umwelt		2337			X
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2550	<i>I. orientalis</i> 100 %		X
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Rind)		2551			X
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Ferkel)		2552	<i>I. orientalis</i> 100 %		X
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Ferkel)		2553			X
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Ferkel)		2554			X
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Ferkel)		2555			X
<i>I. orientalis</i>	Silage		2556			X
<i>I. orientalis</i>	Brauhefe		2561			X
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Mensch)		2565			X
<i>I. orientalis</i>	Zungenabstrich (Mensch)		2566			X
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Mensch)		2570	<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Mensch)		2571			X
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Mensch)		2575			X
<i>I. orientalis</i>	Hautabstrich (Mensch)		2576	<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Mensch)		2577			X
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Mensch)		2578			X
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Mensch)		2579			X
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2580			X
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Mensch)		2581	<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Mensch)		2590			X
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Mensch)		2591	<i>I. orientalis</i> 99 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2593			X
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2594			X
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2595		X	
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2596			X
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2597			X
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2598			X
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2599			X
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2600			X
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2601			X
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2602			X

Stamm	Herkunft	Stammsammlung	Glycerin	26S rDNS- SSequenzierung	Training	externe Validierung
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Mensch)		2603	<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Mensch)		2604	<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Mensch)		2606	<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2607		X	
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2617	<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2619	<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2621	<i>I. orientalis</i> 100 %		X
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2622			X
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2623			X
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2624			X
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2625			X
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2626			X
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2627	<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2628			X
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2629			X
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2724	<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2728	<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2735	<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Käse		2743	<i>I. orientalis</i> 100 %		X
<i>I. orientalis</i>	Wein		2758			X
<i>I. orientalis</i>	Wein		2759			X
<i>I. orientalis</i>	Früchte		2772			X
<i>I. orientalis</i>	Früchte		2773			X
<i>I. orientalis</i>	Käse		2799	<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2910	<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2911			X
<i>I. orientalis</i>	Futtermittel		2938			X
<i>I. orientalis</i>	Salzbad		2985			X
<i>I. orientalis</i>	Käse		2992	<i>I. orientalis</i> 100 %		X
<i>I. orientalis</i>	Käse		3035	<i>I. orientalis</i> 100 %		X
<i>I. orientalis</i>	Käse-Starterkultur		3048	<i>I. orientalis</i> 100 %		X
<i>I. orientalis</i>	klinisches Isolat		3121			X
<i>I. orientalis</i>	klinisches Isolat		3122			X

Stamm	Herkunft	Stammsammlung	Glycerin	26S rDNS- SSequenzierung	Training	externe Validierung
<i>I. orientalis</i>	klinisches Isolat		3123			X
<i>I. orientalis</i>	klinisches Isolat		3124			X
<i>I. orientalis</i>	Umwelt		160 K			X
<i>I. orientalis</i>	Umwelt		161 K			X
<i>I. orientalis</i>	Luftkeim		231 K			X
<i>I. orientalis</i>	Luftkeim		234 K			X
<i>I. orientalis</i>	Luftkeim		236 K			X
<i>I. orientalis</i>	Luftkeim		368 K			X
<i>I. orientalis</i>	Luftkeim		374 K			X
<i>I. orientalis</i>	Luftkeim		379 K			X
<i>I. orientalis</i>	Kakao	CBS 2048				X
<i>I. orientalis</i>	Kakao	CBS 2054				X
<i>I. orientalis</i>	Tee	CBS 2107 ¹		<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	keine Angaben	CBS 2911				X
<i>I. orientalis</i>	keine Angaben	CBS 5459 ^T		<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Sputum (Mensch)	DSMZ 11956		<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Fruchtsaft	DSMZ 3433 ^T		<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Sputum (Mensch)	DSMZ 6128		<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Mensch)	DSMZ 70075		<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	keine Angaben	DSMZ 70079		<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Faezes (Mensch)	DSMZ 775				X
<i>I. orientalis</i>	keine Angaben	MUCL 28821 ¹				X
<i>I. orientalis</i>	Sputum	MUCL 29849		<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Lebensmittel	MUCL 29954		<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	keine Angaben	WSYC 124		<i>I. orientalis</i> 100 %	X	
<i>I. orientalis</i>	Umwelt	WSYC 162				X
<i>I. orientalis</i>	Luftkeim	WSYC 237			X	
<i>I. orientalis</i>	Mundabstrich	WSYC 732			X	
<i>I. orientalis</i>	keine Angaben	WSYC 733			X	
<i>I. scutulata</i> var. <i>exigua</i>	Insekt	CBS 6836 ^T			X	
<i>I. scutulata</i> var. <i>exigua</i>	Mutante zu CBS 8068	CBS 8067			X	
<i>I. scutulata</i> var. <i>exigua</i>	CBS 8067	CBS 8068				X

Stamm	Herkunft	Stammsammlung	Glycerin	26S rDNS- SSequenzierung	Training	externe Validierung
<i>I. scutulata</i> var. <i>scutulata</i>	<i>Myoporum sandwicense</i> (Sandelholzbaum)	CBS 6670 ^T			X	
<i>I. scutulata</i> var. <i>scutulata</i>	CBS 6670	CBS 6671				X
<i>I. scutulata</i> var. <i>scutulata</i>	CBS 6670	CBS 6673			X	
<i>I. scutulata</i> var. <i>scutulata</i>	Boden	CBS 7887			X	
<i>I. scutulata</i> var. <i>scutulata</i>	Boden	CBS 7888			X	
<i>I. terricola</i>	Boden	CBS 2617 ^T			X	
<i>I. terricola</i>	keine Angaben	WSYC 740		<i>I. terricola</i> 99%	X	
<i>I. terricola</i>	Kirschsafft	CBS 4713			X	
<i>I. terricola</i>	Boden	CBS 4714			X	
<i>I. terricola</i>	Meerwasser	CBS 5259				X
<i>I. terricola</i>	Feigen	CBS 5376			X	
<i>I. terricola</i>	Wein	CBS 5517			X	
<i>I. terricola</i>	CBS 5259	CBS 6893		<i>I. terricola</i> 98%	X	
<i>I. terricola</i>	CBS 5259	CBS 6894		<i>I. terricola</i> 99%	X	
<i>I. terricola</i>	Weintrauben	CBS 8131				X
<i>P. angusta</i>	Lebensmittel		32	<i>P. angusta</i> 99%	X	
<i>P. angusta</i>	Lebensmittel		46			X
<i>P. angusta</i>	Lebensmittel		2243			X
<i>P. angusta</i>	Lebensmittel		2379		X	
<i>P. angusta</i>	Früchte		2542		X	
<i>P. angusta</i>	Früchte		2872			X
<i>P. angusta</i>	Früchte		2873			X
<i>P. angusta</i>	Wein		3240	<i>P. angusta</i> 98%	X	
<i>P. angusta</i>	Boden	CBS 4732 ^T			X	
<i>P. angusta</i>	Boden	CBS 7031		<i>P. angusta</i> 99%	X	
<i>P. angusta</i>	Boden	DSMZ 70277			X	
<i>P. angusta</i>	Lebensmittel	WSYC 745			X	
<i>P. angusta</i>	Früchte	WSYC 746			X	
<i>P. anomala</i>	Lebensmittel		92			X
<i>P. anomala</i>	Lebensmittel		685			X
<i>P. anomala</i>	Lebensmittel		1496		X	
<i>P. anomala</i>	Lebensmittel		1691			X

Stamm	Herkunft	Stammsammlung	Glycerin	26S rDNS- SSequenzierung	Training	externe Validierung
<i>P. anomala</i>	Lebensmittel		1929			X
<i>P. anomala</i>	Fruchtjoghurt		2334		X	
<i>P. anomala</i>	Luftkeim		3180		X	
<i>P. anomala</i>	Luftkeim		3181			X
<i>P. anomala</i>	Luftkeim		381 K	<i>P. anomala</i> 99 %	X	
<i>P. anomala</i>	Luftkeim		382 K			X
<i>P. anomala</i>	Bier		B 95-22		X	
<i>P. anomala</i>	Bier		B 95-24		X	
<i>P. anomala</i>	Persipan	WSYC 296				X
<i>P. anomala</i>	Lebensmittel	WSYC 400			X	
<i>P. anomala</i>	Umwelt	WSYC 401			X	
<i>P. anomala</i>	Lebensmittel	WSYC 402				X
<i>P. anomala</i>	Lebensmittel	WSYC 403				X
<i>P. anomala</i>	Fruchtjoghurt	WSYC 404		<i>P. anomala</i> 99 %	X	
<i>P. anomala</i>	Beeren	CBS 249			X	
<i>P. anomala</i>	Sauerteig	CBS 257			X	
<i>P. anomala</i>	keine Angaben	DSMZ 6766 ^{NT}			X	
<i>P. anomala</i>	Brauhefe	DSMZ 70130			X	
<i>P. anomala</i>	Persipan	DSMZ 70260			X	
<i>P. anomala</i>	Früchte	WSYC 405				X
<i>P. anomala</i>	Feta	WSYC 175				X
<i>P. anomala</i>	Fruchtjoghurt	WSYC 222				X
<i>P. anomala</i>	Futtermittel	WSYC 747			X	
<i>P. anomala</i>	nasaler Ausfluß (Pferd)	WSYC 748			X	
<i>P. anomala</i>	Futtermittel		2935		X	
<i>P. anomala</i>	Futtermittel		2936			X
<i>P. anomala</i>	Futtermittel		2937		X	
<i>P. cactophila</i>	Lebensmittel		352	<i>P. cactophila</i> 99 %	X	
<i>P. cactophila</i>	Molke und Käse		1400	<i>P. cactophila</i> 99 %	X	
<i>P. cactophila</i>	Lebensmittel		1627	<i>P. cactophila</i> 98 %	X	
<i>P. cactophila</i>	Bananennektar		3052	<i>P. cactophila</i> 99 %	X	
<i>P. cactophila</i>	Umwelt		111 K	<i>P. cactophila</i> 99 %	X	
<i>P. cactophila</i>	ranzige Butter	CBS 620			X	

Stamm	Herkunft	Stammsammlung	Glyzerin	26S rDNS- SSequenzierung	Training	externe Validierung
<i>P. cactophila</i>	<i>Lemaireocereus thurberi</i> (Kaktus)	CBS 6926 ^T			X	
<i>P. cactophila</i>	Umwelt	WSYC 751				X
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Kefir (Argentinien)		2897	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99%	X	
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Futtermittel		2609	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99%	X	
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Futtermittel		2610	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99%	X	
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Futtermittel		2611	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99%	X	
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Futtermittel		2612	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99%	X	
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Futtermittel		2613	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99%	X	
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Futtermittel		2615	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99%		X
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Futtermittel		2616	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99%	X	
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Futtermittel		2618	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99%		X
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Futtermittel		2725	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99%	X	
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Futtermittel		2730	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99%		X
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Futtermittel		2731	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99%	X	
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Futtermittel		2736	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99%	X	
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Futtermittel		2737	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99%		X
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Futtermittel		2815	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99%	X	

Stamm	Herkunft	Stammsammlung	Glycerin	26S rDNS- SSequenzierung	Training	externe Validierung
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Futtermittel		2816	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99 %		X
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Kefir (Argentinien)		2896	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99 %		X
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Kefir (Argentinien)		2898	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99 %	X	
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Kefir (Argentinien)		2906	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99 %		X
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Futtermittel		2934	<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99 %		X
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Futtermittel	WSYC 736		<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99 %	X	
<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i>	Futtermittel	WSYC 737		<i>P. deserticola</i> / <i>C. ethanolica</i> 99 %	X	
<i>P. fabianii</i>	Lebensmittel		845			X
<i>P. fabianii</i>	Futtermittel		2409		X	
<i>P. fabianii</i>	Bier		B 95-23		X	
<i>P. fabianii</i>	rice koji	CBS 5482			X	
<i>P. fabianii</i>	Fermenter	CBS 5640 ^T			X	
<i>P. fabianii</i>	Lebensmittel	WSYC 749		<i>P. fabianii</i> 100 %	X	
<i>P. farinosa</i>	keine Angaben		2012		X	
<i>P. farinosa</i>	Bier	CBS 185			X	
<i>P. farinosa</i>	Sake	CBS 2007			X	
<i>P. farinosa</i>	Mais	CBS 5013			X	
<i>P. farinosa</i>	keine Angaben	WSYC 61		<i>P. farinosa</i> 99 %		X
<i>P. fermentans</i>	Lebensmittel		876	<i>P. fermentans</i> 100 %	X	
<i>P. fermentans</i>	Lebensmittel		1504		X	
<i>P. fermentans</i>	Lebensmittel		1505	<i>P. fermentans</i> 100 %	X	
<i>P. fermentans</i>	Lebensmittel		1506			X
<i>P. fermentans</i>	Lebensmittel		1512	<i>P. fermentans</i> 99 %		X
<i>P. fermentans</i>	Kefir		1554			X
<i>P. fermentans</i>	Wasserkefir		1621	<i>P. fermentans</i> 100 %	X	
<i>P. fermentans</i>	Kefir		1653	<i>P. fermentans</i> 100 %		X

Stamm	Herkunft	Stammsammlung	Glyzerin	26S rDNS- SSequenzierung	Training	externe Validierung
<i>P. fermentans</i>	Kefir		1655			X
<i>P. fermentans</i>	Lebensmittel		1846		X	
<i>P. fermentans</i>	Lebensmittel		2117	<i>P. fermentans</i> 100 %	X	
<i>P. fermentans</i>	Lebensmittel		2119			X
<i>P. fermentans</i>	Lebensmittel		2366	<i>P. fermentans</i> 100 %	X	
<i>P. fermentans</i>	Fruchtjoghurt		2383		X	
<i>P. fermentans</i>	Sauerkraut		2522	<i>P. fermentans</i> 100 %	X	
<i>P. fermentans</i>	Silage		2557	<i>P. fermentans</i> 100 %	X	
<i>P. fermentans</i>	Futtermittel		2559			X
<i>P. fermentans</i>	Brauhefe		2567	<i>P. fermentans</i> 100 %	X	
<i>P. fermentans</i>	Futtermittel		2909			X
<i>P. fermentans</i>	Futtermittel		2914		X	
<i>P. fermentans</i>	Futtermittel		2915			X
<i>P. fermentans</i>	Futtermittel		2918		X	
<i>P. fermentans</i>	Futtermittel		2919			X
<i>P. fermentans</i>	Futtermittel		2933	<i>P. fermentans</i> 100 %	X	
<i>P. fermentans</i>	Käse		2955	<i>P. fermentans</i> 100 %		X
<i>P. fermentans</i>	Bananenbrei		2968	<i>P. fermentans</i> 100 %	X	
<i>P. fermentans</i>	Käse		3018			X
<i>P. fermentans</i>	Bier		B 95-83_11	<i>P. fermentans</i> 99 %	X	
<i>P. fermentans</i>	Buttermilch	CBS 187 ^T			X	
<i>P. fermentans</i>	Käse	CBS 246			X	
<i>P. fermentans</i>	Bier	DSMZ 70086 ²		<i>P. fermentans</i> 100 %	X	
<i>P. fermentans</i>	Silage	WSYC 741			X	
<i>P. fermentans</i>	Brauhefe	CBS 2066 ^T			X	
<i>P. fermentans</i>	Orangensaft	CBS 4807 ^T			X	
<i>P. galeiformis</i>	Fruchtjoghurt		2440	<i>P. galeiformis</i> 100 %	X	
<i>P. galeiformis</i>	Lebensmittel		2536			X
<i>P. galeiformis</i>	Futtermittel		2939	<i>P. galeiformis</i> 100 %	X	
<i>P. galeiformis</i>	Käse		3019	<i>P. galeiformis</i> 99 %	X	
<i>P. galeiformis</i>	Bier		B 95-26		X	
<i>P. galeiformis</i>	Früchte	WSYC 738			X	
<i>P. galeiformis</i>	Portwein	WSYC 753			X	

Stamm	Herkunft	Stammsammlung	Glycerin	26S rDNS- SSequenzierung	Training	externe Validierung
<i>P. guilliermondii</i>	Lebensmittel		360			X
<i>P. guilliermondii</i>	Lebensmittel		730		X	
<i>P. guilliermondii</i>	Lebensmittel		1063			X
<i>P. guilliermondii</i>	Lebensmittel		1118		X	
<i>P. guilliermondii</i>	Lebensmittel		1251			X
<i>P. guilliermondii</i>	Sauerteig		1303	<i>P. guilliermondii</i> 98 %		X
<i>P. guilliermondii</i>	Lebensmittel		1567			X
<i>P. guilliermondii</i>	Lebensmittel		1761			X
<i>P. guilliermondii</i>	Lebensmittel		1762		X	X
<i>P. guilliermondii</i>	Lebensmittel		1771		X	X
<i>P. guilliermondii</i>	Lebensmittel		1772			X
<i>P. guilliermondii</i>	Umwelt		2864		X	
<i>P. guilliermondii</i>	Umwelt		2865		X	
<i>P. guilliermondii</i>	Lebensmittel		3083		X	
<i>P. guilliermondii</i>	Cerealien		3089	<i>P. guilliermondii</i> 100 %	X	
<i>P. guilliermondii</i>	klinisches Isolat		3119	<i>P. guilliermondii</i> 99 %	X	
<i>P. guilliermondii</i>	klinisches Isolat		3120			X
<i>P. guilliermondii</i>	Bier		B95-27		X	
<i>P. guilliermondii</i>	Bier		B95-28		X	
<i>P. guilliermondii</i>	Bier		B95-60		X	
<i>P. guilliermondii</i>	Sputum (Mensch)	DSMZ 6381			X	
<i>P. guilliermondii</i>	Insektenkot auf <i>Ulmus americana</i> (Ulme)	CBS 2030 ^T			X	
<i>P. guilliermondii</i>	Butter	DSMZ 70052			X	
<i>P. guilliermondii</i>	Käse	WSYC 164		<i>P. guilliermondii</i> 100 %	X	
<i>P. guilliermondii</i>	keine Angaben	WSYC 293			X	
<i>P. guilliermondii</i>	Bier	WSYC 295			X	
<i>P. guilliermondii</i>	keine Angaben	WSYC 394			X	
<i>P. guilliermondii</i>	Lebensmittel	WSYC 418		<i>P. guilliermondii</i> 99 %		X
<i>P. guilliermondii</i>	Lebensmittel	WSYC 420		<i>P. guilliermondii</i> 99 %		X
<i>P. guilliermondii</i>	klinisches Isolat	WSYC 750			X	
<i>P. jadinii</i>	Lebensmittel		587		X	
<i>P. jadinii</i>	Lebensmittel		1474	<i>P. jadinii</i> 98 %	X	

Stamm	Herkunft	Stammsammlung	Glycerin	26S rDNS- SSequenzierung	Training	externe Validierung
<i>P. jadinii</i>	Lebensmittel		1514		X	
<i>P. jadinii</i>	Lebensmittel		1584	<i>P. jadinii</i> 99 %	X	
<i>P. jadinii</i>	Joghurt		2431		X	
<i>P. jadinii</i>	Früchte		3006	<i>P. jadinii</i> 98 %	X	
<i>P. jadinii</i>	Füchte		3055			X
<i>P. jadinii</i>	klinisches Isolat	CBS 1600			X	
<i>P. jadinii</i>	Kuh mit Mastitis	CBS 4885			X	
<i>P. jadinii</i>	keine Angaben	DSMZ 2361			X	
<i>P. jadinii</i>	Käse	WSYC 141			X	
<i>P. jadinii</i>	Früchte	WSYC 743			X	
<i>P. kluyveri</i>	Lebensmittel		1659			X
<i>P. kluyveri</i>	Lebensmittel		2376		X	
<i>P. kluyveri</i>	Lebensmittel		2382		X	
<i>P. kluyveri</i>	Lebensmittel		2384			X
<i>P. kluyveri</i>	Lebensmittel		2386	<i>P. kluyveri</i> 98 %	X	
<i>P. kluyveri</i>	Lebensmittel		2443	<i>P. kluyveri</i> 99 %	X	
<i>P. kluyveri</i>	Futtermittel		2908		X	
<i>P. kluyveri</i>	Wein		3244		X	
<i>P. kluyveri</i>	Wein		3245			X
<i>P. kluyveri</i>	Wein		3248	<i>P. kluyveri</i> 99 %	X	
<i>P. kluyveri</i>	Oliven	CBS 188 ^T			X	
<i>P. kluyveri</i>	Früchte	WSYC 728			X	
<i>P. kluyveri</i>	keine Angaben	WSYC 729			X	
<i>P. kluyveri</i>	Früchte		2954		X	
<i>P. kluyveri</i> var. <i>cephalocereana</i>	<i>Cephalocereus royenii</i> (Kaktus)	CBS 7273 ^T			X	
<i>P. kluyveri</i> var. <i>eremophila</i>	<i>Stenocereus thurberi</i> (Kaktus)	CBS 7271 ^T			X	
<i>P. kluyveri</i> var. <i>kluyveri</i>	Most	CBS 7145 ^T			X	
<i>P. membranifaciens</i>	WSYC 1363		1694			X
<i>P. membranifaciens</i>	Lebensmittel		1787		X	
<i>P. membranifaciens</i>	Lebensmittel		1788		X	
<i>P. membranifaciens</i>	Lebensmittel		2077			X
<i>P. membranifaciens</i>	Lebensmittel		2084			X
<i>P. membranifaciens</i>	Lebensmittel		2098			X

Stamm	Herkunft	Stammsammlung	Glycerin	26S rDNS- SSequenzierung	Training	externe Validierung
<i>P. membranifaciens</i>	Lebensmittel		2266		X	
<i>P. membranifaciens</i>	Lebensmittel		2287			X
<i>P. membranifaciens</i>	Futtermittel		2912		X	
<i>P. membranifaciens</i>	Futtermittel		2913		X	
<i>P. membranifaciens</i>	Futtermittel		2940		X	
<i>P. membranifaciens</i>	keine Angaben		2960		X	
<i>P. membranifaciens</i>	Wein		3249			X
<i>P. membranifaciens</i>	Bier		B 95-25	<i>P. membranifaciens</i> 99 %	X	
<i>P. membranifaciens</i>	Bier		B 95-30	<i>P. membranifaciens</i> 100 %	X	
<i>P. membranifaciens</i>	Bier		B 95-31	<i>P. membranifaciens</i> 100 %	X	
<i>P. membranifaciens</i>	Bier		B 95-32	<i>P. membranifaciens</i> 100 %	X	
<i>P. membranifaciens</i>	Bier		B 95-58	<i>P. membranifaciens</i> 100 %	X	
<i>P. membranifaciens</i>	Bier		B 95-67	<i>P. membranifaciens</i> 100 %	X	
<i>P. membranifaciens</i>	Futtermittel	CBS 107 ^T			X	
<i>P. membranifaciens</i>	Koumiss	CBS 1328			X	
<i>P. membranifaciens</i>	Feta	WSYC 182			X	
<i>P. membranifaciens</i>	Feta	WSYC 199			X	
<i>P. membranifaciens</i>	Fruchtjoghurt	WSYC 228			X	
<i>P. membranifaciens</i>	Bier	WSYC 247			X	
<i>P. membranifaciens</i>	Lebensmittel	WSYC 734			X	
<i>P. membranifaciens</i>	Futtermittel	WSYC 735			X	
<i>P. nakasei</i>	Früchte	WSYC 730		<i>P. nakasei</i> 100 %	X	
<i>P. nakasei</i>	Käse	WSYC 731		<i>P. nakasei</i> 100 %	X	
<i>P. norvegensis</i>	Lebensmittel		93	<i>P. norvegensis</i> 100 %	X	
<i>P. norvegensis</i>	WSYC 238		1695	<i>P. norvegensis</i> 100 %		X
<i>P. norvegensis</i>	Frischkäse		3047	<i>P. norvegensis</i> 100 %	X	
<i>P. norvegensis</i>	ranzige Butter	CBS 2125		<i>P. norvegensis</i> 100 %	X	

Stamm	Herkunft	Stammsammlung	Glyzerin	26S rDNS- SSequenzierung	Training	externe Validierung
<i>P. norvegensis</i>	ranzige Butter	CBS 2126			X	
<i>P. norvegensis</i>	Vaginalabstrich	CBS 6639			X	
<i>P. norvegensis</i>	Fruchtjoghurt	WSYC 223			X	
<i>P. norvegensis</i>	Fruchtjoghurt	WSYC 226		<i>P. norvegensis</i> 100 %	X	
<i>P. norvegensis</i> T	Vaginalabstrich	CBS 6564			X	
<i>P. pseudocactophila</i>	Lebensmittel		1203	<i>P. pseudocactophila</i> 99 %	X	
<i>P. pseudocactophila</i>	Lebensmittel		1589	<i>P. pseudocactophila</i> 99 %	X	
<i>P. pseudocactophila</i>	<i>Pachycereus pectin-arboriginum</i> (Kaktus)	CBS 6929		<i>P. pseudocactophila</i> 99 %	X	
<i>P. triangularis</i>	Lebensmittel		1085		X	
<i>P. triangularis</i>	Lebensmittel		1086		X	
<i>P. triangularis</i>	Lebensmittel		1087			X
<i>P. triangularis</i>	Lebensmittel		1088		X	
<i>P. triangularis</i>	Lebensmittel		1092			X
<i>P. triangularis</i>	Lebensmittel		1093		X	
<i>P. triangularis</i>	Lebensmittel		1097		X	
<i>P. triangularis</i>	Lebensmittel		1101			X
<i>P. triangularis</i>	Lebensmittel		1102		X	
<i>P. triangularis</i>	Lebensmittel		2510			X
<i>P. triangularis</i>	Lebensmittel		2511		X	
<i>P. triangularis</i>	Salzbad		2996		X	
<i>P. triangularis</i>	Salzbad		2997			X
<i>P. triangularis</i>	keine Angaben	CBS 4094			X	

C Stammliste der Spezies *S. cerevisiae*

Die folgende Liste umfasst 173 *S. cerevisiae*-Stämme, die zur Entwicklung und Validierung des KNN verwendet wurden. Diese setzen sich aus 106 probiotischen Isolaten der fünf zugelassenen Futtermittelzusatzstämme (CNCM I-1077, CNCM I-1079, NCYC Sc47, NCYC 1026, MUCL 39885) sowie 67 ubiquitären Isolaten aus unterschiedlichen Habitaten zusammen. Des Weiteren ist aufgeführt, welche Isolate mit Hilfe der Referenzstammtypisierungsmethoden dHPLC und δ -PCR analysiert wurden.

CBS: Centralbureau voor Schimmelcultures, Niederlande

CNCM: Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Pasteur Institut, Frankreich

MUCL: Industrial Fungi and Yeasts Collection, Belgien

NCYC: National Collection of Yeast Cultures, England

WSYC: Weihenstephan Yeast Collection

¹ Referenzstamm für dHPLC-Profil und δ -PCR-Fragmentmuster

^{NT} Neo-Typstamm

Stamm	Probiotikum	Herkunft	Stammsammlung	Glycerin	dHPLC	δ-PCR	Training	externe Validierung
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Futtermittel	WSYC 624	2415			X	
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Ergänzungsfuttermittel für Milchkühe	WSYC 625	2634	X	X		X
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Ergänzungsfuttermittel für Milchkühe	WSYC 626	2637			X	
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Ergänzungsfuttermittel für Milchkühe	WSYC 627	2641			X	
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Ergänzungsfuttermittel für Milchkühe	WSYC 628	2642			X	
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Kristallhefe	WSYC 629	2698	X ¹	X	X	
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Futtermittel	WSYC 630	2722				X
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Futtermittel		3160				X
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Futtermittel		3161				X
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Futtermittel	WSYC 631	3237			X	
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Futtermittel	WSYC 632	3270	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Mischfuttermittel	WSYC 633	3271				X
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Glycerin 2415 - Linie a	WSYC 634	3280				X
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Glycerin 2641 - Linie a	WSYC 635	3281				X
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Futtermittel	WSYC 636	3295			X	
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Futtermittel	WSYC 637	3296				X
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Futtermittel	WSYC 638	3297				X
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Futtermittel	WSYC 639	3307			X	
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Futtermittel	WSYC 640	3310	X			X
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Futtermittel	WSYC 641	3325			X	
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Futtermittel	WSYC 642	3326			X	
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Ergänzungsfuttermittel für Milchkühe	WSYC 643	3333	X	X	X	
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Futtermittel für Milchkühe	WSYC 644	3334		X		X
<i>S. cerevisiae</i>	CNCM I-1077	Ergänzungsfuttermittel für Milchkühe	WSYC 693	3393	X	X		X
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)	Perenterol	Perenterol (CBS 5926)	WSYC 645	2342			X	
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)	Perenterol	Perenterol (CBS 5926)	WSYC 646	2692	X ¹	X	X	

Stamm	Probiotikum	Herkunft	Stammsammlung	Glyzerin	dHPLC	δ-PCR	Training	externe Validierung
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)	CNCM I-1079	Futtermittel	WSYC 648	2696			X	
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)	CNCM I-1079	keine Angaben		2905	X	X		X
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)	CNCM I-1079	Futtermittel	WSYC 649	3268			X	
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)	CNCM I-1079	Futtermittel	WSYC 650	3269			X	
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)	CNCM I-1079	Futtermittel	WSYC 651	3272			X	
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)	CNCM I-1079	Futtermittel	WSYC 652	3273	X		X	
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)	CNCM I-1079	Glycerin 2695 - Linie a	WSYC 653	3284				X
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)	CNCM I-1079	Futtermittel	WSYC 654	3308			X	
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)	CNCM I-1079	Futtermittel	WSYC 655	3309	X		X	
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)	CNCM I-1079	Futtermittel	WSYC 656	3324	X	X		X
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)	CNCM I-1079	Futtermittel	WSYC 657	3327			X	
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)	CNCM I-1079	Futtermittel	WSYC 658	3328			X	
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)	CNCM I-1079	Futtermittel	WSYC 659	3329		X		X
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)	CNCM I-1079	Futtermittel	WSYC 660	3330			X	
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)	CNCM I-1079	Futtermittel	WSYC 661	3331	X	X	X	
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)	CNCM I-1079	Futtermittel	WSYC 662	3332				X
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)	Perenterol	Perocur forte (Hartkapseln, HEXAL)	WSYC 663	3394	X			X

Stamm	Probiotikum	Herkunft	Stammsammlung	Glycerin	dHPLC	δ-PCR	Training	externe Validierung
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	CBS 493.94 YEA-Sacc, Vormischung	WSYC 664	2416	X			X
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	CBS 493.94 YEA-Sacc, Vormischung	WSYC 665	2639	X ¹	X	X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	CBS 493.94 YEA-Sacc, Vormischung	WSYC 666	2640	X			X
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	keine Angaben	WSYC 667	3238	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Glycerin 2639 - Linie a	WSYC 668	3274				X
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Glycerin 2639 - Linie b	WSYC 669	3275				X
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Glycerin 2640 - Linie a	WSYC 670	3276			X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Glycerin 2640 - Linie b	WSYC 671	3277				X
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Glycerin 2416 - Linie a	WSYC 672	3278				X
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Glycerin 2416 - Linie b	WSYC 673	3279				X
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Ergänzungsfuttermittel für Milchkühe	WSYC 674	3372			X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Ergänzungsfuttermittel für Milchkühe	WSYC 675	3373	X			X
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Ergänzungsfuttermittel für Milchkühe	WSYC 676	3374	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Mineralfuttermittel Rinder	WSYC 677	3375			X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Mineralfuttermittel Rinder	WSYC 678	3376		X		X
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Mineralfuttermittel Rinder	WSYC 679	3377			X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Kulturenkonzentrat	WSYC 680	3378	X	X	X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Mineralfuttermittel Rinder	WSYC 681	3379			X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Mineralfuttermittel Rinder	WSYC 682	3380				X
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Ergänzungsfuttermittel für Milchkühe	WSYC 683	3381				X
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Mineralfuttermittel Rinder	WSYC 684	3382			X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Mineralfuttermittel Rinder	WSYC 685	3383			X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Mineralfuttermittel Rinder	WSYC 686	3384				X
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Mineralfuttermittel Rinder	WSYC 687	3385				X
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Mineralfuttermittel Rinder	WSYC 688	3386			X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Mineralfuttermittel Rinder	WSYC 689	3387				X
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Mineralfuttermittel Rinder	WSYC 690	3388	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Mineralfuttermittel Rinder	WSYC 691	3389				X
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC 1026	Mineralfuttermittel Rinder	WSYC 692	3390	X		X	

Stamm	Probiotikum	Herkunft	Stammsammlung	Glyzerin	dHPLC	δ-PCR	Training	externe Validierung
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC Sc 47	Ergänzungsfuttermittel für Schweine	WSYC 694	2414	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC Sc 47	Ergänzungsfuttermittel für Schweine	WSYC 695	2632				X
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC Sc 47	Ergänzungsfuttermittel für Schweine	WSYC 696	2633	X ¹	X	X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC Sc 47	Ergänzungsfuttermittel für Milchkühe	WSYC 697	2635	X			X
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC Sc 47	Ergänzungsfuttermittel für Milchkühe	WSYC 698	2636			X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC Sc 47	Ergänzungsfuttermittel für Milchkühe	WSYC 699	2643	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC Sc 47	Mineralergänzungsfutter für Milchkühe	WSYC 700	2706	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC Sc 47	Lysinreiches Mineralergänzungsfuttermittel für Schweine	WSYC 701	3265	X	X		X
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC Sc 47	Glycerin 2633 - Linie a	WSYC 702	3282			X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC Sc 47	Glycerin 2706 - Linie a	WSYC 703	3283			X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC Sc 47	Hochkonzentrat	WSYC 704	3368	X	X	X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC Sc 47	Mineralergänzungsfuttermittel für Schweine	WSYC 705	3369	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC Sc 47	Mineralergänzungsfuttermittel für Schweine	WSYC 706	3370	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC Sc 47	Mineralergänzungsfuttermittel für Schweine	WSYC 707	3371	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC Sc 47	Ergänzungsfuttermittel für Milchkühe	WSYC 708	3391	X			X
<i>S. cerevisiae</i>	NCYC Sc 47	Ergänzungsfuttermittel für Rinder	WSYC 709	3392	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	MUCL 39885	Futtermittel	WSYC 710	3266	X ¹	X	X	
<i>S. cerevisiae</i>	MUCL 39885	Futtermittel	WSYC 711	3267	X	X		X
<i>S. cerevisiae</i>	MUCL 39885	Futtermittel Biosprint G	WSYC 712	3335	X	X	X	
<i>S. cerevisiae</i>	MUCL 39885	Ergänzungsfuttermittel für Milchkühe	WSYC 713	3336				X
<i>S. cerevisiae</i>	MUCL 39885	Futtermittel Biosprint G	WSYC 714	3337	X	X	X	
<i>S. cerevisiae</i>	MUCL 39885	Mineralergänzungsfuttermittel	WSYC 715	3338			X	
<i>S. cerevisiae</i>	MUCL 39885	Ergänzungsfuttermittel	WSYC 716	3339			X	
<i>S. cerevisiae</i>	MUCL 39885	Futtermittel Biosprint S	WSYC 717	3340	X	X	X	

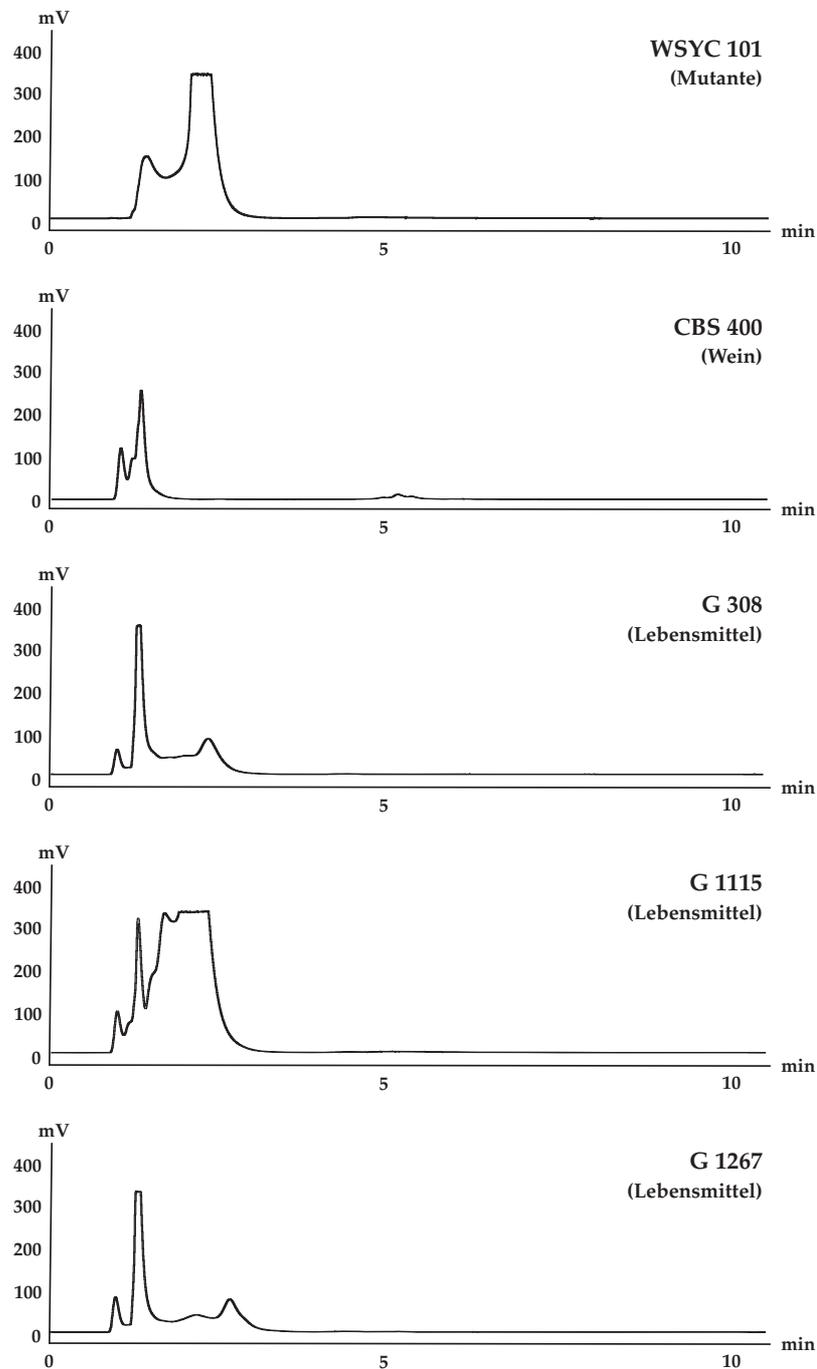
Stamm	Probiotikum	Herkunft	Stammsammlung	Glycerin	dHPLC	δ-PCR	Training	externe Validierung
<i>S. cerevisiae</i>	MUCL 39885	Ergänzungsfuttermittel	WSYC 718	3341			X	
<i>S. cerevisiae</i>	MUCL 39885	Mineralfuttermittel	WSYC 719	3342				X
<i>S. cerevisiae</i>	MUCL 39885	Mineralfuttermittel	WSYC 720	3343			X	
<i>S. cerevisiae</i>	MUCL 39885	Futtermittel Biosprint S	WSYC 721	3344	X	X		X
<i>S. cerevisiae</i>	MUCL 39885	Futtermittel Biosprint G	WSYC 722	3345	X	X		X
<i>S. cerevisiae</i>	MUCL 39885	Futtermittel Biosprint S	WSYC 723	3346	X	X	X	
<i>S. cerevisiae</i>	MUCL 39885	Futtermittel Biosprint S	WSYC 724	3347	X	X	X	
<i>S. cerevisiae</i>	MUCL 39885	Futtermittel Biosprint G	WSYC 725	3348	X	X		X
<i>S. cerevisiae</i>	MUCL 39885	Ergänzungsfuttermittel	WSYC 726	3349			X	
<i>S. cerevisiae</i>	MUCL 39885	Mineralfuttermittel für Milchkühe	WSYC 727	3350			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Lebensmittel		80			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Lebensmittel		308	X	X	X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Lebensmittel		1115	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Lebensmittel		1267	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Lebensmittel		1305	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Lebensmittel		1522			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Lebensmittel		1689				X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Lebensmittel		1777				X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	keine Angaben		1802			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Lebensmittel		1886			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Lebensmittel		2339	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Portweinreinzuchthefer		2433	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Malzkeim		2646	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Malzkeim		2647			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Malzkeim		2648	X	X		X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Malzkeim		2649	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Malzkeim		2658			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Zuckerrüben-Preßschnitzel		2660			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Zuckerrüben-Preßschnitzel		2661				X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Zuckerrüben-Preßschnitzel		2662	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Zuckerrüben-Preßschnitzel		2663			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Zuckerrüben-Preßschnitzel		2664				X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Zuckerrüben-Preßschnitzel		2665	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Zuckerrüben-Preßschnitzel		2666			X	

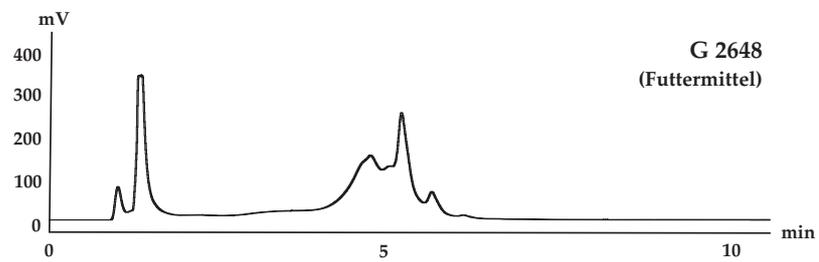
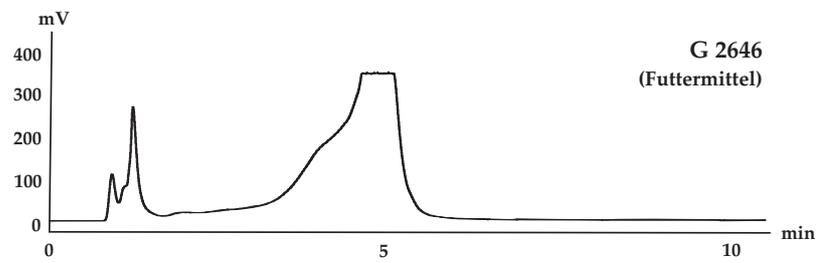
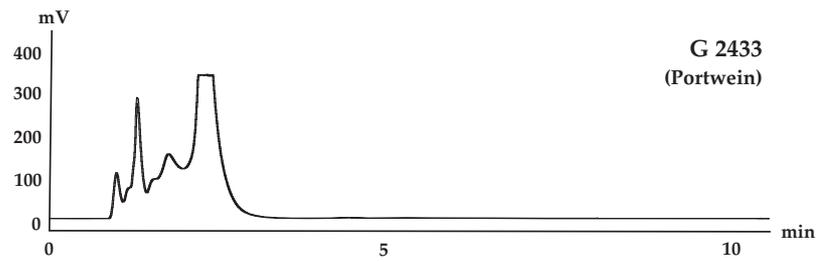
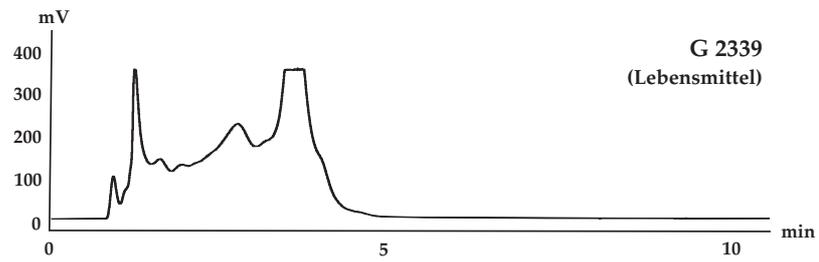
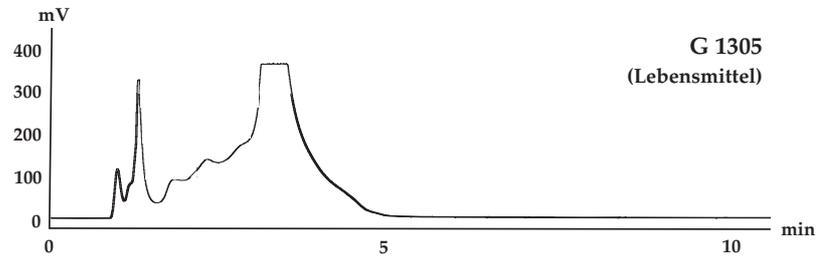
Stamm	Probiotikum	Herkunft	Stammsammlung	Glyzerin	dHPLC	δ -PCR	Training	externe Validierung
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Zuckerrüben-Preßschnitzel		2667	X	X		X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Malzkeim		2670			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Malzkeim		2677				X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Malzabrieb		2682				X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	effektive Mikroorganismen		2694				X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	effektive Mikroorganismen		2699				X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	effektive Mikroorganismen		2701				X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Flüssigfuttermittel		2702				X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Flüssigfuttermittel		2703	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Flüssigfuttermittel		2704			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Flüssigfuttermittel		2705		X	X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Flüssigfuttermittel		2707	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Flüssigfuttermittel		2708			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Flüssigfuttermittel		2709				X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Flüssigfuttermittel		2710			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Flüssigfuttermittel		2711	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Flüssigfuttermittel		2712			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Flüssigfuttermittel		2713			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Flüssigfuttermittel		2714			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Flüssigfuttermittel		2715			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Flüssigfuttermittel		2716			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Flüssigfuttermittel		2717				X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Flüssigfuttermittel		2718	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Flüssigfuttermittel		2719			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Trockenhefe		2721			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Brauhefe		2838			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Brauhefe		2842				X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Kefir (Argentinien)		2889	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Kefir (Argentinien)		2894				X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Kefir (Argentinien)		2901	X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Wasserkefir		3133			X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Wein	CBS 400		X		X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Brauhefe	CBS 1171 ^{NT}				X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	keine Angaben	CBS 1395				X	

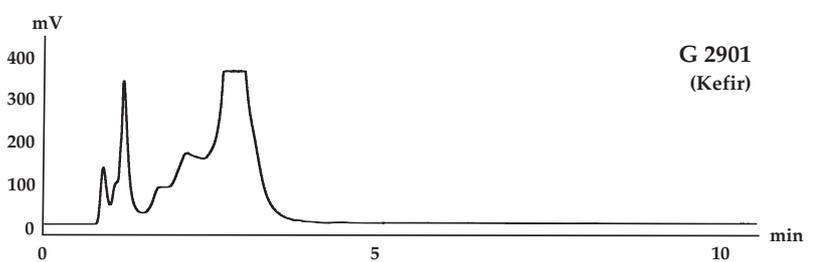
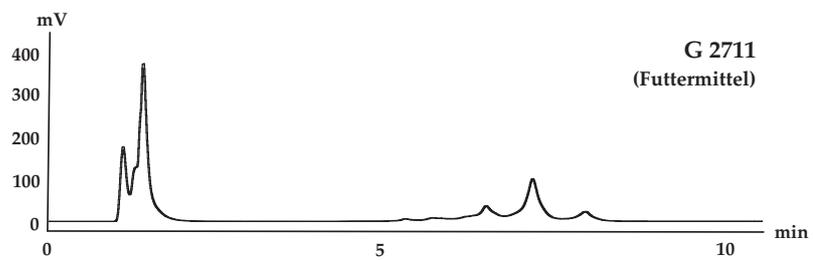
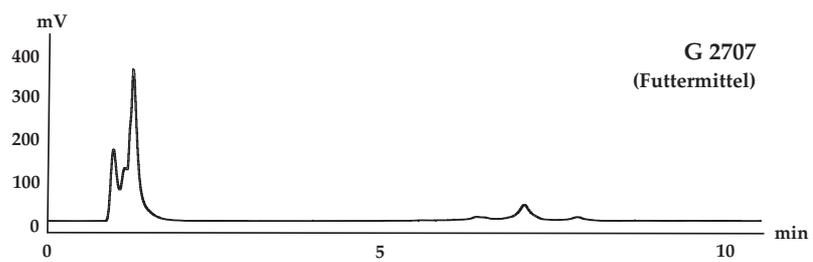
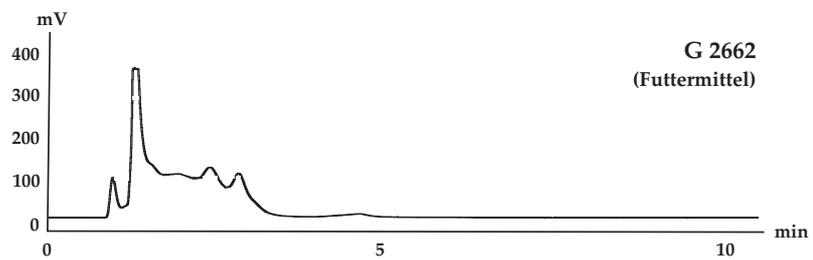
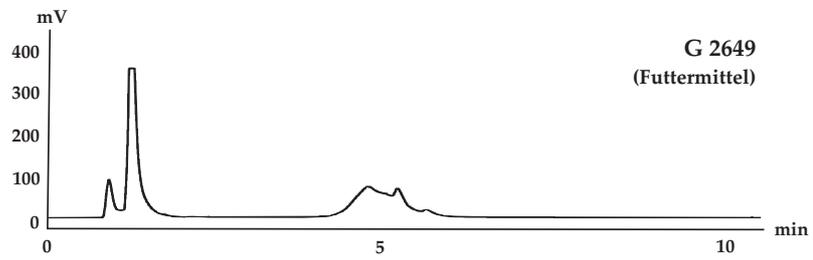
Stamm	Probiotikum	Herkunft	Stammsammlung	Glyzerin	dHPLC	δ-PCR	Training	externe Validierung
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	klinisches Isolat (Lunge)	CBS 1489				X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	keine Angaben	DSMZ 1333				X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Käse	WSYC 151				X	
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	klinisches Isolat (Nagel)	CBS 1464					X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Piniennadeln	CBS 2858					X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Alpechín (Abfallprodukt bei der Olivenölherstellung)	CBS 4903					X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Mutante	WSYC 101		X			X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	Mutante	WSYC 108					X
<i>S. cerevisiae</i>	nicht probiotisch	keine Angaben	WSYC 118					X

D dHPLC-Peakprofile ubiquitärer *S. cerevisiae*

Im Folgenden sind die dHPLC-Peakprofile von 15 ubiquitären *S. cerevisiae*-Isolaten aus unterschiedlichen Habitaten dargestellt.







Publikationen, Vorträge, Posterpräsentationen

Publikationen

Büchl, N. R., M. Wenning, H. Seiler, H. Mietke-Hofmann und S. Scherer (2008)
Reliable identification of closely related *Issatchenkia* and *Pichia* species using artificial neural network analysis of Fourier-transform infrared spectra.
Yeast 25, 11:787–798.

Büchl, N. R., M. Hutzler, H. Mietke-Hofmann, M. Wenning und S. Scherer (2009) Differentiation of probiotic and environmental *Saccharomyces cerevisiae* strains.
Submitted.

Vorträge

Identification of commercial and environmental yeast strains by FTIR-Spectroscopy and Artificial Neural Networks. EFMO Meeting 2007, Grub.

Molekularbiologische und phänotypische Differenzierung von Arten der lebensmittelrelevanten Hefegattungen *Issatchenkia* und *Pichia*. Milchkonferenz 2007, Wien.

Artificial neural network-based FTIR-Spectroscopy – A tool for differentiation of microorganisms in animal feed. EFMO Meeting 2008, Berlin.

Posterpräsentationen

Büchl, N. R., M. Wenning, H. Seiler, H. Mietke-Hofmann und S. Scherer (2006)
Molekularbiologische und phänotypische Differenzierung der Hefearten *Issatchenkia occidentalis* und *Issatchenkia orientalis*. 8. VAAM Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, Suhl.

Büchl, N. R., M. Wenning, H. Seiler, H. Mietke-Hofmann und S. Scherer (2007)
Identification of Food-Borne Yeasts by FTIR-Spectroscopy and Artificial Neu-

ral Networks. Workshop – FTIR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics, Berlin.

Büchl, N. R., M. Wenning, H. Seiler, H. Mietke-Hofmann und S. Scherer (2007) Identifizierung von Hefearten der Gattungen *Issatchenkia* und *Pichia* mit FTIR-Spektroskopie und künstlichen neuronalen Netzen. 9. VAAM Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, Seeon.

CURRICULUM VITAE

NICOLE RAMONA BÜCHL

PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum: 2. März 1981
Geburtsort: Füssen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

AUSBILDUNG

- 09/1991–06/2000: Staatliches Gymnasium mit Schülerheim Hohenschwangau, Schwangau.
Allgemeine Hochschulreife
- 10/2000–09/2005: Studium an der Technischen Universität München, Freising.
Diplom Biologie
- 01/2005–09/2005: Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie der Technischen Universität München, Freising.
Thema: Identifizierung von Milchsäurebakterien mit FT-IR Spektroskopie und künstlichen neuronalen Netzen
- 10/2005–03/2009: Promotion am Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie der Technischen Universität München, Freising.