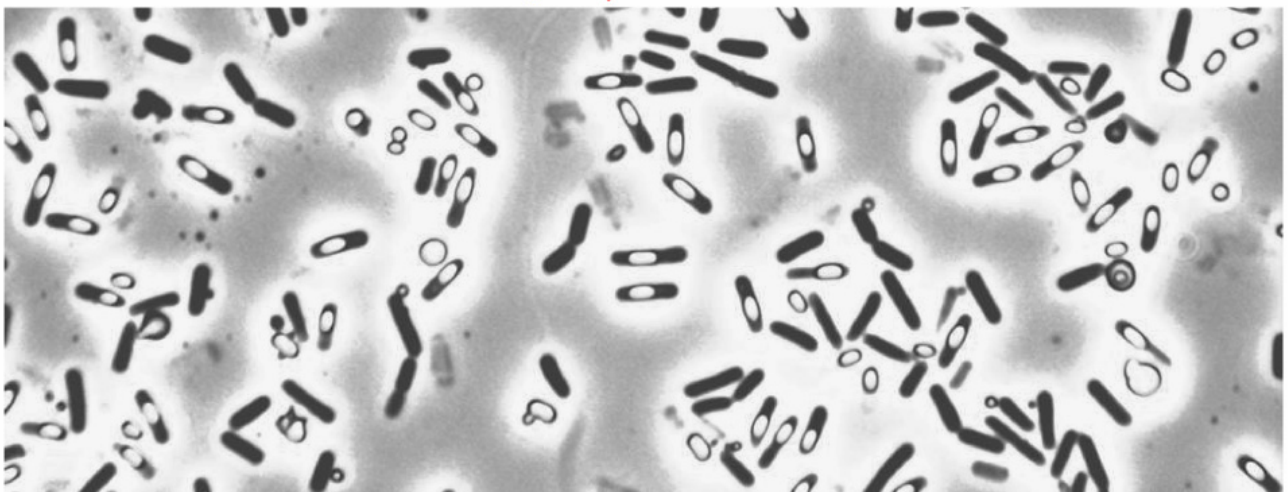
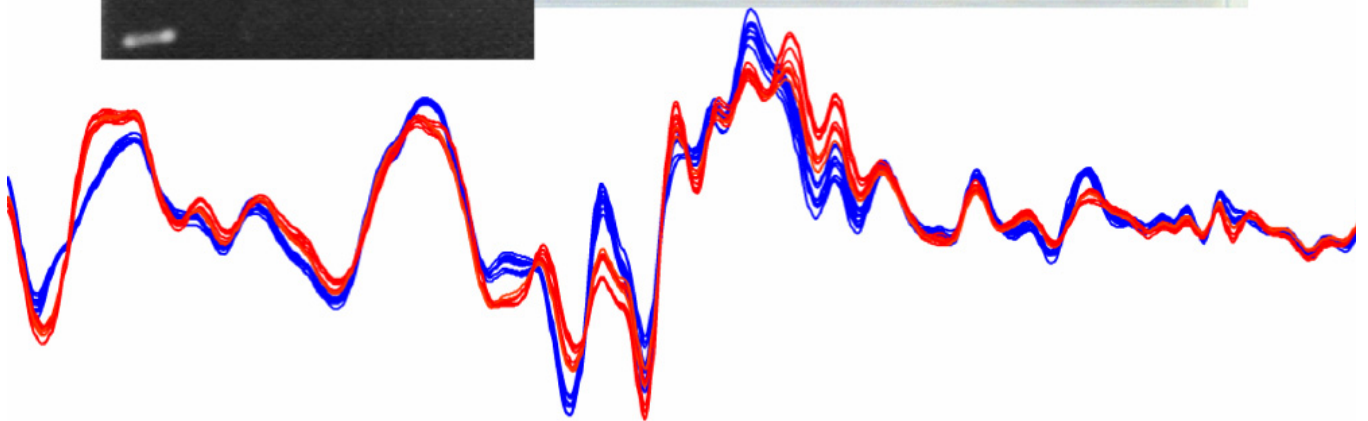
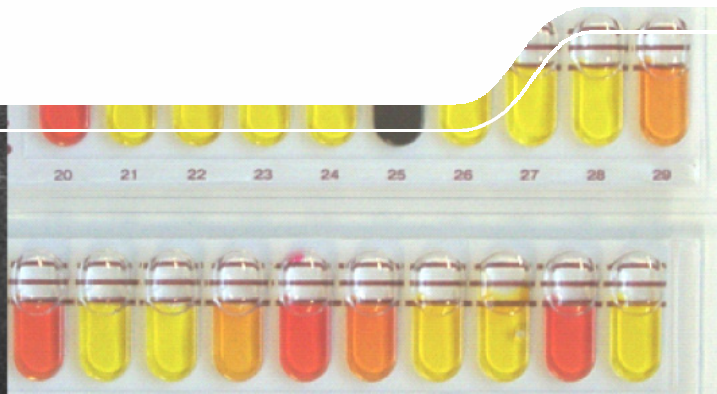
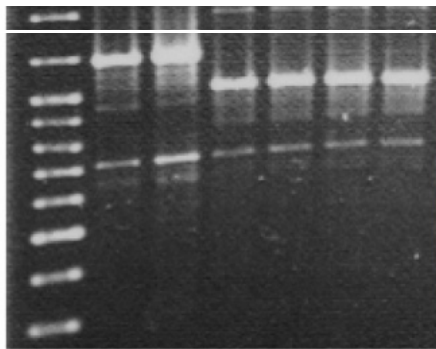


# Differenzierung probiotischer Bakterien

Schriftenreihe, Heft 26/2011



# Differenzierung von probiotischen und ubiquitären Milchsäurebakterien und aeroben Sporenbildnern aus Futtermitteln mittels FTIR-Spektroskopie

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

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>7</b>
2.1	Problemstellung und Zielsetzung .....	7
2.2	Einführung in die FTIR-Spektroskopie .....	7
2.3	Klassifizierung von FTIR-Spektren.....	10
2.3.1	Distanzwerte basierend auf dem Pearson's product moment correlation coefficient .....	10
2.3.2	Künstliche neuronale Netze .....	11
2.4	Klassische und molekularbiologische Referenzmethoden .....	12
2.4.1	Artidentifizierung .....	12
2.4.2	Stammtypisierung .....	12
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>13</b>
3.1	Aerobe Sporenbildner .....	13
3.1.1	Referenzstämme.....	13
3.1.2	Identifizierung auf Artebene .....	14
3.1.3	Differenzierung und Identifizierung auf Stammebene .....	14
3.1.3.1	Charakterisierung mittels API.....	15
3.1.3.2	Typisierung über RAPD .....	16
3.1.3.3	Typisierung und Identifizierung mittels FTIR-Spektroskopie .....	18
3.2	Milchsäurebakterien.....	23
3.2.1	Referenzstämme.....	23
3.2.2	Identifizierung auf Artebene .....	23
3.2.3	Differenzierung und Identifizierung auf Stammebene .....	26
3.2.3.1	Charakterisierung mittels API.....	26
3.2.3.2	Typisierung über RAPD .....	27
3.2.3.3	Typisierung und Identifizierung mittels FTIR-Spektroskopie .....	27
<b>4</b>	<b>Fazit.....</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>32</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	FTIR-Spektren von <i>Bacillus licheniformis</i> und <i>Bacillus subtilis</i> .	9
Abbildung 2:	Hitreport der OPUS-Datenbank für ein <i>Bacillus licheniformis</i> -Isolat.	10
Abbildung 3:	Hitreport der OPUS-Datenbank für ein <i>Enterococcus faecium</i> -Isolat.	11
Abbildung 4:	Schematische Darstellung eines hierarchisch strukturierten KNN.	11
Abbildung 5:	Ergebnisreport eines KNN für ein <i>Enterococcus faecium</i> -Isolat.	12
Abbildung 6:	Kulturmorphologische Ausprägung des Präparats Bioplus 2B auf Tryptose-Agar.	13
Abbildung 7:	Vergleich der API 50 CHB-Profile für <i>B. licheniformis</i> aus AICare und Bioplus 2B nach 48 h Inkubation.	15
Abbildung 8:	RAPD Fragmentmuster stellvertretender Isolate der Präparate Bioplus 2B, Calsporin und AICare.	17
Abbildung 9:	RAPD-Fragmentmuster stellvertretender Isolate der Präparate Bioplus 2B und GalliPro.	17
Abbildung 10:	Clusteranalyse der FTIR-Spektren für <i>B. licheniformis</i> aus AICare und Bioplus 2B.	18
Abbildung 11:	Clusteranalyse der FTIR-Spektren für <i>B. subtilis</i> aus Calsporin (rot und orange) und Bioplus 2B (blau).	19
Abbildung 12:	Clusteranalyse der FTIR-Spektren für <i>B. subtilis</i> aus Calsporin und Bioplus 2B.	20
Abbildung 13:	Hitliste für ein FTIR-Spektrum von <i>B. subtilis</i> aus Bioplus 2B.	21
Abbildung 14:	RAPD Fragmentmuster stellvertretender Isolate der Präparate Bioplus 2B, Calsporin und AICare sowie einiger bereits in der Datenbank enthaltener Stämme.	22
Abbildung 15:	Architektur des KNN zur Identifizierung von Milchsäurebakterien vor der Erweiterung.	24
Abbildung 16:	Architektur des KNN zur Identifizierung von Milchsäurebakterien nach der Erweiterung mit neuen Stämmen der Arten <i>E. faecium</i> und <i>P. acidilactici</i> .	25
Abbildung 17:	API 50 CHL Profile der probiotischen Milchsäurebakterien sowie der beiden offiziellen <i>L. rhamnosus</i> -Stämme DSM 20021 (T = Typstamm) und DSM 20177.	26
Abbildung 18:	RAPD Fragmentmuster stellvertretender Isolate der <i>E. faecium</i> -Stämme.	27
Abbildung 19:	Clusteranalyse der FTIR-Spektren für die fünf probiotischen <i>E. faecium</i> -Stämme.	28
Abbildung 20:	Vergleich der ersten Ableitungen von FTIR-Spektren vier probiotischer <i>E. faecium</i> -Isolate.	29
Abbildung 21:	Architektur des KNN zur Differenzierung von probiotischen und ubiquitären <i>E. faecium</i> -Stämmen.	30
Abbildung 22:	Clusteranalyse der FTIR-Spektren für den probiotischen <i>L. rhamnosus</i> -Stamm DSM 7133 sowie ubiquitäre Stämme und zwei weitere Stämme der DSM.	30

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über die zur Verfügung stehenden Referenzisolate aus Futtermitteln mit probiotischem Zusatz. ....	13
Tabelle 2:	Unterschiede der <i>B. subtilis</i> -Stämme aus Bioplus 2B, GalliPro und Calsporin in den API 50 CHB-Profilen. ....	15
Tabelle 3:	Übersicht über die Zahl der in den Futtermittelzusätzen enthaltenen Einzelstämme. ....	18
Tabelle 4:	Zuverlässigkeit der angepassten FTIR-Referenzdatenbank für die Identifizierung von Stämmen aus Bioplus 2B, Calsporin und GalliPro auf Art- und Stammebene sowie für die Typisierung nach koloniemorphologischem und RAPD-Typ in Prozent. ....	22
Tabelle 5:	Identifizierung der fünf probiotischen <i>E. faecium</i> -Stämme auf Artebene. ....	26
Tabelle 6:	Zahl der <i>E. faecium</i> -Isolate, die zum Training und zur Validierung des KNN zur Differenzierung ubiquitärer von probiotischen Stämmen eingesetzt wurden. ....	29

# 1 Zusammenfassung

Die Identifizierung probiotischer Futtermittelzusätze im Rahmen der mikrobiologischen Qualitätsbewertung von Futtermitteln ist von hoher Bedeutung für eine korrekte Interpretation der Ergebnisse, stellt jedoch hohe Anforderungen an die Analysemethoden hinsichtlich Zuverlässigkeit, Reproduzierbarkeit und Arbeitsaufwand. Fourier-transform Infrarot (FTIR)-Spektroskopie wurde in diesem Zusammenhang bereits erfolgreich für die Identifizierung probiotischer Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* und *Bacillus cereus* eingesetzt und sollte im vorliegenden Projekt für die Anwendung auf weitere *Bacillus*-Arten und Milchsäurebakterien adaptiert werden. Dabei sollte zunächst eine Differenzierung zwischen eingesetzten Probiotika und ubiquitär vorkommenden Vertretern der jeweiligen Arten etabliert und im Folgenden zwischen einzelnen probiotischen Stämmen der gleichen Art unterschieden werden. Als Referenzmethoden für die Artidentifizierung und Stammtypisierung dienten 16S rDNA-Sequenzierung und RAPD-PCR; der Einsatz des API-Systems wurde ebenfalls getestet.

Sowohl für die Bazillen als auch die Milchsäurebakterien bestanden an der Abteilung Mikrobiologie der Technischen Universität München bereits umfangreiche Referenzdatenbanken für die Artidentifizierung, die nun mit Futtermittelisolaten erweitert und für die Stammtypisierung angepasst wurden. Für die Erstellung der Datenbanken wurden zwei unterschiedliche Softwaresysteme verwendet, von denen eines in die Spektrometersoftware OPUS integriert war und ein weiteres eine separate Software für die Erstellung künstlicher neuronaler Netze darstellte.

Bei den Sporenbildnern wurden insgesamt die vier Futtermittelzusätze Bioplus 2B, Calsporin, AlCare und GalliPro verwendet, die entweder als Ein- oder Mehrstammkultur *Bacillus licheniformis* und/oder *Bacillus subtilis* enthielten. Die molekularbiologische Typisierung ergab, dass sich die einzelnen Stämme meist gut voneinander differenzieren ließen, nur die *B. subtilis*-Isolate aus Bioplus 2B und GalliPro zeigten identische Muster. Auch mit FTIR-Spektroskopie war eine Differenzierung gut möglich, jedoch zeigten auch hier die *B. subtilis*-Isolate aus Bioplus 2B und GalliPro keine Unterschiede und konnten somit durch keine der eingesetzten Methoden differenziert werden. Aus diesem Grund wurden sie bei der Bewertung der Zuverlässigkeit der FTIR-Spektroskopie für die Stammtypisierung als ein Stamm behandelt. Die adaptierte Datenbank lieferte hervorragende Ergebnisse sowohl für die Unterscheidung probiotischer und ubiquitärer Stämme als auch für die Differenzierung einzelner Probiotika und erzielte Identifizierungsergebnisse mit einer Zuverlässigkeit zwischen 91 und 100 %.

Bei den Milchsäurebakterien wurden die drei Arten *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus rhamnosus* und *Pediococcus acidilactici* untersucht. Weil für *P. acidilactici* nur das probiotische Isolat, jedoch keine Umweltisolate zur Verfügung standen, wurde lediglich das vorhandene Isolat in die Datenbank integriert. Von *L. rhamnosus* stand ein Stamm zur Verfügung, von *E. faecium* fünf unterschiedliche Stämme. Folglich wurde für *L. rhamnosus* die Differenzierung des probiotischen Stamms von Umweltisolaten etabliert, für *E. faecium* zusätzlich die Unterscheidung der einzelnen Probiotika. Wie schon bei den Sporenbildnern gab es hier zwei Isolate, die weder mit RAPD-PCR noch über ihre FTIR-Spektren differenziert werden konnten und somit in der Referenzdatenbank als identisch behandelt wurden. Die etablierten Datenbanksysteme für die Typisierung der Milchsäurebakterien wiesen eine sehr hohe Leistungsfähigkeit auf und konnten unbekannte Spektren mit einer Zuverlässigkeit von 98 bis 100 % dem korrekten Stamm zuordnen.

Somit steht mit der FTIR-Spektroskopie eine genaue und einfach anzuwendende Methode für die Analyse von Mikroorganismen in der Futtermittelmikrobiologie zur Verfügung, wobei die Technik sowohl für Artidentifizierungen als auch Stammtypisierungen genutzt werden kann. Die etablierten Datenbanken sind bereits auf viele Futtermittelzusätze angepasst und können bei Bedarf auch mit zusätzlichen Stämmen erweitert werden.

# 2 Einleitung

## 2.1 Problemstellung und Zielsetzung

Aerobe Sporenbildner werden bei der mikrobiologischen Untersuchung von Futtermitteln generell als verderbanzeigende Bakterien angesprochen und neben Staphylokokken und Mikrokokken in einer eigenen Keimgruppe erfasst. Milchsäurebakterien hingegen spielen quantitativ in trockenen Futtermitteln pflanzlichen oder tierischen Ursprungs zumeist keine Rolle. Sie werden wegen ihrer größtenteils negativen Reduktion von Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) und ihrer negativen Katalasereaktion nicht mit erfasst (VDLUFA Methodenbuch III). Ein erhöhtes Auftreten von Milchsäurebakterien ( $> 10^4$  KBE/g) in einem trockenen Futtermittel ist somit immer ein Hinweis auf einen probiotischen Zusatz, es sei denn, das Produkt hat eine feuchte Produktionsphase durchschritten, in der Milchsäurebakterien am Abbau leichtverdaulicher Kohlenhydrate beteiligt waren, wie z. B. Malzkeime (MIETKE-HOFMANN et al. 2008). In Flüssigfuttermitteln und Vergärungsprodukten stellen Milchsäurebakterien allerdings die dominierende Keimgruppe dar.

Problematisch sind demnach hohe Gehalte aerober Sporenbildner in Produkten, die laut Deklaration keinen probiotischen Zusatz enthalten, weil dies hier ein Indiz für schlechte mikrobiologische Qualität ist. Dennoch können auch solche Produkte über Verschleppungen im Mischfutterwerk, fälschlichen Zusatz oder eine unterlassene Deklaration probiotische Organismen enthalten, deren Identität jedoch nur über eine exakte Bestimmung der Spezies und des Stamms ermittelt werden kann. Über die Artidentifizierung wird bestimmt, ob es sich prinzipiell um ein Probiotikum handeln könnte, weil nur wenige Arten überhaupt als Futtermittelzusätze eingesetzt werden. Handelt es sich um eine andere Art, sind die detektierten Organismen als qualitätsmindernd einzustufen. Wird bei der Identifizierung jedoch eine Spezies ermittelt, die auch als Probiotikum Verwendung findet, muss geprüft werden, ob es sich um einen zugelassenen probiotischen Stamm oder ein Umweltisolat handelt.

Diese Differenzierung ist jedoch keineswegs trivial, weil hinreichend spezifische und dennoch robust zu bestimmende Merkmale meist nur molekularbiologisch ermittelt werden können, was in der Regel mit entsprechend hohem Aufwand verbunden ist. Wünschenswert wäre hingegen eine Technik, die sich einfach und mit überschaubarem Arbeits- und Kostenaufwand anwenden lässt und dennoch zuverlässige Ergebnisse liefert. Für die Differenzierung probiotischer Hefen der Spezies *Saccharomyces cerevisiae* und Bazillen der Art *Bacillus cereus* wurde in diesem Zusammenhang FTIR-Spektroskopie erfolgreich eingesetzt (SCHLEIF & MIETKE 2003; BÜCHL et al. 2010; MIETKE et al. 2010; BÜCHL et al. 2011) und sollte im Rahmen des vorliegenden Projektes für die Differenzierung weiterer probiotischer Futtermittelzusätze getestet werden. Das Forschungsprojekt war dabei in zwei Teilprojekte untergliedert. Gegenstand des ersten Teils waren aerobe Sporenbildner der Gattung *Bacillus*, des zweiten Teils Milchsäurebakterien der Gattungen *Enterococcus* und *Lactobacillus*. Ziel beider Projektteile war es zum einen, die Identifizierung der betreffenden Organismen auf Artebene mit FTIR-Spektroskopie sicherzustellen und zum anderen die Differenzierung ubiquitärer Stämme und probiotischer Organismen aus Futtermittelzusätzen ebenfalls auf Basis der FTIR-Spektroskopie zu entwickeln.

Zu klären war in diesem Zusammenhang zudem die Frage, ob eine Erweiterung der bereits vorhandenen FTIR-Referenzdatenbank zur Identifizierung aerober Sporenbildner mit Isolaten aus Futtermitteln ausreicht, um einen zuverlässigen Einsatz dieser Technik in der Futtermittelmikrobiologie zu sichern, oder ob eine Umstellung der Datenauswertung auf künstliche neuronale Netze (KNN) erforderlich ist. Weil für die Identifizierung von Milchsäurebakterien bereits ein KNN bestand, wurde dieses mit Isolaten aus Futtermitteln erweitert und um die Stammdifferenzierung ergänzt.

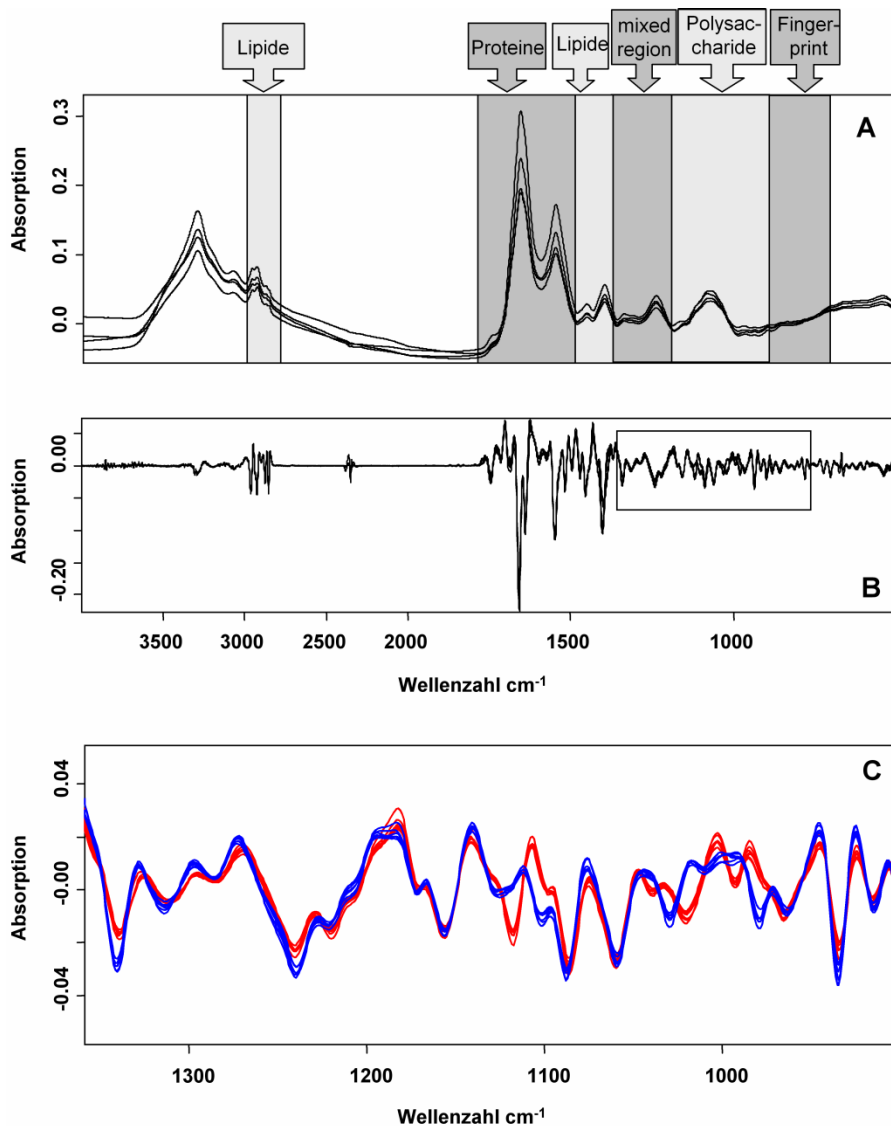
## 2.2 Einführung in die FTIR-Spektroskopie

Mikroorganismen unterscheiden sich nicht nur genetisch oder anhand unterschiedlicher Fähigkeiten zur Verwertung von Nährstoffen, sondern auch in ihrer ganzen Zellzusammensetzung. So können Art und Menge der Polysaccharide, Proteine oder Fettsäuren in den unterschiedlichen Bausteinen der Zellen variieren und weil jeder Zellbaustein infrarotes Licht spezifisch absorbiert, lässt sich mit Fourier-transform Infrarot (FTIR)-Spektroskopie die Zusammensetzung der Zellen als biochemischer Fingerabdruck erfassen. Die gemessenen Spektren sind dabei so charakteristisch, dass sie für Identifizierungszwecke genutzt

werden können. In Abbildung 1 [A] sind beispielhaft einige FTIR-Spektren von *Bacillus licheniformis* und *Bacillus subtilis* dargestellt. Sie zeigen markante Peaks, die in den meisten Fällen konkreten Stoffklassen zugeordnet werden können. Die einzelnen Peaks bestehen aus vielen sich überlagernden Absorptionen, die über die Berechnung der ersten oder zweiten Ableitung der Originalspektren aufgelöst werden (Abbildung 1 [B]). In der Vergrößerung zeigt sich, dass die Spektren unterschiedlicher Arten (hier *B. licheniformis* und *B. subtilis*) eindeutige Unterschiede aufweisen, anhand derer sie gut zu differenzieren sind (Abbildung 1 [C]). Weil die Zellen der Organismen für die Messung nicht zerstört, sondern in intaktem Zustand präpariert werden, umfasst die Probenpräparation nur einige wenige Schritte, die im wesentlichen die standardisierte Kultur der Organismen, deren Ernte vom Inkubationsmedium und die Antrocknung auf einem Probenträger beinhalten. Prinzipiell gibt es unterschiedliche Methoden der Probenpräparation (WENNING et al. 2008), wobei jedoch die Kultivierung der Organismen auf festen Medien aufgrund des geringeren Arbeitsaufwands zu bevorzugen ist.

Bei der Messung in Transmission durchströmt infrarotes Licht die getrockneten Zellen und alle in der Zelle vorhandenen Moleküle werden über ihre spezifische Absorption des IR-Lichts quantitativ erfasst. Das Resultat sind hochspezifische Fingerprints, die sich nicht nur für eine Artidentifizierung eignen, sondern auch auf Stammebene typisiert werden können. Allerdings geht die sehr hohe Spezifität mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber Änderungen am Präparationsprotokoll einher, weil Abweichungen in den Wachstumsbedingungen (z. B. Art des Mediums, Inkubationstemperatur oder -dauer) zu einer veränderten Zellzusammensetzung der Organismen führen, die sich in der Folge auch in veränderten Spektren niederschlägt und unter Umständen die Identifizierung beeinträchtigen kann. Kleinere Abweichungen beeinträchtigen die Identifizierung hingegen nicht (OUST et al. 2004a) und bei strikt standardisiertem Protokoll sind sehr zuverlässige Ergebnisse zu erzielen.





**Abbildung 1: FTIR-Spektren von *Bacillus licheniformis* und *Bacillus subtilis***  
**(A) Originalspektren, (B) zweite Ableitungen, (C) vergrößerter Ausschnitt der Ableitungen, blau: *B. licheniformis*, rot: *B. subtilis*.** Die schattierten Regionen der Spektren in (A) enthalten verwertbare Informationen. Die dominierenden biochemischen Komponenten der jeweiligen Region sind oberhalb der Spektren angegeben.

Seit die FTIR-Spektroskopie Anfang der 1990er-Jahre von Dieter Naumann und seinen Mitarbeitern am Robert Koch-Institut als Technik zur Identifizierung von Mikroorganismen eingeführt wurde (NAUMANN et al. 1991), ist sie auf die unterschiedlichsten Gruppen von Mikroorganismen und Fragestellungen angewandt worden. Viele Arbeiten beschäftigten sich mit der Identifizierung oder Differenzierung bestimmter Arten und Gattungen, wobei sowohl Hefen (KÜMMERLE et al. 1998; TIMMINS et al. 1998; TINTELNOT et al. 2000; WENNING et al. 2002; ESSENDoubi et al. 2005; BÜCHL et al. 2008) und Schimmel (FISCHER et al. 2006; NAUMANN 2009; SHAPAVAL et al. 2010) als auch eine Reihe von Bakterien wie Staphylokokken (AMIALI et al. 2007), gram-negative Bakterien (WINDER et al. 2004; MOUWEN et al. 2006; BOSCH et al. 2008; COUTINHO et al. 2009; KUHM et al. 2009), Milchsäurebakterien (GOODACRE et al. 1996; GUIBET et al. 2003; OUST et al. 2004b; WENNING et al. 2010), Clostridien (KIRKWOOD et al. 2006), coryneforme Bakterien (OBERREUTER et al. 2002; WENNING et al. 2006), Listerien (REBUFFO et al. 2006; OUST JANBU et al. 2008; REBUFFO-SCHEER et al. 2008), Mycobakterien (REBUFFO-SCHEER et al. 2007a) oder Bazillen (BEATTIE et al. 1998) im Fokus standen. Allen Arbeiten ist gemein, dass sie FTIR-Spektroskopie sehr erfolgreich und mit hoher Präzision auf die Identifizierung der jeweiligen Organismen anwenden konnten und das Potenzial der Technik für die Artidentifizierung eindrucksvoll belegen.

Neben der Artidentifizierung wurde FTIR-Spektroskopie auch bereits mehrfach zur Typisierung unterhalb des Speziesniveaus eingesetzt. So zeigte sich, dass die Technik ein hohes Potenzial für die Serotypisierung hatte (HELM et al. 1991b; KIM et al. 2005; REBUFFO-SCHEER et al. 2007b) und sich auch zur Unterscheidung von Genotypen sehr gut eignete (SELTMANN et al. 1994; SANDT et al. 2003; MOUWEN et al. 2006; MIETKE et.a. 2010; BÜCHL et al. 2010). In diesem Zusammenhang ist besonders die Arbeit von BÜCHL et al. (2010) hervorzuheben, die ein Identifizierungssystem für fünf unterschiedliche *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme, die als probiotische Futtermittelzusätze dienen, erstellten. Das Klassifizierungssystem war zunächst darauf ausgelegt, die fünf Futtermittelzusätze von ubiquitären Stämmen zu differenzieren und im Anschluss die fünf Probiotika untereinander zu unterscheiden. Zwei dieser fünf Stämme konnten auch mit genetischen Methoden nicht differenziert werden, weshalb sie im resultierenden System in einer Klasse zusammengefasst wurden; die übrigen Stämme ließen sich sowohl über molekularbiologische Referenzmethoden als auch FTIR-Spektroskopie gut unterscheiden. Die Validierung der FTIR-Datenbank ergab eine korrekte Zuordnungsrate von 98,2 % und demonstriert damit die sehr hohe Zuverlässigkeit der Methode.

## 2.3 Klassifizierung von FTIR-Spektren

Ein wesentlicher Schritt bei der Erstellung von Identifizierungssystemen mit FTIR-Spektroskopie ist die Art und Weise der Datenauswertung und Klassifizierung von Spektren, weil diese einen sehr hohen Informationsgehalt haben, der zunächst auf wesentliche Inhalte reduziert und dann so verarbeitet werden muss, dass eine zuverlässige Zuordnung unbekannter Spektren zu den Referenzdaten erfolgt. Hierzu stehen eine ganze Reihe von statistischen Verfahren und Methoden zur Verfügung (NAUMANN 2000; MARIEY et al. 2001; JARVIS AND GOODACRE 2005; PREISNER et al. 2007; WENNING et al. 2008), von denen die zwei in diesem Projekt verwendeten im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

### 2.3.1 Distanzwerte basierend auf dem Pearson's product moment correlation coefficient

Für die Zusammenstellung der Spektren zu Datenbanken und die Identifizierung unbekannter Spektren steht die zum Spektrometer gehörende Software OPUS (Bruker Optik) zur Verfügung. Sie identifiziert unbekannte Spektren anhand von Distanzwerten, die auf Basis des Pearson's product moment correlation coefficient berechnet werden (HELM et al. 1991a), und gibt das Ergebnis als Hitliste der ähnlichsten in der Referenzdatenbank enthaltenen Referenzspektren aus (Abbildung 2).

Hit No.	Hit Quality	Sample Name	File Name	Threshold
1	0.468846	Bacillus licheniformis G91/ml960430	BacLicG91.100	0.000000
2	0.707353	Bacillus licheniformis G2983/Mietke(DSM5749)	BacLicG2983.1	0.000000
3	0.738593	Bacillus licheniformis G-/mü971211	BacLicD14.100	0.000000
4	0.754216	Bacillus licheniformis G-/mü971205	BacLicD13.100	0.000000
5	0.792425	Bacillus licheniformis G1395/Weissmann(SCR6)	BacLicG1395.100	0.000000
6	0.847000	Bacillus licheniformis G681/mü990226	BacLicG681.100	0.000000
7	0.858711	Bacillus licheniformis G-/mü971205	BacLicD12.100	0.000000
8	0.934571	Bacillus licheniformis T W1528/DSM13	BacLicW1528T.100	0.000000
9	0.993776	Bacillus licheniformis G-/mü971215	BacLicD15.100	0.000000
10	1.050244	Bacillus licheniformis G1024/Busse(d9)	BacLicG1024.100	0.000000
11	1.158050	Bacillus pumilus ! G1224/fromG455	BacPumG1224!.100	0.000000
12	1.183992	Bacillus licheniformis I(?) G1937/sm010118	BacLicG1937.1	0.000000

Abbildung 2: Hitreport der OPUS-Datenbank für ein *Bacillus licheniformis*-Isolat

Die Beurteilung der Hitliste erfolgt im Wesentlichen anhand der Reihenfolge der Artnamen; als zweites Kriterium dienen die berechneten Distanzwerte, in der Hitliste als Hit Quality angegeben, die für eine akzeptable Identifizierung unter 1,5 liegen sollten. Das in Abbildung 2 dargestellte Beispiel zeigt die Identifizierung eines *Bacillus*-Isolats, das anhand der Hitliste eindeutig als *Bacillus licheniformis* identifiziert werden konnte. Weil für eine sichere Identifizierung nicht das komplette Spektrum, sondern nur Teilbereiche verwendet werden, muss zuvor eine Auswahl der spektralen Fenster mit der höchsten Diskriminierungstiefe getroffen werden. Bei der OPUS-Software wird dieser Schritt nicht von einem Algorithmus, sondern durch den Nutzer ausgeführt, wobei hier unterschiedliche Bereiche miteinander kombiniert werden und die optimale Fensterkombination schrittweise erarbeitet wird (HELM et al. 1991a).

Die OPUS-Datenbanken sind einfach zu handhaben und zu erweitern, weil sie keine Kalibrierung enthalten, die bei jeder Erweiterung aktualisiert werden müsste. Sie können somit auch von Nutzern bedient werden, die keine Erfahrung mit statistischer Datenauswertung haben und sind aufgrunddessen auch gut für den Einsatz in Industrielaboren geeignet. Allerdings

stoßen die OPUS-Datenbanken bei der Differenzierung eng verwandter Arten oder Stämme an die Grenzen ihrer Leistungsfähigkeit, weil die Berechnung eines einzigen Distanzwertes hier nicht diskriminativ genug ist. Verdeutlicht wird dies in Abbildung 3, die ein nicht eindeutig zu interpretierendes Identifizierungsergebnis für ein *Enterococcus*-Isolat darstellt. Es fällt auf, dass die Hitliste eine Mischung unterschiedlicher Arten zeigt, die noch dazu alle sehr ähnliche Hit Qualities haben. Zwar kann die Identifizierung auf die Gruppe hier ähnlicher Arten eingegrenzt werden, eine zuverlässige Identifizierung auf Speziesniveau ist aber nicht möglich.

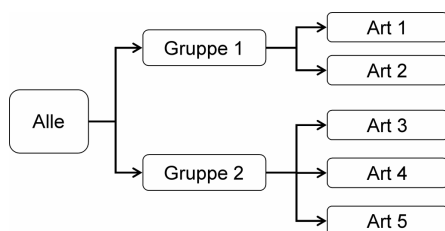
Hit No.	Hit Quality	Sample Name	File Name	Threshold
1	0.289714	Enterococcus faecium G 3005	EFaeciG3005.3	0.000000
2	0.326699	Enterococcus durans ! G 2731 (aus NaCl)	EDurG2731.6	0.000000
3	0.343393	Enterococcus faecium G 3005	EFaeciG3005.2	0.000000
4	0.370344	Enterococcus durans ! G 2731 (aus NaCl)	EDurG2731.4	0.000000
5	0.451509	Enterococcus durans W5 1879	EDurW1879.6	0.000000
6	0.565901	Enterococcus durans DSM 20633 T	EDurD20633T.4	0.000000
7	0.569447	Enterococcus faecium W5 2287	EFaeciW2287.3	0.000000
8	0.637730	Enterococcus raffinosus DSM 5633 T	ERaffD5633T.2	0.000000
9	0.640009	Enterococcus faecium G 2749	EFaeciG2749.5	0.000000
10	0.643550	Streptococcus parauberis ! G 831	SParG831.4	0.000000
11	0.645050	Enterococcus durans DSM 20633 T	EDurD20633T.3	0.000000
12	0.654651	Enterococcus hirae DSM 20160 T	EHirD20160T.2	0.000000

**Abbildung 3: Hitreport der OPUS-Datenbank für ein *Enterococcus faecium*-Isolat**

Um hier eine größere Differenzierungstiefe zu gewinnen, müssen Techniken eingesetzt werden, die nicht nur Unterschiede zwischen Spektren erfassen, sondern auch berücksichtigen, in welchen spektralen Bereichen sich diese befinden. Bei großen Datenbanken ist zudem oftmals auch die Erstellung eines Klassifizierungsbaumes hilfreich, bei dem die Identifizierung nicht in einem Schritt erfolgt, sondern in mehrere aufeinanderfolgende Schritte unterteilt wird.

### 2.3.2 Künstliche neuronale Netze

Für die Lösung besonders komplexer Klassifizierungsprobleme eignen sich vor allem künstliche neuronale Netze (KNN) (UDELHOVEN et al. 2000; MAQUELIN et al. 2003; REBUFFO et al. 2006; BÜCHL et al. 2008; WENNING et al. 2010), die zu den Systemen der künstlichen Intelligenz gehören und im Rahmen eines Trainingsprozesses (Kalibrierung) anhand eines Referenzdatensatzes die Zuordnung von Daten zu vorgegebenen Klassen (z. B. Gattungen oder Arten) erlernen können. Während des Trainings wird die Verarbeitung der Eingabedaten (Absorptionswerte) so optimiert, dass eine eindeutige und korrekte Klassenzuweisung erfolgt. Zur Lösung komplexer Probleme wie der Differenzierung einer großen Zahl an Klassen kann ein hierarchisch strukturierter Identifizierungsbaum erstellt werden, bei dem zunächst eine Differenzierung in größere Gruppen und in der nächsten Ebene eine feinere Aufschlüsselung jeder Gruppe erfolgt (siehe Abbildung 4). Für die Erarbeitung von KNN zur Identifizierung von FTIR-Spektren existiert eine spezialisierte Software (NeuroDeveloper<sup>®</sup>) der Firma Synthon in Heidelberg (UDELHOVEN et al. 2003), die alle notwendigen Schritte und Methoden abdeckt und auch im Rahmen dieses Projektes Verwendung fand.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung eines hierarchisch strukturierten KNN**

Integriert in die Software ist auch ein Modul, das verschiedene Aspekte der Datenvorverarbeitung umfasst. So können z. B. über Kovarianzanalyse die diskriminierendsten Wellenzahlen aus den Spektren extrahiert werden, womit sich das Identifizierungssystem sehr präzise und spezifisch, aber dennoch nutzerfreundlich auf das Klassifizierungsproblem zuschneiden lässt. Ein weiterer Vorteil dieser Art der Datenverarbeitung ist die Ausgabe des Ergebnisses, was nicht in Form einer Trefferliste geschieht, sondern als die Klasse, zu der das unbekannte Spektrum aufgrund der Kalibrierung zugeordnet wird (Abbildung 5).

Hier muss keine Interpretation des Ergebnisses erfolgen, weil dieser Aspekt über die Datenverarbeitung abgedeckt ist. Ein Nachteil der Methode ist hingegen, dass die Kalibrierung und Entwicklung der hierarchischen Architektur ein arbeitsaufwändiger Prozess ist, der bei jeder Erweiterung des Systems erneut durchlaufen werden muss.

Names	Class	Classification
EntFaeci_S1_G5912.2	1.1.2.1.1	Enterococcus faecium

Abbildung 5: Ergebnisreport eines KNN für ein *Enterococcus faecium*-Isolat

## 2.4 Klassische und molekularbiologische Referenzmethoden

Unabdingbar für den Aufbau einer FTIR-Referenzdatenbank ist die eindeutige Identifizierung der als Referenzen verwendeten Stämme, denn nur wenn hier korrekte Daten verwendet werden, kann eine Kalibrierung erfolgreich sein. Zu diesem Zweck stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung, die auf der Erfassung phänotypischer oder genetischer Merkmale beruhen.

### 2.4.1 Artidentifizierung

Basis für die Artidentifizierung im vorliegenden Projekt war die partielle Sequenzierung des 16S rRNA Gens, eines Teils der ribosomalen DNA, die nach wie vor der Goldstandard der Speziesidentifizierung ist. Sequenzdaten sind besonders zuverlässig, weil sie sich im Laufe der Zeit nur marginal ändern und sich deshalb Verwandtschaftsverhältnisse einzelner Arten an ihnen genau ablesen lassen. Zudem sind sie vollkommen unabhängig von der Art und Weise der Probenpräparation und lassen sich mit einer vernachlässigbar kleinen Fehlerrate exakt bestimmen. Dies ermöglicht auch einen Vergleich von Daten aus unterschiedlichen Laboren und hat zur Entstehung einer sehr umfassenden Datenbank im Internet geführt, anhand derer unbekannte Sequenzen identifiziert werden können. Ein Nachteil der Methode ist allerdings, dass für die Bestimmung der DNA-Sequenzen ein molekularbiologisches Labor zur Verfügung stehen und das Personal entsprechend geschult sein muss, weshalb die Technik in vielen Laboren nicht etabliert ist.

Eine einfach anzuwendende und weit verbreitete Alternative zur Identifizierung von Mikroorganismen sind kommerziell verfügbare Kits wie das API-System von bioMérieux. Hier wird die Verwertung einer ganzen Reihe an Nährstoffen, meist Zuckern, getestet und anhand der erhaltenen Profile eine Zuordnung zu Spezies vorgenommen. Weil alle notwendigen Reagenzien vom Hersteller bezogen werden, kann die Technik zwar in jedem Labor angewendet werden, die Ergebnisse sind jedoch mit Unsicherheiten und Fehlern behaftet (SAMPIMON et al. 2009; RIESER et al. submitted) und damit nur sehr eingeschränkt zuverlässig. Maßgeblich hierfür ist die Tatsache, dass nur einzelne Merkmale bestimmt werden und Enzyme für die Verwertung bestimmter Zucker je nach Anpassung eines Organismus an ein bestimmtes Habitat verloren gehen oder hinzugewonnen werden können. Das so veränderte Profil der Zuckerverwertung ist dann unter Umständen nicht mehr arttypisch und führt zu falschen Identifizierungen.

### 2.4.2 Stammtypisierung

Auch bei der Stammtypisierung sind molekularbiologische Methoden das Maß der Dinge; im vorliegenden Projekt wurde die RAPD-PCR angewandt. Hier werden mit Hilfe von kurzen Primern, die an vielen Stellen im Genom binden können, DNA-Fragmentmuster erzeugt, die aufgrund der zufallsbedingten Verteilung der Zielsequenzen stammtypisch sind. Die Technik ist bei Vorhandensein eines molekularbiologischen Labors verhältnismäßig einfach durchzuführen und wurde bereits erfolgreich auf die Typisierung von Bazillen und Milchsäurebakterien angewandt (RONIMUS et al. 1997; JURKOVIC et al. 2007; MAHENTHIRALINGAM et al. 2009). Allerdings sind RAPD-Ergebnisse nicht von einem Labor auf das andere übertragbar, weil die Fragmentmuster sehr sensitiv auf Änderungen in der Durchführung reagieren, weshalb die Methode als laborübergreifende Referenzmethode nicht geeignet ist.

Als zweite Methode zur Stammtypisierung wurde die phänotypische Charakterisierung über API verwendet. Obwohl das System eigentlich für die Artidentifizierung entwickelt wurde, können die ermittelten Enzymcharakteristika unter Umständen auch für eine Typisierung genutzt werden. Jedoch muss bedacht werden, dass mit dem API 50 CH-System nur 50 Merkmale erfasst werden und die Diskriminierungstiefe aufgrund dessen gering ist. Weil im vorliegenden Projekt jedoch nur wenige Stämme zu differenzieren waren, wurde die Technik hier dennoch in Erwägung gezogen.

# 3 Ergebnisse und Diskussion

## 3.1 Aerobe Sporenbildner

### 3.1.1 Referenzstämme

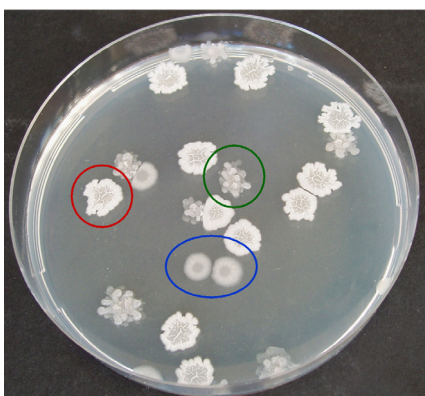
Untersuchungsgegenstand des vorliegenden Projekts waren die probiotischen *Bacillus*-Stämme aus den vier unterschiedlichen Futtermittelzusätzen Bioplus 2B, Calsporin, AlCare und GalliPro. Eine Aufstellung der enthaltenen Spezies und der zur Verfügung stehenden Isolate ist in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1: Übersicht über die zur Verfügung stehenden Referenzisolate aus Futtermitteln mit probiotischem Zusatz**

Futtermittelzusatz	Enthaltene Spezies	Zahl der Referenzstämme
Bioplus 2B	<i>B. licheniformis</i>	25
	<i>B. subtilis</i>	45
Calsporin	<i>B. subtilis</i>	58
AlCare	<i>B. licheniformis</i>	1
GalliPro	<i>B. subtilis</i>	44

Auffällig war, dass die *B. subtilis*-Isolate sowohl für Bioplus 2B als auch für Calsporin und GalliPro jeweils in zwei Morphotypen zu unterteilen waren, weil sie unterschiedliche Koloniemorphologien ausbildeten. Abbildung 6 zeigt die Anzucht einer Verdünnung des Präparats Bioplus 2B auf PC-Agar. Drei unterschiedliche Kolonieformen können hier unterschieden werden, wovon eine *B. licheniformis* zugeordnet werden kann, die beiden anderen *B. subtilis*.

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei den *B. subtilis*-Isolaten aus Calsporin und GalliPro. Zur Differenzierung dieser unterschiedlichen Morphologien wurden diese Isolate mit T für typisch und A für atypisch gekennzeichnet. Für Bioplus 2B waren 29 Isolate der typischen und 16 der atypischen Form zugeordnet, für Calsporin 22 der typischen und 10 der atypischen und bei GalliPro jeweils 22 der typischen und atypischen Form. Bei 26 Isolaten von Calsporin wurde eine andere Einteilung nach koloniemorphologischem Erscheinungsbild vorgenommen. Hier wurden die drei Morphologien glatt (typisch, 11 Isolate), runzlig (atypisch, 10 Isolate) und flach/trocken (vier Isolate) unterschieden.



**Abbildung 6: Kulturmorphologische Ausprägung des Präparats Bioplus 2B auf Tryptose-Agar  
Grün: *B. licheniformis*, Blau: *B. subtilis* typische Form, Rot: *B. subtilis* atypische Form.**



### 3.1.2 Identifizierung auf Artebene

In der Abteilung Mikrobiologie des ZIEL Weihenstephan der Technischen Universität München existierte bereits eine Referenzdatenbank für die Identifizierung aerober Sporenbildner, die insgesamt 402 Stämme aus 63 unterschiedlichen Arten umfasste.

Die bestehende FTIR-Referenzdatenbank zur Identifizierung aerober Sporenbildner sollte zunächst auf ihre Leistungsfähigkeit bei der Identifizierung probiotischer Stämme getestet und dann weiter auf diese Aufgabenstellung angepasst werden. Hierfür wurde nur ein Teil der zur Verfügung stehenden Isolate genutzt; die übrigen Isolate sollten zum Test der adaptierten Datenbank verwendet werden. Für eine erste Identifizierung wurden 17 *B. licheniformis*- und 29 *B. subtilis*-Isolate aus Bioplus 2B, das einzige vorhandene *B. licheniformis*-Isolat aus AICare und 32 Isolate von *B. subtilis* aus Calsporin genutzt. Für alle Organismen wurden sieben unabhängige FTIR-Spektren aufgenommen und mit der bestehenden Datenbank identifiziert. Allein für das Präparat GalliPro, das als letzter Futtermittelzusatz erst nach Abschluss der Datenbankanpassung mit allen übrigen probiotischen Stämmen bearbeitet wurde, wurden alle vorhandenen 44 Isolate analysiert. Hier wurden für jedes Isolat sechs Spektren aufgenommen.

Alle *B. licheniformis*-Isolate wurden mit FTIR-Spektroskopie als *B. licheniformis* identifiziert; die Datenbank lieferte hier also auch ohne eine Anpassung an Isolate aus Futtermitteln sehr gute Ergebnisse. Die *B. subtilis*-Isolate des Bioplus 2B-Produktes hingegen wurden zunächst ebenfalls als *B. licheniformis* identifiziert und das, obwohl 50 *B. subtilis*-Stämme als Referenzen in der Datenbank hinterlegt waren. Da jedoch nicht alle Referenzstämme der Datenbank über molekularbiologische Techniken identifiziert worden waren, bestand die Möglichkeit, dass einige Referenzspektren falsch benannt waren. Die Identität eines Teils der in der Datenbank enthaltenen Stämme wurde mit 16S rDNA-Sequenzierung überprüft und es stellte sich heraus, dass die Spektren von sieben Stämmen, die als *B. licheniformis* in der Datenbank hinterlegt waren, tatsächlich *B. subtilis* zuzuordnen sind. Nach der Korrektur der Benennung dieser Spektren wurden auch alle Isolate von *B. subtilis* aus Bioplus 2B korrekt identifiziert.

Bei den Isolaten aus dem Produkt Calsporin ergab sich bei der Identifizierung der FTIR-Spektren ein ambivalentes Bild. Der Großteil der Organismen wurde korrekt als *B. subtilis* identifiziert, einige Isolate jedoch nicht. Für ihre Spektren ergab sich keine eindeutige Identifizierung, sondern eine Mischung unterschiedlicher Arten wie *B. licheniformis*, *B. pumilus* und *B. atrophaeus*, die alle relativ eng verwandt sind. Zudem wiesen diese Isolate eine sehr große Distanz zu den in der Datenbank vorhandenen Spektren auf. Hier war also eine Anpassung der Datenbank mit Spektren von Isolaten aus Calsporin unbedingt erforderlich, um eine korrekte Identifizierung zu gewährleisten. Insgesamt waren allerdings für die Sicherstellung einer zuverlässigen Artidentifizierung probiotischer *Bacillus*-Stämme aus Futtermitteln nur kleine Adaptionen der Datenbank nötig, weil der überwiegende Teil der Stämme bereits mit der bestehenden Datenbank sicher identifiziert wurde. Um dennoch das Spektrum der Referenzdaten für *B. licheniformis* und *B. subtilis* zu erweitern, wurden zusätzlich neun Referenzstämme der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) für *B. licheniformis* und acht für *B. subtilis* in die Datenbank integriert. Nach Abschluss der Datenbankeerweiterung wurde der letzte der vier bearbeiteten Futtermittelzusätze, GalliPro, untersucht. Hier ergab die Identifizierung der FTIR-Spektren eine eindeutige Identifizierung als *B. subtilis* mit hohen Ähnlichkeiten zu den Isolaten des Präparats Bioplus 2B.

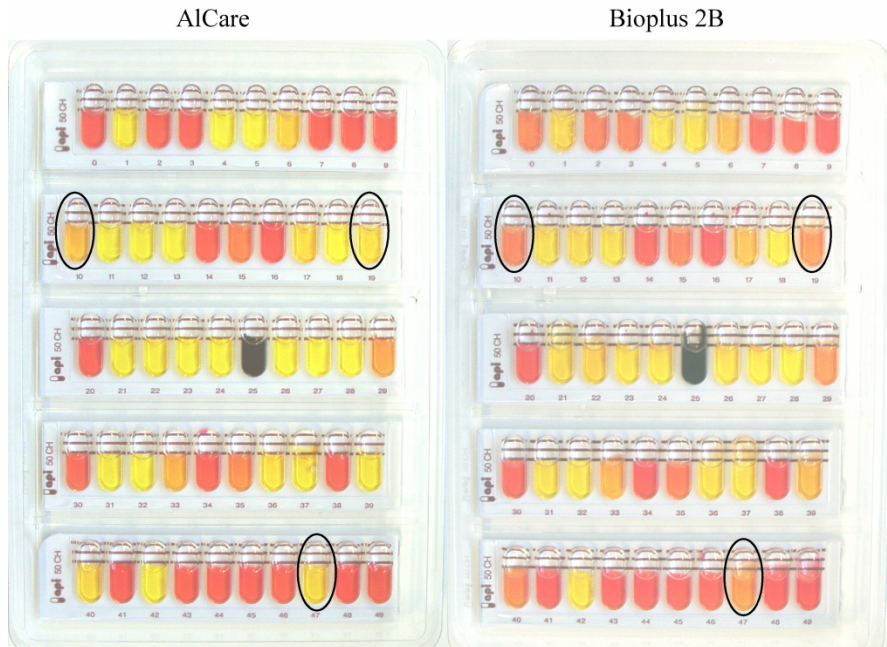
Nach der Identifizierung mit FTIR-Spektroskopie wurden aus den zur Verfügung stehenden Isolaten repräsentativ 18 Stück für weiterführende Analysen ausgewählt. Darunter waren zwei Isolate von *B. licheniformis* sowie jeweils zwei Isolate der typischen und atypischen *B. subtilis*-Form aus dem Bioplus 2B-Produkt, der *B. licheniformis* aus dem Produkt AICare, drei Isolate der typischen und zwei der atypischen *B. subtilis*-Form aus dem Calsporin-Produkt, und jeweils drei Isolate der typischen und atypischen *B. subtilis*-Form aus GalliPro. Die Identifizierung aller Isolate als *B. licheniformis* bzw. *B. subtilis* konnte sowohl über die Anwendung des API-Systems von bioMérieux als auch über 16S rDNA-Sequenzierung bestätigt werden.

### 3.1.3 Differenzierung und Identifizierung auf Stammebene

Neben der Artidentifizierung von Sporenbildnern aus Futtermitteln sollte eine Abgrenzung unterschiedlicher probiotischer Stämme von Wildstämmen erarbeitet werden und weiterführend eine Differenzierung probiotischer Isolate auf Stammebene. Zudem war die Frage zu klären, ob *B. subtilis*-Isolate unterschiedlicher Koloniemorphologie in unterschiedliche Stämme zu differenzieren sind.

### 3.1.3.1 Charakterisierung mittels API

Zunächst wurde eine phänotypische Charakterisierung der probiotischen Isolate mit dem System API 50 CHB von bioMérieux vorgenommen. Die *B. licheniformis*-Stämme aus den Präparaten AICare und Bioplus 2B zeigten Unterschiede in der Verwertung der drei Substrate Galactose, Sorbitol und Gluconat, wobei jeweils der Stamm aus AICare eine positive und die Stämme aus Bioplus eine negative Reaktion zeigten (Abbildung 7). Jedoch unterlagen die Ergebnisse mit dieser Methode einigen Schwankungen; so waren beispielsweise die Reaktionen für Galactose bei den Stämmen aus Bioplus nicht immer einheitlich negativ, weil in einigen Tests hier doch eine Verwertung stattfand.



**Abbildung 7: Vergleich der API 50 CHB-Profile für *B. licheniformis* aus AICare und Bioplus 2B nach 48 h Inkubation**  
Die divergierenden Reaktionen sind schwarz umrandet.

Die *B. subtilis*-Isolate aus Bioplus 2B und GalliPro zeigten im API identische Verwertungsprofile und können somit über diese Methode nicht differenziert werden. Gegenüber dem Stamm aus Calsporin ergaben sich jedoch bei drei Reaktionen unterschiedliche Ergebnisse, die in Tabelle 2 zusammengestellt sind. Die Unterschiede waren auch hier nicht immer eindeutig und unterlagen vor allem im Fall von Turanose Schwankungen. Zu beachten ist, dass bei Verwendung des API-Systems die Streifen sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden Inkubation auszuwerten sind, weil einige Substrate erst nach 48 Stunden eine positive Reaktion zeigen, andere hingegen nach eindeutigem Indikatorumschlag nach 24 Stunden einen Tag später bereits wieder realkalisiert sind.

**Tabelle 2: Unterschiede der *B. subtilis*-Stämme aus Bioplus 2B, GalliPro und Calsporin in den API 50 CHB-Profilen**

Substrat	Bioplus 2B/GalliPro	Calsporin
Sorbitol	-	+
Inulin	+	-
Turanose	+	(-)*

\* Dieses Merkmal war nicht bei allen getesteten Isolaten stabil, sondern teilweise ergaben sich auch positive Reaktionen.

Zwischen den unterschiedlichen morphologischen Typen der *B. subtilis*-Stämme ergaben sich hingegen im API-Test keinerlei reproduzierbare Abweichungen, was darauf schließen lässt, dass die Unterschiede in der Kolonieform nicht mit einer abweichenden Verwertung gängiger Zucker einhergehen und die Morphotypen sich physiologisch sehr ähnlich sind. Allerdings wurde für eines der beiden getesteten Isolate mit atypischer Morphologie aus Calsporin ein abweichendes Profil ermittelt.

Dieses Isolat zeigte keine Verwertung von Inositol und Melibiose, wohingegen die übrigen vier untersuchten *B. subtilis*-Isolate dieses Präparats hier eine positive Reaktion zeigen. Zwei weitere Isolate aus Calsporin, die zu einem anderen Zeitpunkt aus diesem Futtermittelzusatz isoliert wurden, zeigten ebenfalls ein abweichendes Profil, allerdings lagen hier die Unterschiede bei den Reaktionen Galactose und Turanose. Ob es sich hierbei um Artefakte oder systematische Unterschiede handelt, sollte über den Einsatz molekularbiologischer Typisierungstechniken geklärt werden. In diesem Teil der Arbeit galt es ebenfalls zu ermitteln, ob es sich bei den identischen API-Profilen der Isolate von Bioplus 2B und GalliPro um einen Zufall handelt oder ob diese Stämme tatsächlich identisch sind.

Über den Einsatz des API 50 CHB-Systems von bioMérieux ist eine eindeutige Differenzierung der probiotischen Stämme aus unterschiedlichen Produkten zumindest zum Teil möglich. Beeinträchtigt wird diese Art der Typisierung allerdings von der nicht immer eindeutigen Indikatorreaktion der API-Streifen, deren Umschlag von Rot nach Gelb bei positiver Reaktion nicht selten bei Orange endet und eine klare Interpretation der Ergebnisse erschwert. Auch ist das Ergebnis für das gleiche Substrat bei mehrmals durchgeführten Tests nicht immer identisch, weil die Verwertung stoffwechselphysiologischer Schwankungen unterliegt. Der Einsatz des API-Systems ist daher für eine zuverlässige Zuordnung von unbekanntem Isolat zu einem bestimmten Futtermittelzusatz nicht geeignet.

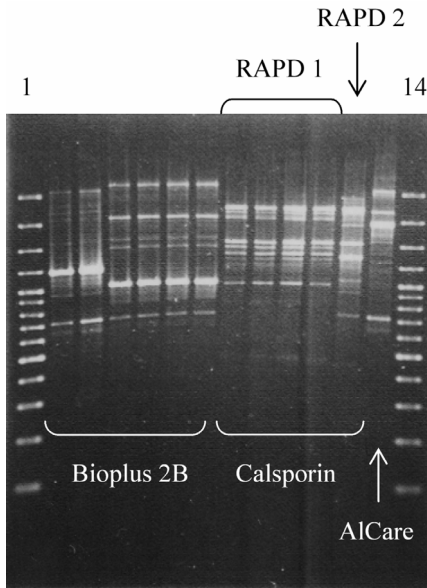
### 3.1.3.2 Typisierung über RAPD

Für eine eindeutige Differenzierung auf Stammebene wird häufig auf molekularbiologische Methoden zurückgegriffen, weil Merkmale auf der genomischen DNA stabil sind und nicht durch kultivierungsbedingte Schwankungen z. B. des Stoffwechsels beeinflusst werden. Für die Bearbeitung des vorliegenden Problems wurde die Methode der randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) verwendet. Sie beruht auf der Analyse von DNA-Fragmentmustern, die über eine Vervielfältigung von DNA mit unspezifischen Primern erhalten werden, deren Sequenz mehrfach im Genom vorkommt und deren Verteilung über das Genom stammtypisch ist.

Weil diese Methode sehr sensitiv ist und deshalb Schwierigkeiten bei der Wiederholbarkeit auftreten können, wurde sie über die vorherige Extraktion der genomischen DNA mittels eines kommerziellen Kits und den Einsatz einer definierten DNA-Menge in der PCR standardisiert. Dieses Vorgehen erzielte eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und eine 100%-ige Vergleichbarkeit von Mustern auch aus unterschiedlichen DNA-Extraktionen.

Abbildung 8 zeigt die Muster der zwölf Isolate aus Bioplus 2B, Calsporin und AICare, mit denen weiterführende Analysen durchgeführt wurden. Es sind fünf deutlich unterschiedliche Fragmentmuster zu erkennen, wobei mit einer Ausnahme jeweils Isolate der gleichen Art aus dem gleichen Präparat auch das gleiche Profil zeigen. So unterscheiden sich die *B. licheniformis*-Isolate aus Bioplus 2B deutlich vom Isolat aus AICare und die *B. subtilis*-Isolate aus Bioplus 2B von denen aus Calsporin. Unterschiede bei *B. subtilis* nach Zugehörigkeit zu einem bestimmten Morphotyp sind allerdings nicht zu erkennen, weil für beide Präparate jeweils Isolate des Morphotyps A und T identische Muster zeigen. In Kombination mit den Daten aus der API-Analyse ist daraus zu schlussfolgern, dass die Ausprägung der Koloniemorphologie – zumindest nach den Ergebnissen dieser beiden Methoden – nicht auf das Vorhandensein unterschiedlicher Stämme zurückzuführen ist, sondern andere Gründe haben muss.

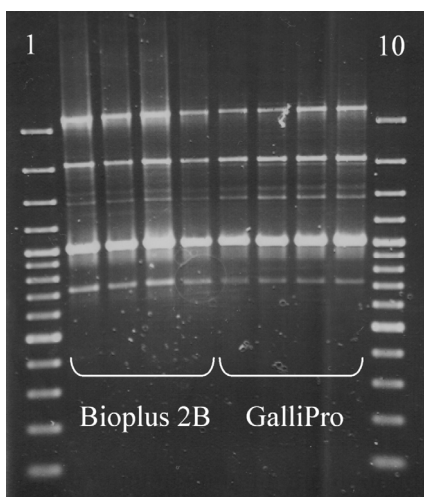




**Abbildung 8: RAPD Fragmentmuster stellvertretender Isolate der Präparate Bioplus 2B, Calsporin und AICare**  
 Bahn 1 und 14: DNA-Marker, Bahn 2 und 3: *B. licheniformis* (Bioplus), Bahn 4 und 5: *B. subtilis* (atypisch, Bioplus),  
 Bahn 6 und 7: *B. subtilis* (typisch, Bioplus), Bahn 8-10: *B. subtilis* (typisch, Calsporin), Bahn 11 und 12: *B. subtilis*  
 (atypisch, Calsporin), Bahn 13: *B. licheniformis* (AICare)

Eine Ausnahme stellt jedoch ein Isolat aus Calsporin dar (Bahn 12 in Abbildung 8, das ein klar von den vier anderen Isolaten dieses Präparats abweichendes Muster aufweist und somit einen zweiten RAPD-Typ darstellt. Auch dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Charakterisierung über API, die für dieses Isolat ebenfalls Abweichungen ergab. Die Analyse weiterer Isolate aus Calsporin ergab, dass noch drei andere Isolate diesen RAPD-Typ aufweisen, wobei zwei davon bereits über API charakterisiert wurden und auch hier abweichende Profile zeigten. Weil diese Isolate zu einem späteren Zeitpunkt aus einer neuen Probe des Präparats gewonnen wurden, kann es sich bei den Ergebnissen der RAPD- und API-Analysen also nicht um zufällige Resultate z.B. durch eine Kontamination bei der Isolation der Organismen handeln. Vielmehr müssen beide RAPD-Typen originär aus dem Futtermittelzusatz stammen.

Der Vergleich der Muster der *B. subtilis*-Stämme aus den Präparaten Bioplus 2B und GalliPro, die deckungsgleiche API-Profile aufwiesen, ist in Abbildung 9 dargestellt. Alle Isolate zeigen exakt identische Muster und sind somit auch über die RAPD-Analyse nicht unterscheidbar.



**Abbildung 9: RAPD-Fragmentmuster stellvertretender Isolate der Präparate Bioplus 2B und GalliPro**  
 Bahn 1 und 10: DNA-Marker, Bahn 2 bis 5: *B. subtilis* Bioplus 2B, Bahn 6 bis 9: *B. subtilis* GalliPro

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass RAPD-PCR als Referenzmethode zur Typisierung von *Bacillus*-Isolaten gut geeignet ist und reproduzierbare Ergebnisse liefert, eine Differenzierung der unterschiedlichen Morphotypen bei *B. subtilis* jedoch nicht möglich ist. Eine Übersicht über die für jeden Futtermittelzusatz differenzierten Stämme gibt Tabelle 3.

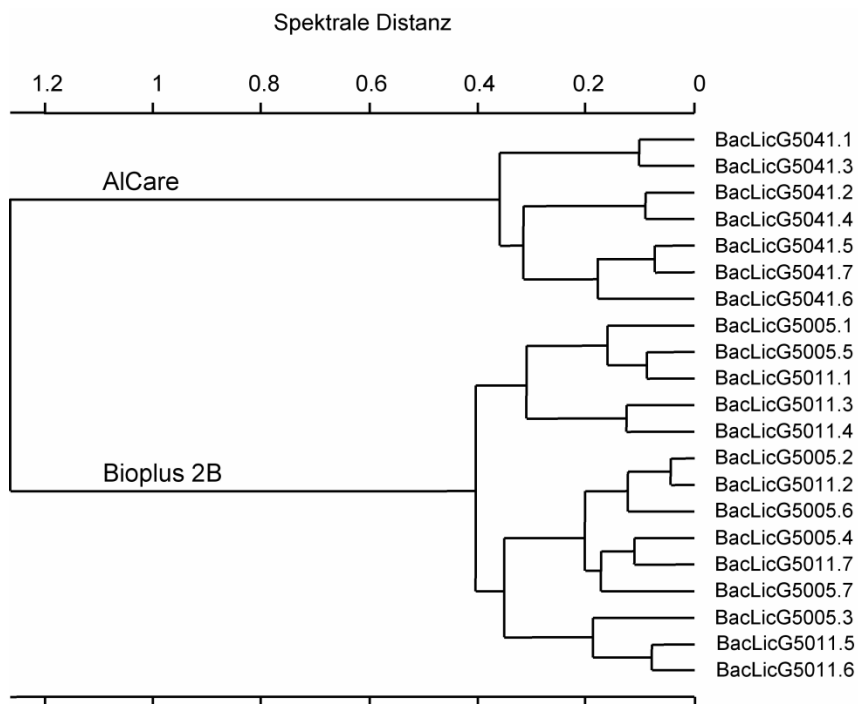
**Tabelle 3: Übersicht über die Zahl der in den Futtermittelzusätzen enthaltenen Einzelstämme**

Futtermittelzusatz	Enthaltene Spezies	Zahl der Einzelstämme (RAPD-Muster)
Bioplus 2B	<i>B. licheniformis</i>	1
	<i>B. subtilis</i>	1*
Calsporin	<i>B. subtilis</i>	2
AlCare	<i>B. licheniformis</i>	1
GalliPro	<i>B. subtilis</i>	1*

\* Diese beiden Muster sind identisch.

### 3.1.3.3 Typisierung und Identifizierung mittels FTIR-Spektroskopie

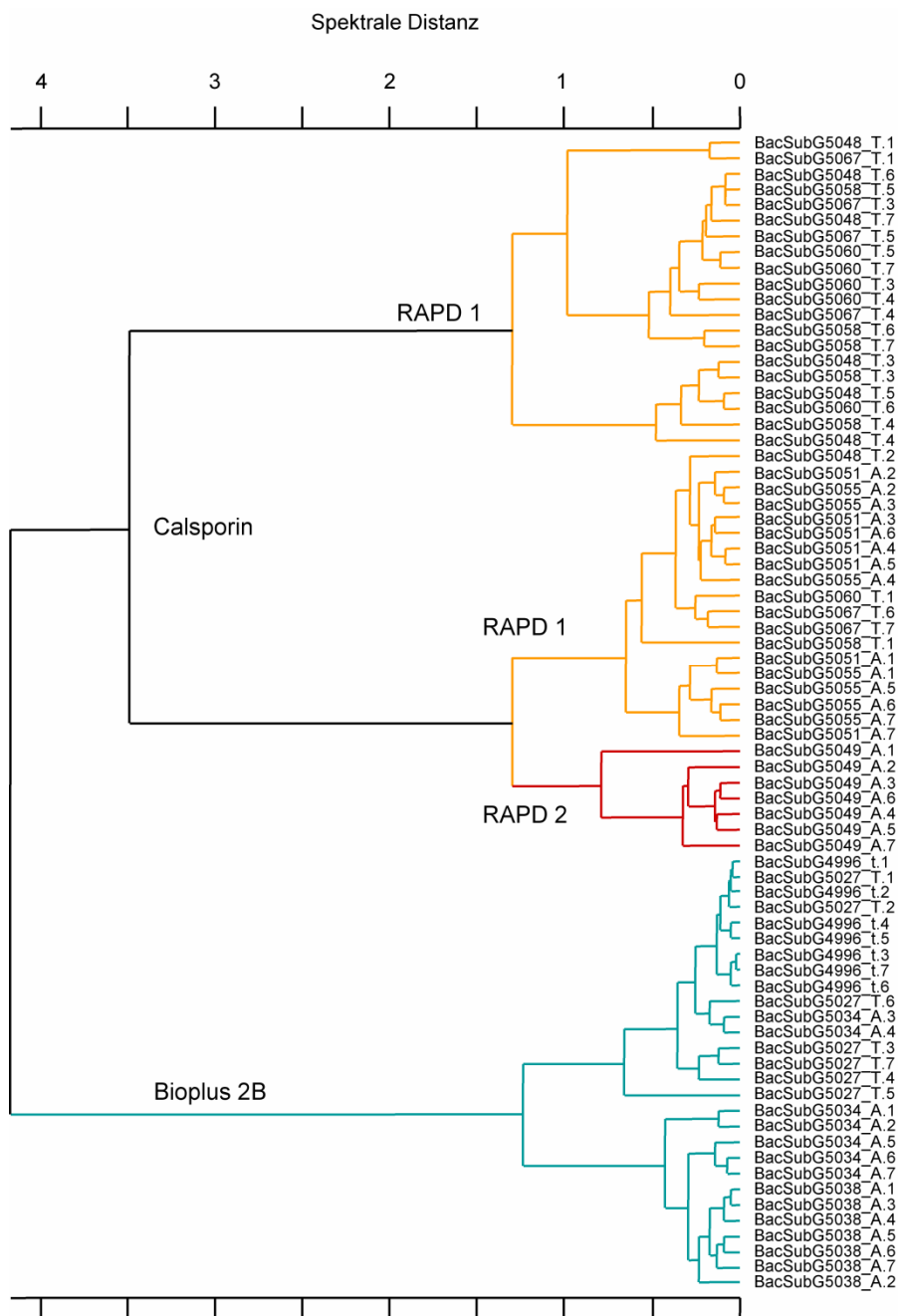
Sowohl für *B. licheniformis* als auch *B. subtilis* waren zwei unterschiedliche Stämme aus zwei unterschiedlichen probiotischen Präparaten Gegenstand der Untersuchung, die sowohl über API als auch RAPD-Analysen klar differenziert werden konnten. Zudem waren *B. subtilis*-Isolate aus zwei Futtermittelzusätzen zu prüfen, die sowohl über das API-System als auch die RAPD-PCR nicht differenziert werden konnten und bei denen die Vermutung nahe liegt, dass sie identisch sind. Die zwei unterschiedlichen morphologischen Varianten bei allen *B. subtilis*-Stämmen konnten mit keiner der genannten Methoden differenziert werden; jedoch zeigten sich für einen geringen Teil der Isolate aus dem Präparat Calsporin reproduzierbare Unterschiede, die belegen, dass es sich bei diesem Produkt um eine Mischung aus zwei Stämmen handeln muss.



**Abbildung 10: Clusteranalyse der FTIR-Spektren für *B. licheniformis* aus AlCare und Bioplus 2B**

Für die Berechnung wurde die 1. Ableitung der Spektren in den Bereichen  $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ ,  $1800-1500\text{ cm}^{-1}$ ,  $1500-1200\text{ cm}^{-1}$ ,  $1200-900\text{ cm}^{-1}$  und  $900-700\text{ cm}^{-1}$  herangezogen.

Eine Unterscheidung der Stämme von *B. licheniformis* und *B. subtilis* der Präparate Bioplus 2B, AICare und Calsporin ist auch über FTIR-Spektroskopie gut möglich. Abbildung 10 zeigt Spektren des Isolats aus AICare (G5041) und zwei beispielhafter Isolate aus Bioplus 2B (G5005 und G5011). Alle drei Stämme zeigen eine gute Reproduzierbarkeit bei den Wiederholungsmessungen und sind deutlich in zwei Cluster getrennt.

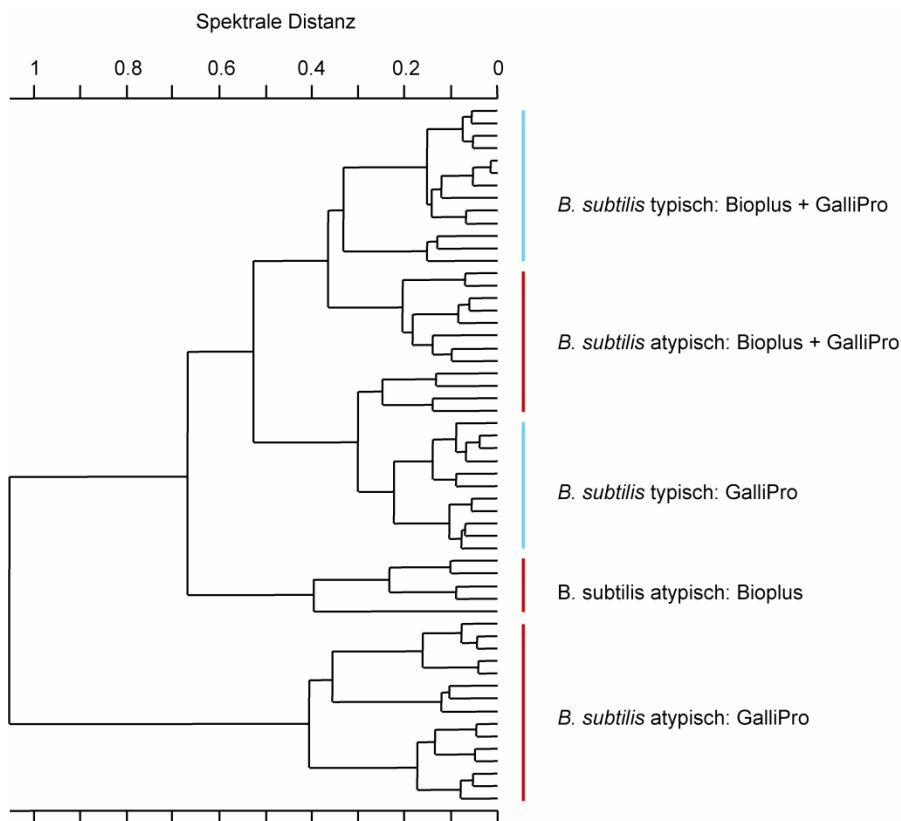


**Abbildung 11: Clusteranalyse der FTIR-Spektren für *B. subtilis* aus Calsporin (rot und orange) und Bioplus 2B (blau)**  
**Für die Berechnung wurde die 1. Ableitung der Spektren in den Bereichen 3000-2800 cm<sup>-1</sup>, 1800-1500 cm<sup>-1</sup>, 1500-1200 cm<sup>-1</sup>, 1200-900 cm<sup>-1</sup> und 900-700 cm<sup>-1</sup> herangezogen.**

In Abbildung 11 ist eine Clusteranalyse für die *B. subtilis*-Stämme aus Bioplus 2B und Calsporin dargestellt. Für Bioplus wurden jeweils zwei und für Calsporin einmal drei und einmal vier Isolate mit typischer und atypischer Morphologie verwendet (bezeichnet mit A oder T). Die Spektren der Stämme beider Präparate sind eindeutig voneinander separiert und bestätigen damit die Ergebnisse aus den API- und RAPD-Analysen. Auch eine Auftrennung der Spektren von Bioplus 2B nach Morphotyp ist zu erkennen, auch wenn diese nicht vollständig ist, weil einige Spektren eines atypischen Isolats im Cluster der typischen liegen. Hier liegt ein deutlicher Widerspruch zu den Ergebnissen aus API und RAPD, bei denen keinerlei diskriminierende

Merkmale detektiert werden konnten. Ein ähnliches Bild ergibt sich für Calsporin, wo die Spektren typischer und atypischer Isolate ebenfalls fast vollständig separierte Cluster bilden. Bemerkenswert ist hier die außerordentlich große spektrale Distanz von ca. 3,5, die zwischen den Clustern der typischen und der atypischen Form liegt und die um ca. das Dreifache über der Distanz bei Bioplus 2B liegt.

Das Cluster der atypischen Isolate bei Calsporin ist zudem unterteilt in ein Subcluster für den RAPD-Typ 1 und eines für RAPD-Typ 2; die API- und RAPD-Ergebnisse lassen sich also auch auf Basis von FTIR-Spektren reproduzieren. Auffallend ist allerdings, dass die beiden Kolonie-Morphotypen, für die mit keiner anderen Methode Unterschiede zu ermitteln waren, über ihre FTIR-Spektren sehr klar zu differenzieren sind, während sich die Spektren des zweiten RAPD-Typs nur mit einer im Verhältnis dazu geringen Distanz von den restlichen Spektren der atypischen Form abgrenzen. Betrachtet man also die gesamte biochemische Zusammensetzung der Zellen wie es über FTIR-Spektren möglich ist, ergeben sich für die kolonimorphologischen Varianten eindeutige Unterschiede, die jedoch über die Bestimmung einzelner Charakteristika wie Substratverwertung oder DNA-Profile nicht in Erscheinung treten.



**Abbildung 12: Clusteranalyse der FTIR-Spektren für *B. subtilis* aus Calsporin und Bioplus 2B**

Für die Berechnung wurde die 1. Ableitung der Spektren in den Bereichen  $3030-2830\text{ cm}^{-1}$ ,  $1350-1200\text{ cm}^{-1}$  und  $900-700\text{ cm}^{-1}$  verwendet.

Die *B. subtilis*-Isolate aus Bioplus 2B und GalliPro waren über API und RAPD-PCR nicht zu unterscheiden und auch ihre FTIR-Spektren weisen sehr hohe Ähnlichkeiten auf. Abbildung 12 zeigt eine Clusteranalyse von vier Stämmen aus Bioplus (jeweils zwei der typischen und atypischen Koloniemorphologie) und fünf Stämmen aus GalliPro (drei der typischen und zwei der atypischen Koloniemorphologie). Zu sehen ist nicht nur, dass Cluster von typischen und atypischen Isolat abwechseln und in diesem Fall also die beiden morphologischen Kolonievarianten nicht zu differenzieren sind, sondern auch, dass Cluster der beiden unterschiedlichen Präparate alternieren und z. T. Spektren beider Zusätze in einem Subcluster vermischt sind. Die Daten der FTIR-Spektroskopie bestätigen somit die Ergebnisse aus den vorhergehenden Analysen und lassen vermuten, dass die Stämme aus beiden Futtermittelzusätzen identisch sind. Als Konsequenz wurden sie bei der Validierung der Datenbank ebenfalls als identisch betrachtet.

Über eine Adaption der Referenzdatenbank mit Spektren der zur Verfügung stehenden probiotischen Stämme sollte eine Differenzierung unbekannter Isolate in Wildstämme oder Probiotika und - wenn möglich - zudem eine Zuordnung zur typischen oder atypischen Kolonievariante bei *B. subtilis* sichergestellt werden. Zu diesem Zweck wurden für jede Art sowie jeden Kolonie- und RAPD-Typ Spektren als neue Referenzen in die Datenbank integriert. Die so entstandene neue Datenbank wurde dann mit einem Teil der Isolate auf ihre Leistungsfähigkeit getestet.

Die Zuordnung der Spektren zu dem entsprechenden Futtermittelzusatz gelang in den meisten Fällen sehr eindeutig und zeigt, dass die eingesetzten Stämme starke Unterschiede zu Umweltisolaten aufweisen und von diesen sehr gut zu differenzieren sind. Allerdings fällt auf, dass sich immer wieder Spektren, die bereits vor Beginn dieses Projektes in der Datenbank vorhanden waren, mit sehr geringen Distanzen in die Hitlisten mischen. Abbildung 13 zeigt beispielhaft solch eine Hitliste für ein Isolat mit typischer Kolonieform aus Bioplus 2B.

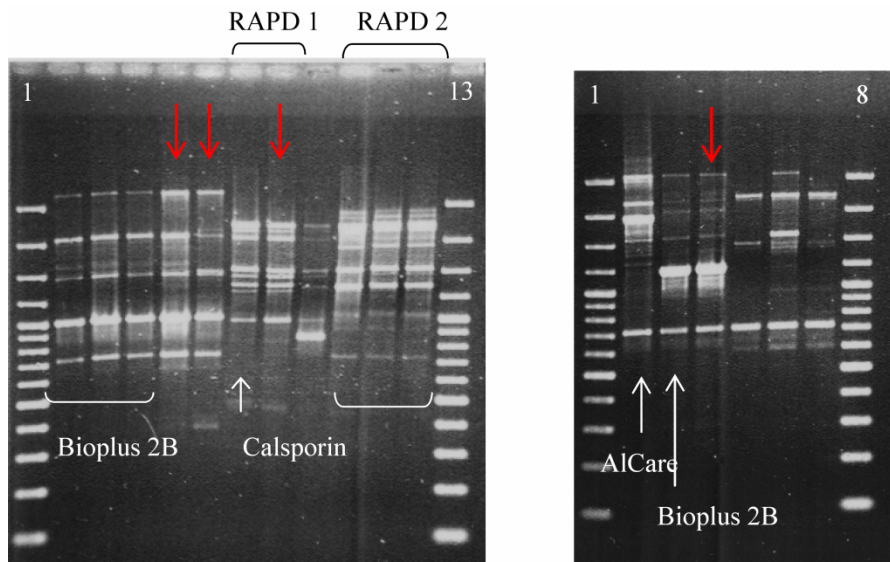
Hit No.	Hit Quality	Sample Name	Group	Threshold
1	0.085620	Bacillus subtilis G5038/Bioplus, atypisch	BacSubG5038_A.5	0.000000
2	0.086538	Bacillus subtilis G4996/Bioplus, typisch	BacSubG4996_t.1	0.000000
3	0.152053	Bacillus subtilis G4996/Bioplus, typisch	BacSubG4996_t.6	0.000000
4	0.153518	Bacillus subtilis ! G2982/Mietke(Bioplus2B)	BacSubG2982!.1	0.000000
5	0.155398	Bacillus subtilis G5034/Bioplus, atypisch	BacSubG5034_A.5	0.000000
6	0.194769	Bacillus subtilis G5027/Bioplus, typisch	BacSubG5027_T.1	0.000000
7	0.212636	Bacillus subtilis G5038/Bioplus, atypisch	BacSubG5038_A.3	0.000000
8	0.217987	Bacillus subtilis ! G118/m1960806	BacSubG118!.100	0.000000
9	0.305298	Bacillus subtilis G5034/Bioplus, atypisch	BacSubG5034_A.7	0.000000
10	0.306559	Bacillus subtilis G5038/Bioplus, atypisch	BacSubG5038_A.2	0.000000

**Abbildung 13: Hitliste für ein FTIR-Spektrum von *B. subtilis* aus Bioplus 2B**

**An den Positionen 4 und 8 steht ein Spektrum in der Hitliste, das bereits vor der Anpassung der Datenbank in dieser enthalten war.**

Für die vierte Position ist bereits an der Benennung zu erkennen, dass es sich hier um ein zu früherer Zeit in die Datenbank integriertes Isolat aus Bioplus 2B handelt; an Position acht hingegen steht das Spektrum eines Isolats aus dem Lebensmittelumfeld. Weil sich auch für die Stämme anderer Zusätze sowie für *B. licheniformis* ein ähnliches Bild ergab, sollte geklärt werden, ob diese Umweltisolate tatsächlich Wildtypen darstellen, die sehr große Ähnlichkeiten zu den Probiotika aufweisen, oder ob die Erklärung für die geringen Distanzen zwischen den Spektren darin liegt, dass es sich um den gleichen Stamm handelt. Zu diesem Zweck wurden aus den Hitlisten einige Umweltisolate ausgewählt und für diese RAPD-Profile erzeugt. Diese sind zusammen mit den Profilen der Futtermittelzusatzstämmen als Referenzen in Abbildung 14 dargestellt.

Das linke Bild zeigt Referenzen und Isolate von *B. subtilis*, rechts sind die Muster von *B. licheniformis* dargestellt. Wie im Vergleich der Muster zu sehen ist, ergaben sich für vier Stämme, die bereits vor Adaption der Datenbank als Referenzen in dieser enthalten waren, identische Profile zu Futtermittelzusatzstämmen aus sowohl Bioplus 2B als auch Calsporin (mit roten Pfeilen markiert). Zwei Stämme entsprechen *B. subtilis*, ein Stamm *B. licheniformis* aus Bioplus 2B, und der vierte Stamm ist identisch zu *B. subtilis* (RAPD-Typ 1) aus Calsporin. Alle anderen Isolate stellen Wildtypen dar. Somit ist klar, dass für *B. subtilis* aus beiden Präparaten bereits Isolate aus anderen Quellen Eingang in die Datenbank gefunden hatten und deren Auftauchen mit kleinen Distanzen in den Hitlisten plausibel ist. Alle anderen Stämme weisen hingegen eine zufällige spektrale Ähnlichkeit zu den Probiotika auf.



**Abbildung 14:** RAPD Fragmentmuster stellvertretender Isolate der Präparate Bioplus 2B, Calsporin und AICare sowie einiger bereits in der Datenbank enthaltener Stämme

Links: *B. subtilis*, rechts: *B. licheniformis*. Links: Bahn 1 und 13: DNA-Marker, Bahn 2-4: *B. subtilis* (Bioplus 2B), Bahn 5+6: Isolate aus der Datenbank, Bahn 7: *B. subtilis* (Calsporin, RAPD-Typ 1), Bahn 8+9: Isolate aus der Datenbank, Bahn 10-12: *B. subtilis* (Calsporin, RAPD-Typ 2). Rechts: Bahn 1 und 8: DNA-Marker, Bahn 2: *B. licheniformis* (AICare), Bahn 3: *B. licheniformis* (Bioplus), Bahn 4-7: Isolate aus der Datenbank. Rote Pfeile markieren Stämme der Datenbank mit identischen Mustern zu probiotischen Futtermittelzusätzen.

Die Zuverlässigkeit der Identifizierung und Typisierung unbekannter Stämme mit der adaptierten Datenbank wurde mit acht *B. licheniformis*- und 13 *B. subtilis*-Isolaten aus Bioplus 2B, 26 *B. subtilis*-Isolaten aus Calsporin sowie 40 *B. subtilis*-Isolaten aus GalliPro ermittelt, wobei für die Isolate aus Bioplus 2B vier, für die aus Calsporin drei und für die aus GalliPro sieben Spektren pro Isolat zur Verfügung standen. Die Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass eine Identifizierung auf Stammebene, also mit einer Zuordnung zu einem Futtermittelzusatz, für die Produkte Bioplus 2B, Calsporin und GalliPro mit 91 bis 100 % korrekten Resultaten sehr gut funktioniert und eine ausgezeichnete Zuverlässigkeit bietet (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Zuverlässigkeit der angepassten FTIR-Referenzdatenbank für die Identifizierung von Stämmen aus Bioplus 2B, Calsporin und GalliPro auf Art- und Stammebene sowie für die Typisierung nach koloniemorphologischem und RAPD-Typ in Prozent**

	Bioplus 2B <i>B. licheniformis</i>	Bioplus 2B <i>B. subtilis</i>	Calsporin <i>B. subtilis</i>	GalliPro <i>B. subtilis</i>
Artebene	100	100	96	100
Stammebene	91	95*	96	100*
Kolonietyp	--	nicht möglich	94	nicht möglich
RAPD-Typ	--	--	96	

\* Weil diese beiden Stämme nicht voneinander zu differenzieren waren, wurden sie bei der Auswertung als ein Stamm behandelt.

Eine Anpassung der bestehenden FTIR-Referenzdatenbank ist somit ausreichend, um eine Identifizierung von Sporenbildnern aus Futtermitteln sicherzustellen. Eine Umstellung der Datenauswertung auf neuronale Netze ist daher nicht erforderlich. Für Calsporin ist zudem eine ebenso zuverlässige Typisierung nach koloniemorphologischem Typ sowie RAPD-Typ möglich. Für den *B. subtilis*-Stamm aus Bioplus 2B und GalliPro ist dies leider nicht der Fall, weil die spektralen Unterschiede zwischen beiden morphologischen Varianten nicht so groß sind wie bei Calsporin (siehe Abbildung 11) und zudem je nach Art der Datenauswertung unterschiedlich zum Tragen kommen (siehe Abbildung 12), was dazu führt, dass sie nicht stabil genug sind, um über eine Datenbank-Identifizierung reproduzierbar gute Ergebnisse zu bringen. Dies ist bereits aus Abbildung 13

ersichtlich, wo die ersten beiden Hits mit fast identischer Hitqualität aufeinander folgen, einer der beiden jedoch zur typischen, der andere zur atypischen Form gehört.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Ausnahme der Ähnlichkeiten zwischen *B. subtilis* aus GalliPro und Bioplus 2B eine Typisierung der Isolate hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu unterschiedlichen Futtermittelzusätzen über die Verwendung des RAPD-Systems erfolgreich war und sich diese Methode deshalb hervorragend als Referenzmethode eignet. Eine Typisierung der Isolate nach der koloniemorphologischen Form war jedoch nicht möglich. Hingegen zeigten sowohl die Ergebnisse der API-, RAPD- und auch FTIR-Analysen, dass im Produkt Calsporin eindeutig zwei unterschiedliche Stämme vorliegen, von denen der RAPD-Typ 1 jedoch mit ca. 90 % den Großteil der Isolate ausmacht. Die Identifizierung von Organismen aus Futtermittelzusätzen auf Artebene war bereits vor Anpassung der Referenzdatenbank sehr zuverlässig und ist nach der Adaption nahezu perfekt möglich. Auch die Zuordnung der Spektren zu den einzelnen Produkten zeigt mit 91 bis 100 % eine sehr hohe Zuverlässigkeit. Für *B. subtilis* aus Bioplus 2B und GalliPro ist eine sichere Typisierung nach Koloniemorphologie nicht möglich, wohingegen für die beiden Stämme aus Calsporin sowohl für die typische und atypische Form als auch die beiden RAPD-Typen sehr gute Ergebnisse erzielt werden.

## 3.2 Milchsäurebakterien

### 3.2.1 Referenzstämme

Für die Identifizierung von Milchsäurebakterien existierten an der Abteilung Mikrobiologie bereits sowohl eine Referenzdatenbank, die mit der OPUS-Software der Firma Bruker Optik (Ettlingen) erstellt wurde, als auch ein künstliches neuronales Netz (KNN), das mit der Software „NeuroDeveloper“<sup>®</sup> der Firma Synthon (Heidelberg) trainiert wurde. Die OPUS-Datenbank enthält Spektren von 407 Stämmen, die zu 105 unterschiedlichen Arten gehören; das KNN 368 Stämme aus 92 Arten.

Gegenstand der Untersuchung waren probiotische Futtermittelzusätze in Form der drei Arten *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici* und *Lactobacillus rhamnosus*. Von *E. faecium* standen 106 Isolate zur Verfügung, die fünf unterschiedlichen Stämmen zugeordnet waren und aus unterschiedlichen Futtermitteln isoliert wurden. 24 Isolate waren Stamm CECT 4515 zugeordnet, 20 Stamm DSM 3530, 29 Stamm DSM 7134, 13 Stamm NCIMB 10415 und 20 Stamm NCIMB 11181. Der Stamm DSM 7134 war bereits mit einem Isolat als Referenz sowohl in der OPUS-Referenzdatenbank als auch dem KNN enthalten. Für *P. acidilactici* standen 13 Isolate zur Verfügung, die alle dem Stamm CNCM MA 18/5M zugeordnet waren, und die Art *L. rhamnosus* war mit drei Isolaten des Stammes DSM 7133 vertreten. Dieser Stamm war bereits sowohl in der OPUS-Referenzdatenbank als auch dem KNN enthalten, die Art *P. acidilactici* war jedoch noch nicht Teil der Datenbanken und musste deshalb neu integriert werden.

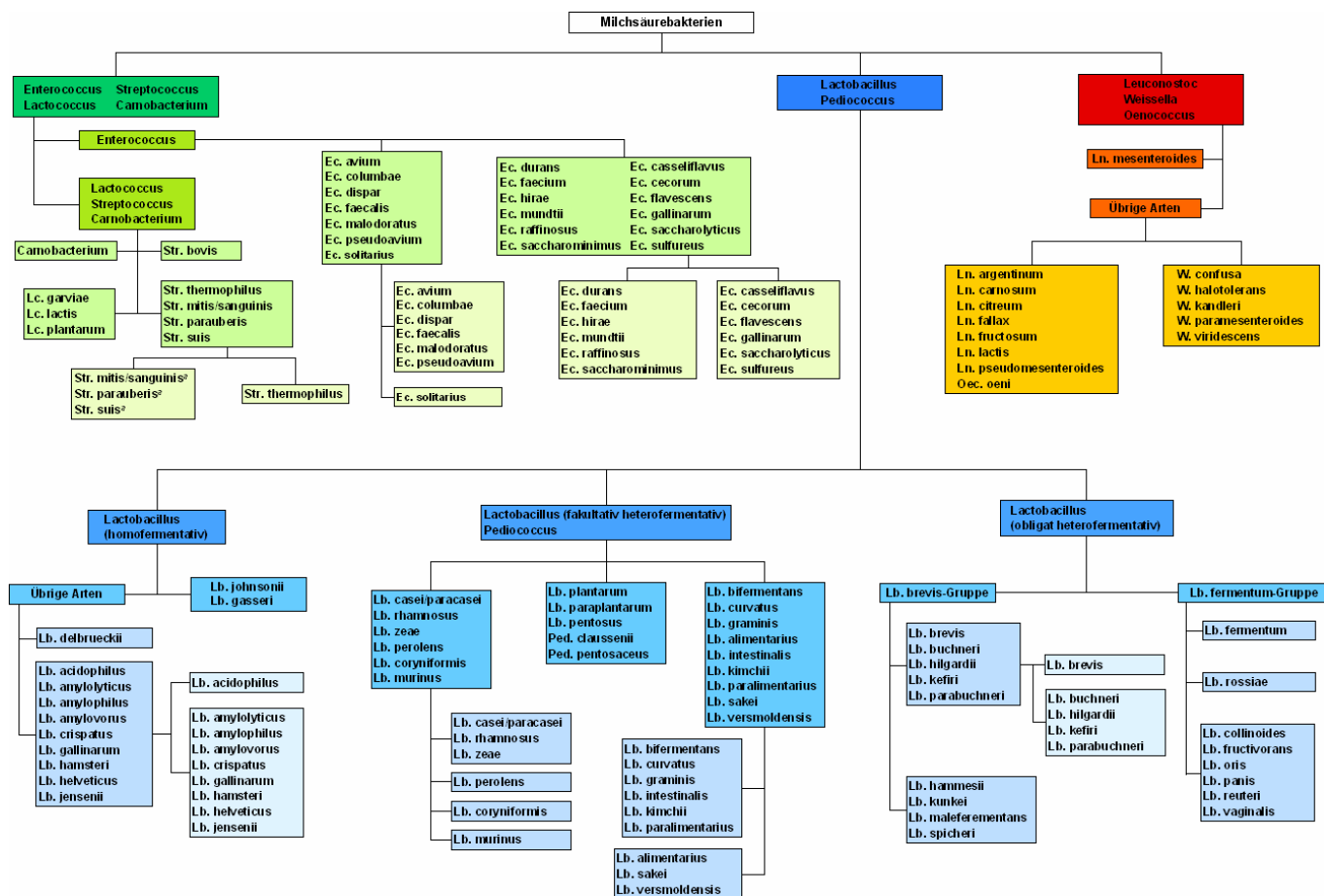
### 3.2.2 Identifizierung auf Artebene

Weil KNN auf einer Verarbeitung von Referenzdaten mit Hilfe multivariater Statistik beruhen und das vorhandene KNN ausgebaut werden sollte, mussten von jedem Isolat ausreichend Spektren zur Verfügung stehen, um eine statistische Auswertung zuzulassen. Aus diesem Grund wurden von jedem Isolat zehn unabhängige FTIR-Spektren aufgenommen. Weil von *L. rhamnosus* nur drei Isolate zur Verfügung standen, wurden hier 25 Spektren aufgenommen, damit ausreichend Daten für eine Abgrenzung zu ubiquitären Stämmen vorhanden waren.

Die Identifizierung von Milchsäurebakterien wird durch eine große Artenvielfalt erschwert. Bemerkenswert ist, dass obwohl innerhalb mancher Gattungen große Unterschiede zwischen einzelnen Arten bestehen, Speziesgruppen existieren, innerhalb derer es sehr enge Verwandtschaftsverhältnisse gibt. Aufgrund dieser Konstellation ist es mit der Identifizierung über OPUS-Referenzdatenbanken nicht immer möglich, eine sichere Aussage auf Artebene treffen zu können. Deshalb wurde zusätzlich ein Identifizierungssystem über KNN aufgebaut, das aufgrund der hierarchischen Strukturierung gerade in eng verwandten Artgruppen eine bessere Auflösung bietet. Für dieses wurden nahezu alle enthaltenen Stämme über molekularbiologische Methoden identifiziert, so dass über die Identität der Referenzstämme kein Zweifel besteht. Das KNN bestand vor der Adaption aus 35 Einzelnetzen, die zu einem großen KNN mit sechs aufeinander folgenden Ebenen verknüpft waren (Abbildung 15), weil die zuverlässige Trennung von 92 Arten in einem Schritt nicht möglich ist. Auf der ersten Ebene werden drei Klassen differenziert. Klasse 1 enthält die Gattungen *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* und *Carnobacterium*, Klasse 2



*Lactobacillus* und *Pediococcus* und Klasse 3 *Leuconostoc*, *Weissella* und *Oenococcus*. Diese Art der Aufteilung orientiert sich an den über DNA-Vergleiche ermittelten Verwandtschaftsverhältnissen, die weitere Untergliederung wurde dann aber an den spektralen Ähnlichkeiten ausgerichtet, da diese sich nicht immer mit den phylogenetischen Ähnlichkeiten decken. Eine Ausnahme bildet hier die Gattung *Lactobacillus*, bei der versucht wurde, auf der zweiten Hierarchiestufe eine Gliederung nach Art der Fermentation von Zuckern vorzunehmen, weil diesen Eigenschaften in der Lebensmittelmikrobiologie eine zentrale Bedeutung zukommt. Insgesamt 19 verschiedene Arten der Gattung *Enterococcus* sind im KNN enthalten, für deren Auftrennung drei Hierarchiestufen von Nöten waren. *L. rhamnosus* und die zwei enthaltenen *Pediococcus*-Arten sind der mittleren Klasse der Laktobazillen (fakultativ heterofermentativ) zugeordnet, für deren Identifizierung insgesamt fünf Hierarchiestufen nötig waren. Das hier dargestellte KNN wurde mit 86 Stämmen aus Lebensmitteln auf seine Zuverlässigkeit geprüft und erzielte mit 92,5 % korrekt identifizierten Spektren ein sehr gutes Resultat.



**Abbildung 15: Architektur des KNN zur Identifizierung von Milchsäurebakterien vor der Erweiterung**  
**35 Einzelnetze sind auf sechs Ebenen zu einem Gesamtnetz verknüpft. Aus Platzgründen wird in der Abbildung meist auf die Darstellung der jeweils letzten Ebene verzichtet. Wo nicht anders gekennzeichnet entspricht diese der Aufschlüsselung der zuletzt dargestellten Klasse in die einzelnen Arten.**

Die Identifizierung der fünf probiotischen *E. faecium*-Stämme über das KNN ergab, dass die drei Stämme DSM 7134, NCIMB 10415 und NCIMB 11181 auf Artebene mit hoher Zuverlässigkeit identifiziert werden, die zwei Stämme CECT 4515 und DSM 3530 hingegen nicht. Das KNN musste an dieser Stelle also um diese Stämme erweitert werden, um eine sichere Identifizierung auf Artebene zu gewährleisten. Die Identifizierung der *E. faecium*-Isolate über die OPUS-Datenbank ergab für keinen Stamm durchgehend eindeutige Ergebnisse, sondern resultierte häufig in heterogenen Hitlisten, in denen Stämme unterschiedlicher *Enterococcus*-Arten alternierten. Hier zeigte sich bereits, dass die Identifizierung über KNN der durch die OPUS-Datenbank überlegen ist, da die Kalibrierung über das Training der KNN die Differenzierung der eng verwandten *Enterococcus*-Arten verbessert. Der *L. rhamnosus*-Stamm konnte über das KNN zuverlässig identifiziert werden, die Isolate von *P. acidilactici*



hingegen nicht, weil diese Art in beiden Datenbanken noch nicht enthalten war. Über die OPUS-Datenbank kann auch *L. rhamnosus* nicht sicher identifiziert werden, weil eine hohe Ähnlichkeit zu *L. casei* besteht.

Das KNN wurde somit zunächst um die probiotischen *E. faecium*-Stämme und *P. acidilactici* erweitert, damit auf Artebene eine zuverlässige Identifizierung erzielt wird. Für jeden Stamm wurden die Spektren eines Isolats zum Training verwendet. Eine Ausnahme stellen die Stämme CECT 4515 und DSM 3530 dar, von denen jeweils zwei Isolate verwendet wurden. In diesem Rahmen wurden zudem einige weitere ubiquitäre *E. faecium*-Stämme in das KNN aufgenommen. Die Erweiterung führte dazu, dass die Architektur des KNN leicht verändert werden musste, da für die Trennung der Arten um *E. faecium* und die Pediokokken jeweils eine weitere Ebene nötig wurde (Abbildung 16, rot umrandet).

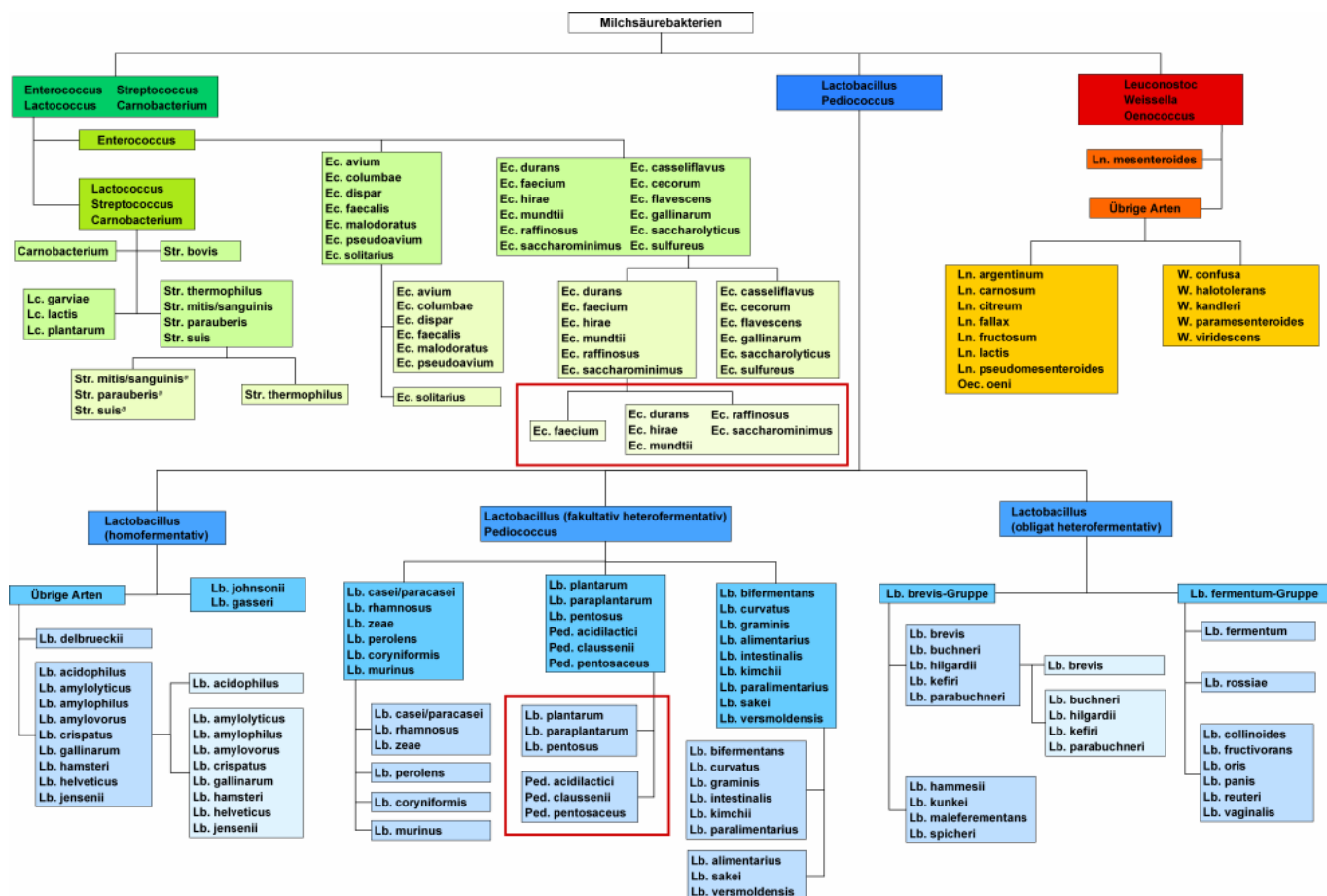


Abbildung 16: Architektur des KNN zur Identifizierung von Milchsäurebakterien nach der Erweiterung mit neuen Stämmen der Arten *E. faecium* und *P. acidilactici*

Die Erweiterung führte zu einer Änderung der hierarchischen Struktur, weil für die Trennung der Arten um *E. faecium* und die Pediokokken jeweils eine weitere Ebene nötig wurde (rote Umrandung). Aus Platzgründen wird in der Abbildung meist auf die Darstellung der jeweils letzten Ebene verzichtet. Wo nicht anders gekennzeichnet, entspricht diese der Aufschlüsselung der zuletzt dargestellten Klasse in die einzelnen Arten.

Nach der Erweiterung wurden alle nicht für das Training verwendeten Isolate genutzt, um die Genauigkeit des KNN zu ermitteln. Für *L. rhamnosus* und *P. acidilactici* konnten 100 % korrekt identifizierte Spektren erreicht werden, bei den fünf *E. faecium*-Stämmen lagen die Werte zwischen 96,6 und 99,4 % (Tabelle 5). Die Identifizierung auf Artebene mit dem entwickelten KNN hat somit einen hohen Grad an Zuverlässigkeit und ist eine sehr gute Ausgangsbasis für die Differenzierung ubiquitärer und probiotischer Isolate.



Analyse des gleichen Isolats nicht absolut übereinstimmende Profile, da die Verwertung mancher Substrate schwankt. Dies konnte für Isolate aller drei Arten beobachtet werden und schränkt die Zuverlässigkeit des API-Systems zusätzlich ein.

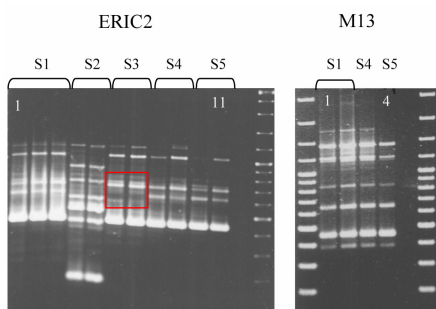
Die Profile der Stämme *L. rhamnosus* DSM 20021T und DSM 20177 sind im Vergleich zum probiotischen Stamm DSM 7133 dargestellt, weil sich für diese Stämme auch über die FTIR-Spektroskopie Schwierigkeiten in der Abgrenzung ergaben.

### 3.2.3.2 Typisierung über RAPD

Ebenso wie für die Bazillen sollte eine robuste und eindeutige Differenzierung der Probiotika über den Einsatz von RAPD-PCR erfolgen. Hierzu wurden die zwei Primersysteme ERIC2 und M13 getestet. Angewandt wurden sie jedoch nur auf *E. faecium*-Isolate, weil es nur hier unterschiedliche Stämme zu differenzieren galt. Im Gegensatz zur Analyse der Bazillen über RAPD-PCR war die Anwendung der Methode bei den Enterokokken mit mehr Schwierigkeiten behaftet. So wurde zwischen den Profilen unterschiedlicher Ansätze vor allem bei der Zahl der detektierten Banden eine Varianz festgestellt, die die Reproduzierbarkeit in einem gewissen Rahmen einschränkte; für die Hauptbanden war die Reproduzierbarkeit jedoch gegeben.

Abbildung 18 zeigt exemplarisch die Bandenmuster von zwei bis drei Isolaten aller fünf Stämme, die über die Verwendung des Primers ERIC2 erzielt wurden, sowie die Muster für die Stämme CECT 4515, NCIMB 10415 und NCIMB 11181, die mit dem M13-Primer erzeugt wurden. Auch hier sind, analog zum API-System, nur für die Stämme DSM 3530 und DSM 7134 spezifische Bandenmuster zu erkennen, wobei Stamm DSM 3530 (S2) ein sehr markantes und klar zu differenzierendes Profil aufweist, Stamm 7134 (S3) sich hingegen nur durch die Abwesenheit einer Bande und die Anwesenheit einer schwächeren Bande abhebt (rot umrandet).

Auch der zweite Primer (M13) ergab für die Stämme CECT 4515, NCIMB 10415 und NCIMB 11181 identische Muster, was den Schluss nahe legt, dass es sich um sehr ähnliche Stämme handeln muss, deren Unterschiede mit den hier angewandten Methoden nicht offensichtlich werden. Für den Einsatz weiterer Primer fehlte im vorliegenden Projekt jedoch die Zeit.



**Abbildung 18: RAPD Fragmentmuster stellvertretender Isolate der *E. faecium*-Stämme**

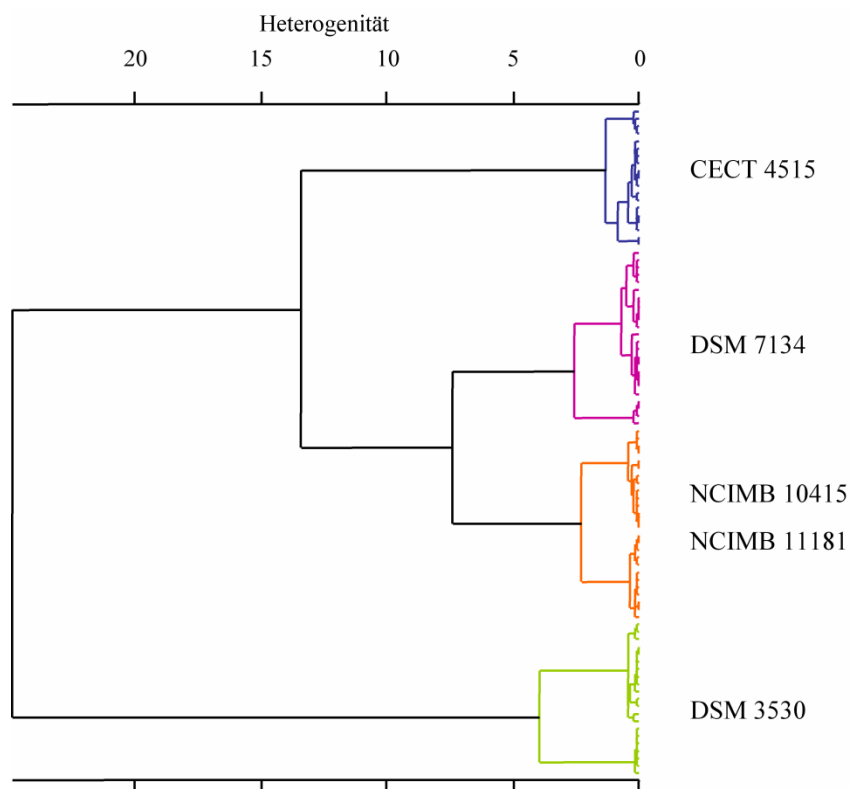
**CECT 4515 (S1), DSM 3530 (S2), DSM 7134 (S3), NCIMB 10415 (S4) und NCIMB 11181 (S5). Links: Primer ERIC2, rechts: Primer M13. Rot umrandet ist der Bereich, in dem sich Stamm DSM 7134 von den übrigen vier Stämmen unterscheidet.**

### 3.2.3.3 Typisierung und Identifizierung mittels FTIR-Spektroskopie

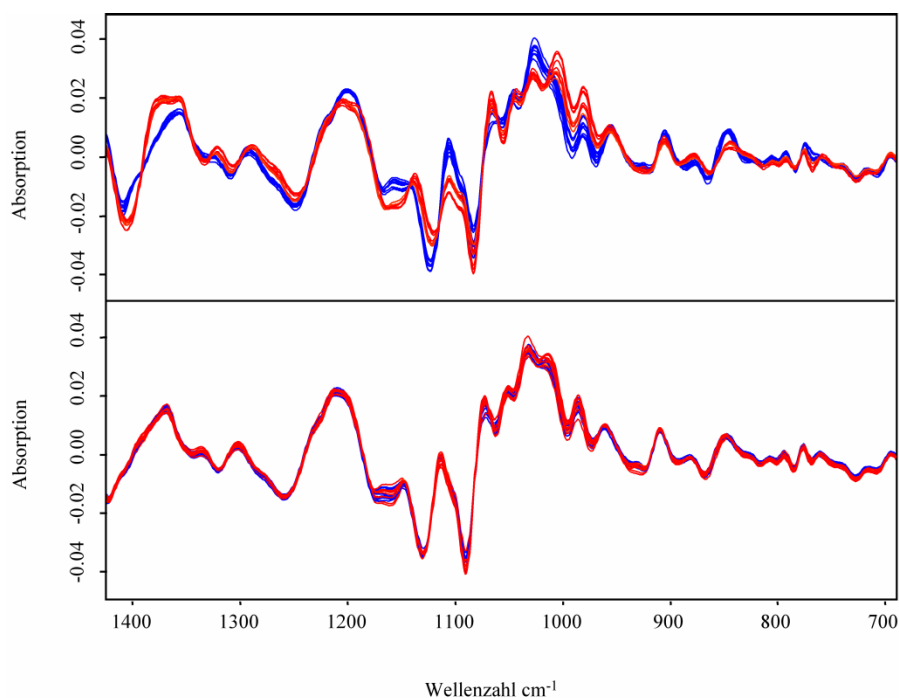
Weil für eine zuverlässige Artidentifizierung der Milchsäurebakterien das KNN genutzt wird, ist es notwendig und liegt nahe, auch die Differenzierung der probiotischen und ubiquitären Isolate über ein KNN zu erzielen. Eine wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Differenzierung ist die Architektur des KNN, d. h. die Aufteilung der Daten in einzelne Klassen, die auf der jeweiligen Ebene unterschieden werden sollen.

Eine Trennung aller fünf *E. faecium*-Stämme war über API und RAPD-PCR nicht möglich, weil die drei Stämme CECT 4515, NCIMB 10415 und NCIMB 11181 mit jedem System identische Profile aufwiesen. Mit FTIR-Spektroskopie jedoch konnten die Stämme in vier Cluster unterteilt werden, wobei nur die beiden NCIMB-Stämme zusammen in ein Cluster fielen (Abbildung 19), die anderen Probiotika jedoch klar differenziert werden konnten. Analog zu den API- und RAPD-Analysen zeigte Stamm DSM 3530 auch hier die größten Distanzen zu den anderen Stämmen. Das Cluster der NCIMB-Isolate weist in Abb. 19 zwar eine Trennung in zwei Subcluster auf, jedoch liegen in jedem der Subcluster Spektren beider Stämme.

Eine genauere Analyse der Spektren dieser beiden Stämme im Vergleich zu zwei gut zu differenzierenden Stämmen (Abbildung 20) zeigt, dass die Spektren absolut deckungsgleich sind und keine reproduzierbaren Unterschiede aufweisen. Somit ist klar, dass die beiden NCIMB-Stämme mit keiner der zur Verfügung stehenden Methoden differenziert werden können und damit auch im KNN in einer Klasse liegen müssen.



**Abbildung 19: Clusteranalyse der FTIR-Spektren für die fünf probiotischen *E. faecium*-Stämme**  
Für die Berechnung wurde die 1. Ableitung der Spektren in den Bereichen  $3030\text{-}2830\text{ cm}^{-1}$ ,  $1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ ,  $1500\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ ,  $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$  und  $900\text{-}700\text{ cm}^{-1}$  verwendet.



**Abbildung 20: Vergleich der ersten Ableitungen von FTIR-Spektren vier probiotischer *E. faecium*-Isolate CECT 4515 (blau) und DSM 3530 (rot) im oberen Teil zeigen deutliche Unterschiede, NCIMB 10415 (blau) und NCIMB 11181 (rot) sind deckungsgleich. Für jeden Stamm sind zehn Spektren im Bereich von 1450-700  $\text{cm}^{-1}$  gezeigt. Die Ableitungen wurden vektornormalisiert.**

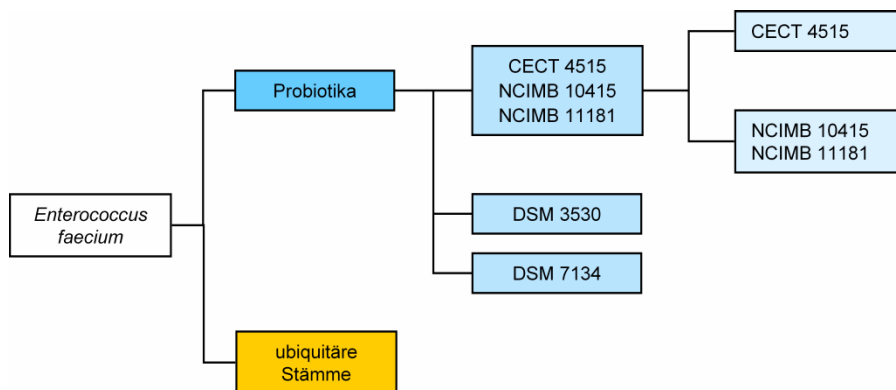
Tabelle 6 gibt einen Überblick über die für das Training und die Validierung des KNN verwendeten *E. faecium*-Stämme. Ca. 80 % der zur Verfügung stehenden Isolate wurden für das Training eingesetzt, die übrigen 20 % dienten der Validierung des KNN und somit der Überprüfung der Zuverlässigkeit.

**Tabelle 6: Zahl der *E. faecium*-Isolate, die zum Training und zur Validierung des KNN zur Differenzierung ubiquitärer von probiotischen Stämmen eingesetzt wurden**

	Training	Validierung	Gesamt
CECT 4515	19	5	24
DSM 3530	16	4	20
DSM 7134	22	5	27
NCIMB 10415	10	3	13
NCIMB 11181	16	4	20
Ubiquitär	11	3	14

Zwei Isolate des Stammes DSM 7134 wurden aus der Analyse ausgeschlossen, weil sie in der Clusteranalyse abseits des ihnen zugehörigen Clusters gruppierten und somit ihre Identität nicht gesichert war. Weil allerdings für Stamm DSM 7134 die meisten Isolate zur Verfügung standen, beeinträchtigte dies das Training nicht. Ubiquitäre Stämme standen insgesamt 14 zur Verfügung, die aus unterschiedlichen Quellen (meist Lebensmitteln) isoliert wurden. Als optimale Architektur des KNN hat sich die in Abbildung 21 dargestellte Struktur herausgestellt. Zunächst wird auf der ersten Ebene zwischen ubiquitären und probiotischen Stämmen unterschieden und anschließend auf der zweiten und dritten Ebene die Differenzierung der einzelnen Probiotika vorgenommen. Dabei werden die Stämme CECT 4515, NCIMB 10415 und NCIMB 11181 auf Ebene zwei zunächst in einer Klasse zusammengefasst und erst auf Ebene drei der Stamm CECT 4515 abgetrennt.

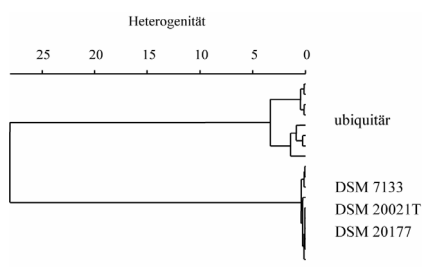
Die Validierung des KNN mit den nicht für das Training verwendeten Isolaten ergab für die erste Ebene (Differenzierung von probiotisch und ubiquitär) ein perfektes Ergebnis mit einer Quote von 100 % korrekt identifizierten Spektren und auch die Differenzierung der probiotischen Stämme ergab mit 98,2 % richtig zugeordneten Spektren ein exzellentes Ergebnis. Somit ist nicht nur die Differenzierung von probiotischen und ubiquitären Stämmen mit äußerster Zuverlässigkeit möglich, sondern auch die einzelnen Probiotika können mit Ausnahme der NCIMB-Stämme sicher voneinander getrennt werden. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass keine ubiquitären Isolate aus dem Futtermittelbereich zur Verfügung standen, weshalb die Ergebnisse des KNN während der ersten Zeit des Einsatzes in der Futtermittelmikrobiologie noch kritisch betrachtet werden sollten.



**Abbildung 21: Architektur des KNN zur Differenzierung von probiotischen und ubiquitären *E. faecium*-Stämmen**

Die Differenzierung der ubiquitären und probiotischen *L. rhamnosus*-Stämme war weniger komplex, weil nur ein probiotischer *L. rhamnosus*-Stamm Gegenstand der Untersuchung war, von dem auch nur drei Isolate zur Verfügung standen. Zwei der Isolate wurden für das Training des KNN genutzt, der dritte für die Validierung. Zudem waren fünf ubiquitäre Stämme vorhanden sowie zwei weitere Stämme der DSMZ.

Abbildung 22 zeigt eine hierarchische Clusteranalyse der ubiquitären und aller DSM-Stämme und es fällt auf, dass die zwei offiziellen Stämme der DSM nicht von dem probiotischen Stamm differenziert werden können, die ubiquitären Isolate sich dagegen deutlich abgrenzen. Auch über das API-System konnten zwischen dem probiotischen und den zwei anderen DSM-Stämmen keine Unterschiede festgestellt werden (vgl. Abbildung 17), sodass auf jeden Fall davon ausgegangen werden kann, dass diese drei Stämme sehr ähnlich, wenn nicht gar identisch sind.



**Abbildung 22: Clusteranalyse der FTIR-Spektren für den probiotischen *L. rhamnosus*-Stamm DSM 7133 sowie ubiquitäre Stämme und zwei weitere Stämme der DSM**

**Für die Berechnung wurde die 1. Ableitung der Spektren in den Bereichen 3030-2830 cm<sup>-1</sup>, 1800-1500 cm<sup>-1</sup>, 1500-1200 cm<sup>-1</sup>, 1200-900 cm<sup>-1</sup> und 900-700 cm<sup>-1</sup> verwendet.**

Für das Training des KNN wurden somit vier der fünf ubiquitären Isolate und zwei der drei probiotischen Isolate verwendet; jeweils ein Stamm wurde für eine anschließende Validierung zurückgehalten. Die Stämme DSM 20021 und DSM 20177 wurden aus der Analyse herausgehalten. Das KNN besteht nur aus einer einzigen Ebene, auf der die Trennung zwischen ubiquitär und probiotisch erfolgt. Die Validierung mit 21 Spektren der zwei zurückgehaltenen Stämme ergab eine zu 100 % korrekte Zuordnung zu den Klassen probiotisch und ubiquitär. Eine Differenzierung ubiquitärer Stämme vom probiotischen *L. rhamnosus*

ist somit mit hoher Zuverlässigkeit möglich. Auch hier muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass keine ubiquitären Stämme aus Futtermitteln zur Verfügung standen, weshalb das KNN für diesen Anwendungsbereich noch zu testen ist.

Zusammenfassend kann für die Milchsäurebakterien festgestellt werden, dass weder die Differenzierung über API noch über RAPD-PCR zufriedenstellend war, weil mit beiden Systemen nur zwei der fünf *E. faecium*-Stämme zuverlässig abgegrenzt werden konnten. Zudem zeigten beide Methoden keine gute Reproduzierbarkeit. Prinzipiell wäre es zwar möglich, dass über den Einsatz anderer Primer in der RAPD-PCR bessere Ergebnisse zu erzielen wären, aus Zeitgründen war eine Anwendung weiterer Primer allerdings nicht durchführbar. Die Identifizierung aller drei probiotischen Arten über FTIR-Spektroskopie und KNN wurde mit hoher Zuverlässigkeit realisiert und auch die Differenzierung der probiotischen und ubiquitären Stämme von *E. faecium* und *L. rhamnosus* gelang mit einer Genauigkeit von 100 %. Auch war bei den Enterokokken die Differenzierung der probiotischen Stämme untereinander mit Ausnahme der beiden NCIMB-Stämme gut möglich. Es steht somit ein System zur Verfügung, mit dem sich Milchsäurebakterien aus Futtermitteln einfach, schnell und günstig bis unter die Speziesebene analysieren lassen.

## 4 Fazit

FTIR-Spektroskopie hat sich als sehr leistungsstarke und zuverlässige Methode für die Differenzierung probiotischer Sporenbildner und Milchsäurebakterien erwiesen. Für beide Organismengruppen wurden Identifizierungsraten zwischen 91 und 100 % in der Stammtypisierung erreicht, was nicht nur eine sichere Differenzierung von probiotischen und ubiquitären Isolaten bedeutet, sondern auch die Differenzierung einzelner probiotischer Stämme der gleichen Art einschließt. Somit steht der Futtermittelanalytik eine Methode zur Verfügung, mit der sich ohne großen Aufwand und mit hoher Zuverlässigkeit mikrobiologische Stammanalysen durchführen lassen.

Die Technik ist einfach anzuwenden und lässt sich sehr gut in den Ablauf eines Labors integrieren. Weil sie verschwindend geringe laufende Kosten verursacht und über einen hohen Automatisierungsgrad verfügt, können auch größere Probenmengen gut bearbeitet werden. Zudem kann mit nur einer Analyse sowohl die Spezies bestimmt als auch unterhalb der Artgrenze typisiert werden, was bislang mit keiner anderen Technik möglich ist. Die verwendeten Referenzdatenbanken sind offene Systeme und können jederzeit mit weiteren Isolaten und Arten erweitert werden, was eine kontinuierliche Weiterentwicklung der Technik ermöglicht.

# 5 Literaturverzeichnis

- AMIALI, N.M., MULVEY, M.R., SEDMAN, J., LOUIE, M., SIMOR, A.E. AND ISMAIL, A.A. (2007) Rapid identification of coagulase-negative staphylococci by Fourier transform infrared spectroscopy. *J Microbiol Methods* 68, 236-242.
- BEATTIE, S.H., HOLT, C., HIRST, D. AND WILLIAMS, A.G. (1998) Discrimination among *Bacillus cereus*, *B. mycoides* and *B. thuringiensis* and some other species of the genus *Bacillus* by Fourier transform infrared spectroscopy. *FEMS Microbiol Lett* 164, 201-206.
- BOSCH, A., MINAN, A., VESCINA, C., DEGROSSI, J., GATTI, B., MONTANARO, P., MESSINA, M., FRANCO, M., VAY, C., SCHMITT, J., NAUMANN, D. AND YANTORNO, O. (2008) Fourier transform infrared spectroscopy for rapid identification of nonfermenting gram-negative bacteria isolated from sputum samples from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 46, 2535-2546.
- BÜCHL, N.R., HUTZLER, M., MIETKE-HOFMANN, H., WENNING, M. AND SCHERER, S. (2010) Differentiation of probiotic and environmental *Saccharomyces cerevisiae* strains in animal feed. *J Appl Microbiol* 109, 783-791.
- BÜCHL, N.R., WENNING, M., SEILER, H., MIETKE-HOFMANN, H. AND SCHERER, S. (2008) Reliable identification of closely related *Is-satchenkia* and *Pichia* species using artificial neural network analysis of Fourier-transform infrared spectra. *Yeast* 25, 787-798.
- BÜCHL, N.R., WENNING, M., SCHERER, S., MIETKE-HOFMANN, H. (2011): Differenzierung von probiotischen und ubiquitären Hefen aus Futtermitteln- Anwendung der Fourier-Transform-Infrarot (FT-IR)-Spektroskopie in der Futtermittelmikrobiologie. Schriftenreihe des LfULG, Heft 31/2011
- COUTINHO, C.P., SA-CORREIA, I. AND LOPES, J.A. (2009) Use of Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics to discriminate clinical isolates of bacteria of the *Burkholderia cepacia* complex from different species and ribopatterns. *Anal Bioanal Chem* 394, 2161-2171.
- ESSENDUBI, M., TOUBAS, D., BOUZAGGOU, M., PINON, J.M., MANFAIT, M. AND SOCKALINGUM, G.D. (2005) Rapid identification of *Candida* species by FT-IR microspectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1724, 239-247.
- FISCHER, G., BRAUN, S., THISSEN, R. AND DOTT, W. (2006) FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *J Microbiol Methods* 64, 63-77.
- GOODACRE, R., TIMMINS, E.M., ROONEY, P.J., ROWLAND, J.J. AND KELL, D.B. (1996) Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks. *FEMS Microbiol Lett* 140, 233-239.
- GUIBET, F., AMIEL, C., CADOT, P., CORDEVANT, C., DESMONTS, M.H., LANGE, M., MARECAT, A., TRAVERT, J., DENIS, C. AND MARIEY, L. (2003) Discrimination and classification of Enterococci by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Vibr Spectrosc* 33, 133-142.
- HELM, D., LABISCHINSKI, H. AND NAUMANN, D. (1991a) Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier-Transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach. *J Microbiol Methods* 14, 127-142.
- HELM, D., LABISCHINSKI, H., SCHALLEHN, G. AND NAUMANN, D. (1991b) Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Gen Microbiol* 137, 69-79.
- JARVIS, R.M. AND GOODACRE, R. (2005) Genetic algorithm optimization for pre-processing and variable selection of spectroscopic data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 21, 860-868.
- JURKOVIC, D., KRIZKOVA, L., SOJKA, M., TAKACOVA, M., DUSINSKY, R., KRAJCOVIC, J., VANDAMME, P. AND VANCANNEYT, M. (2007) Genetic diversity of *Enterococcus faecium* isolated from Bryndza cheese. *Int J Food Microbiol* 116, 82-87.
- KIM, S., REUHS, B.L. AND MAUER, L.J. (2005) Use of Fourier transform infrared spectra of crude bacterial lipopolysaccharides and chemometrics for differentiation of *Salmonella enterica* serotypes. *J Appl Microbiol* 99, 411-417.
- KIRKWOOD, J., GHETLER, A., SEDMAN, J., LECLAIR, D., PAGOTTO, F., AUSTIN, J.W. AND ISMAIL, A.A. (2006) Differentiation of group I and group II strains of *Clostridium botulinum* by focal plane array Fourier transform infrared spectroscopy. *J Food Prot* 69, 2377-2383.
- KUHM, A.E., SUTER, D., FELLEISEN, R. AND RAU, J. (2009) Identification of *Yersinia enterocolitica* at the species and subspecies levels by Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* 75, 5809-5813.
- KÜMMERLE, M., SCHERER, S. AND SEILER, H. (1998) Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* 64, 2207-2214.
- MAHENTHIRALINGAM, E., MARCHBANK, A., DREVINEK, P., GARAIOVA, I. AND PLUMMER, S. (2009) Use of colony-based bacterial strain typing for tracking the fate of *Lactobacillus* strains during human consumption. *BMC microbiology* 9, 251.



- MAQUELIN, K., KIRSCHNER, C., CHOO-SMITH, L.P., NGO-THI, N.A., VAN VREESWIJK, T., STAMMLER, M., ENDTZ, H.P., BRUINING, H.A., NAUMANN, D. AND PUPPELS, G.J. (2003) Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *J Clin Microbiol* 41, 324-329.
- MARIEY, L., SIGNOLLE, J.P., AMIEL, C. AND TRAVERT, J. (2001) Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibr Spectrosc* 26, 151-159.
- MIETKE-HOFMAN, H., KRETZSCHMAR, A., GAREIS, M., BUCHER, E. (2008): Mikrobiologische Charakterisierung von Malzkeimen. Schriftenreihe des LfULG 31/2008
- MIETKE, H., BEER, W., SCHLEIF, J., SCHABERT, G. AND REISSBRODT, R. (2010) Differentiation between probiotic and wild-type *Bacillus cereus* isolates by antibiotic susceptibility test and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). *Int J Food Microbiol* 140, 57-60.
- MOUWEN, D.J., CAPITA, R., ALONSO-CALLEJA, C., PRIETO-GOMEZ, J. AND PRIETO, M. (2006) Artificial neural network based identification of *Campylobacter* species by Fourier transform infrared spectroscopy. *J Microbiol Methods* 67, 131-140.
- NAUMANN, A. (2009) A novel procedure for strain classification of fungal mycelium by cluster and artificial neural network analysis of Fourier transform infrared (FTIR) spectra. *The Analyst* 134, 1215-1223.
- NAUMANN, D. (2000) Infrared Spectroscopy in Microbiology. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry* ed. Meyers, R.A. pp.102-131. Chichester: John Wiley & Sons.
- NAUMANN, D., HELM, D. AND LABISCHINSKI, H. (1991) Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* 351, 81-82.
- OBERREUTER, H., CHARZINSKI, J. AND SCHERER, S. (2002) Intraspecific diversity of *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis* based on partial 16S rDNA sequence analysis and Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Microbiology* 148, 1523-1532.
- OUST, A., MORETRO, T., KIRSCHNER, C., NARVHUS, J.A. AND KOHLER, A. (2004a) Evaluation of the robustness of FT-IR spectra of lactobacilli towards changes in the bacterial growth conditions. *FEMS Microbiol Lett* 239, 111-116.
- OUST, A., MORETRO, T., KIRSCHNER, C., NARVHUS, J.A. AND KOHLER, A. (2004b) FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli. *J Microbiol Methods* 59, 149-162.
- OUST JANBU, A., MORETRO, T., BERTRAND, D. AND KOHLER, A. (2008) FT-IR microspectroscopy: a promising method for the rapid identification of *Listeria* species. *FEMS Microbiol Lett* 278, 164-170.
- PREISNER, O., LOPES, J.A., GUIOMAR, R., MACHADO, J. AND MENEZES, J.C. (2007) Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in bacteriology: towards a reference method for bacteria discrimination. *Anal Bioanal Chem* 387, 1739-1748.
- REBUFFO-SCHEER, C.A., DIETRICH, J., WENNING, M. AND SCHERER, S. (2008) Identification of five *Listeria* species based on infrared spectra (FTIR) using macrosamples is superior to a microsample approach. *Anal Bioanal Chem* 390, 1629-1635.
- REBUFFO-SCHEER, C.A., KIRSCHNER, C., STAEMMLER, M. AND NAUMANN, D. (2007a) Rapid species and strain differentiation of nontuberculous mycobacteria by Fourier-Transform Infrared microspectroscopy. *J Microbiol Methods* 68, 282-290.
- REBUFFO-SCHEER, C.A., SCHMITT, J. AND SCHERER, S. (2007b) Differentiation of *Listeria monocytogenes* Serovars by Using Artificial Neural Network Analysis of Fourier-Transformed Infrared Spectra. *Appl Environ Microbiol* 73, 1036-1040.
- REBUFFO, C.A., SCHMITT, J., WENNING, M., VON STETTEN, F. AND SCHERER, S. (2006) Reliable and rapid identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* 72, 994-1000.
- RIESER, G., V. BREHMER, S., SCHUFFENHAUER, G., WENNING, M. AND SCHERER, S. (submitted) Identification of bacteria from pharmaceutical clean rooms by FT-IR spectroscopy.
- RONIMUS, R.S., PARKER, L.E. AND MORGAN, H.W. (1997) The utilization of RAPD-PCR for identifying thermophilic and mesophilic *Bacillus* species. *FEMS Microbiol Lett* 147, 75-79.
- SAMPIMON, O.C., ZADOKS, R.N., DE VliegHER, S., SUPRE, K., HAESBROUCK, F., BARKEMA, H.W., SOL, J. AND LAM, T.J. (2009) Performance of API Staph ID 32 and Staph-Zym for identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Vet Microbiol* 136, 300-305.
- SANDT, C., SOCKALINGUM, G.D., AUBERT, D., LEPAN, H., LEPOUSE, C., JAUSSAUD, M., LEON, A., PINON, J.M., MANFAIT, M. AND TOUBAS, D. (2003) Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units. *J Clin Microbiol* 41, 954-959.
- SCHLEIF, J. UND MIETKE, H. (2003): Charakterisierung und Identifizierung von *Bacillus cereus*-Isolaten aus Futtermitteln und Lebensmitteln mittels Fourier-Transform-Infrarot (FT-IR) Spektroskopie. Schriftenreihe der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft Heft 3- 8. Jahrgang 2003
- SELTMANN, G., VOIGT, W. AND BEER, W. (1994) Application of physico-chemical typing methods for the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains of phage type 25/17. *Epidemiology and Infection* 113, 411-424.

- SHAPAVAL, V., MORETRO, T., SUSO, H.P., ASLI, A.W., SCHMITT, J., LILLEHAUG, D., MARTENS, H., BOCKER, U. AND KOHLER, A. (2010) A high-throughput microcultivation protocol for FTIR spectroscopic characterization and identification of fungi. *Journal of biophotonics* 3, 512-521.
- TIMMINS, E.M., QUAIN, D.E. AND GOODACRE, R. (1998) Differentiation of brewing yeast strains by pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. *Yeast* 14, 885-893.
- TINTELNOT, K., HAASE, G., SEIBOLD, M., BERGMANN, F., STAEMMLER, M., FRANZ, T. AND NAUMANN, D. (2000) Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 38, 1599-1608.
- UDELHOVEN, T., NAUMANN, D. AND SCHMITT, J. (2000) Development of a Hierarchical Classification System with Artificial Neural Networks and FT-IR Spectra for the Identification of Bacteria. *Appl Spectrosc* 54, 1471-1479.
- UDELHOVEN, T., NOVOZHILOV, M. AND SCHMITT, J. (2003) The NeuroDeveloper: a tool for modular neural classification of spectroscopic data. *Chemometrics and Intelligent laboratory systems* 66, 219-226.
- VDLUFA METHODENBUCH III: Verfahrensweisung zur Identifizierung von Bakterien, hefen, Schimmel- und Schwärzepilzen als produkttypische oder verderbanzeigende Indikatorkeime. Verbandsmethode 28.1.3 in der jeweils gültigen Fassung
- WENNING, M., BÜCHL, N.R. AND SCHERER, S. (2010) Species and strain identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks. *Journal of biophotonics* 3, 493-505.
- WENNING, M., SCHERER, S. AND NAUMANN, D. (2008) Infrared Spectroscopy in the Identification of Microorganisms. In *Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis* eds. Diem, M., Griffiths, P.R. and Chalmers, J.M. pp.71-96. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- WENNING, M., SEILER, H. AND SCHERER, S. (2002) Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. *Appl Environ Microbiol* 68, 4717-4721.
- WENNING, M., THEILMANN, V. AND SCHERER, S. (2006) Rapid analysis of two food-borne microbial communities at the species level by Fourier-transform infrared microspectroscopy. *Environ Microbiol* 8, 848-857.
- WINDER, C.L., CARR, E., GOODACRE, R. AND SEVIOUR, R. (2004) The rapid identification of *Acinetobacter* species using Fourier transform infrared spectroscopy. *J Appl Microbiol* 96, 328-339.

**Herausgeber:**

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

**Autoren:**

Dr. Mareike Wenning; Prof. Dr. Siegfried Scherer  
Technische Universität München, Zentralinstitut für Ernährungs- und  
Lebensmittelforschung, Abteilung Mikrobiologie  
Telefon: + 49 8161 71 75 70  
Telefax: + 49 8161 77 44 92  
E-Mail: ZIEL-Mikrobiologie@wzw.tum.de  
Dr. Henriette Mietke-Hofmann  
Staatliche Betriebsgesellschaft für Umwelt und Landwirtschaft, Geschäftsbereich  
Labore Landwirtschaft

**Redaktion:**

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

**Redaktionsschluss:**

15.07.2011

**ISSN:**

1867-2868

**Hinweis:**

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

**Verteilerhinweis**

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

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

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