Detektion von Schadhefen in Wein mittels mit Flusszytometrie analysierter Fluoreszenz in situ Hybridisierung (Flow-FISH)

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Fakultät Naturwissenschaften Universität Hohenheim

Institut für Lebensmittelwissenschaften und Biotechnologie

vorgelegt von

Ilka Nadine Willberger

aus Seeheim-Jugenheim

2021

Dekan: Prof. Dr. Uwe Beifuss

1. berichtende Person: Prof. Dr. Maren Scharfenberger-Schmeer

2. berichtende Person: Prof. Dr. Ralf Kölling-Paternoga

Eingereicht am: 18.10.2021 Mündliche Prüfung am: 09.03.2022

Die vorliegende Arbeit wurde am 25.12.2021 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als "Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften" angenommen.

Zusammenfassung

In der önologischen Praxis werden meist unpasteurisierte Traubenmoste verwendet. Dadurch kommt es zu einem vermehrten Eintrag von Nicht-Saccharomyceten, welche den Fermentationsprozess nachhaltig beeinflussen können. Störungen im Fermentationsprozess werden im Praxisbetrieb zumeist nur anhand von Auffälligkeiten ausgewählter Parameter wie Zuckergehalt oder Temperatur oder dem Auftreten von Fehltönen detektiert. Die fermentierende Hefepopulation kann zu diesem Zeitpunkt bereits so geschädigt sein, dass ein Eingreifen in den Fermentationsprozess das Auftreten von Fehltönen im Endprodukt oder eine unvollständige Fermentation nicht mehr verhindern kann. Mit Hilfe der Flusszytometrie wurde eine effiziente Methode entwickelt, um die gängigen Vertreter der Fermentationspopulation wie Saccharomyces cerevisiae und der Schadhefenpopulation wie Hanseniaspora uvarum, Dekkera bruxellensis und Pichia anomala im Fermentationsverlauf mittels FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) zu detektieren und quantitativ zu erfassen. Durch eine rasche Detektion können rechtzeitig Gegenmaßnahmen ergriffen werden, bevor eine Schadhefenpopulation zu großen Einfluss auf den Fermentationsverlauf und die gebildeten Stoffwechselmetabolite nehmen kann.

Die Etablierung der Flow-FISH wurde in definiertem Medium (YPD) und pasteurisiertem weißen Traubenmost mit Reinkulturen aus Stammsammlungen durchgeführt. Die Probenentnahme und Fixierung erfolgt direkt aus Fermentationsansätzen. Zur Hybridisierung werden 18S- und 26S-rRNA-Sonden mit FITC-Markierung eingesetzt. Für die Auswertung der flusszytometrischen Daten wird in dieser Arbeit die Methode der Overton-Subtraktion angewendet. Diese ermöglicht eine genauere Beurteilung der hybridisierten Zellpopulation als das übliche Setzen eines Markers. Dazu wird eine effektive Negativkontrolle mit komplementärer Sequenz zu der universellen Eukaryontensonde (Euk516) eingeführt. Anschließend erfolgte die Optimierung der bereits aus der Literatur bekannten Methode hinsichtlich Hybridisierungsbedingungen und Zellfixierung und somit ihre Anpassung an die

Anforderungen einer quantitativen flusszytometrischen Analyse. Mit der Fixierung in Formaldehyd oder in Ethanol wurden Fixiermethoden entwickelt, die die Ansprüche an sowohl eine schnelle und zuverlässige Fixierung im Labor, als auch an eine rasche Fixierung im Keller, sollte ein Transport ins Labor nicht zügig möglich sein, erfüllen.

Zur Erhöhung der Fluoreszenzintensität wurden Hilfssonden entworfen. Diese sind unmarkiert und binden in direkter Nachbarschaft der spezifischen Sonde. Bei allen untersuchten Hefespezies *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *D. bruxellensis* und *P. anomala* kann durch den Einsatz der Hilfssonden die Fluoreszenzintensität deutlich gesteigert werden. Bei *D. bruxellensis* und *P. anomala* ist erst durch den Einsatz der Hilfssonden ein Nachweis möglich. Durch die Hilfssonden kann der Flow-FISH-Assay in einem breiteren Wachstumsbereich der Hefekultur eingesetzt werden. Ohne Hilfssonden ist die quantitative Detektion auf die mittlere logarithmische Wachstumsphase beschränkt. Mit Hilfssonden können schon in der frühen logarithmischen Wachstumsphase bis in die stationäre Phase hinein hybridisierte Zellen zuverlässig detektiert werden. Damit wird die kritische Phase der fermentativen Aktivität abgedeckt, um so zunehmende Kontaminationen in der Fermentation erkennen zu können.

Die Spezifizität der Sonden ist gegeben. Zum Teil kommt es zu leicht erhöhten Fluoreszenzintensitäten gegenüber der Negativkontrolle vor allem mit der *D. bru- xellensis*-Sondenkombination und dafür unspezifischen Hefen, die wahrscheinlich auf vermehrte Bindungen auf Grund der Zusammenstellung dieser Sondenkombination zurückzuführen sind.

Der Flow-FISH-Assay ist auch in Mischungen verschiedener Hefespezies und bis zu einer Zellzahl von 10³ Zellen/ml in der Ausgangsfermentation zuverlässig. Dieses Detektionslimit wird auch von anderen molekularbiologischen Methoden zur Hefedetektion erreicht. Im Gegensatz zu den meisten dieser Methoden kann die Flow-FISH auch die Anzahl der vorhandenen Hefen quantifizieren. Der Einsatz des Flusszytometers ermöglicht zusätzlich eine einfache Variante die Gesamtzellzahl aller Hefen in der Fermentation zu ermitteln. Das Detektionslimit der Flow-FISH ermöglicht eine Detektion bevor die Schadschwellenwerte der untersuchten Hefen erreicht sind.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Flow-FISH-Methode ist auch bei anderen Hefestämmen, die teilweise auch aus Wildisolaten stammen, anwendbar. Eine Übertragbarkeit auf native Fermentationen aus der önologischen Praxis ist gegeben.

Es gelang sowohl Spontanfermentationen als auch inokulierte Fermentationen in Praxisgärungen im Stahltank auf ihre Hefepopulationszusammensetzung hin zu untersuchen und ihre Entwicklung im Laufe der Fermentation zu verfolgen. Der optimierte Flow-FISH-Assay bietet durch den Einsatz der Flusszytometrie und der in dieser Arbeit verwendeten Hilfssonden und Negativkontrolle eine stabile Basis zur weiteren Entwicklung eines Testsystems für den Einsatz in der önologischen Praxis.

Abstract

In oenological practice, mostly unpasteurised grape musts are used. This leads to an increased introduction of non-saccharomyces, which can have a lasting effect on the fermentation process. Disturbances in the fermentation process are usually only detected in practice on the basis of abnormalities in selected parameters such as sugar content or temperature or the occurrence of off-flavours. The fermenting yeast population may already be so affected at this point that intervention in the fermentation process can no longer prevent the occurrence of off-flavours in the end product or incomplete fermentation. With the help of flow cytometry, an efficient method using FISH (Fluorescence In Situ Hybridisation) was developed to detect and quantify the common representatives of the fermentation population such as *Sacchoromyces cerevisiae* and the harmful yeast population such as *Hanseniaspora uvarum*, *Dekkera bruxellensis* and *Pichia anomala* in the course of fermentation. Rapid detection enables countermeasures to be taken in good time before a harmful yeast population can have too great of an influence on the course of fermentation and the metabolites formed.

Flow-FISH was established with pure cultures from strain collections in defined medium (YPD) and pasteurised white grape must. Samples are extracted and fixated directly from fermentation mixtures. For hybridisation, 18S- and 26S-rRNA probes with FITC-labelling are used. For the evaluation of the flowcytometric data, the Overton-subtraction method is used in this work. This allows a more accurate assessment of the hybridised cell population than the usual setting of a marker. For this purpose, an effective negative control with complementary sequence to the universal eukaryote probe (Euk516) is introduced. Subsequently, the method already known from the literature was optimised with regard to hybridisation conditions and cell fixation and thus adapted to the requirements of a quantitative flow cytometric analysis. With fixation in formaldehyde or in ethanol, fixation methods were developed that fulfil the requirements of both rapid and reliable fixation in the laboratory and rapid fixation in the cellar, if transport to the laboratory is not

possible in a timely manner.

Helper probes were designed to increase the fluorescence intensity. They are unlabelled and bind in the direct proximity of the specific probe. In all yeast species investigated, *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *D. bruxellensis* and *P. anomala*, the fluorescence intensity can be considerably increased by using the helper probes. In the case of *D. bruxellensis* and *P. anomala*, detection is only possible with the use of the helper probes. The helper probes allow the Flow-FISH assay to be used in a broader growth range of the yeast culture. Without helper probes, quantitative detection is limited to the middle logarithmic growth phase. With helper probes, hybridised cells can be reliably detected starting in the early logarithmic growth phase up until the stationary phase. This covers the critical phase of fermentative activity so that increasing contamination can be detected in the fermentation.

The specificity of the probes is given. In part, there are slightly increased fluore-scence intensities compared to the negative control, especially with the *D. bruxel-lensis* probe combination and non-specific yeasts, which can probably be attributed to increased binding due to the composition of this probe combination.

The Flow-FISH assay is also reliable in mixtures of different yeast species and up to a cell count of 10³ cells/ml in the initial fermentation. This detection limit is also achieved by other methods in molecular biology for yeast detection. In contrast to most of these methods, Flow-FISH can also quantify the number of yeasts present. Additionally the use of the flow cytometer offers a simple variant to determine the total cell count of all yeasts in the fermentation. The detection limit of Flow-FISH allows detection before the damage threshold values of the yeasts examined are reached.

The Flow-FISH method presented in this dissertation can also be applied to other yeast strains, some of which also originate from wild isolates. A transferability to native fermentations from oenological practice is given. It was possible to examine both spontaneous fermentations and inoculated fermentations in practice fermentations in steel tanks for their yeast population composition and to follow their development in the course of fermentation.

Due to the use of flow cytometry and the helper probes and negative control used in this dissertation, the optimised Flow-FISH assay offers a stable basis for the continued development of a test system for use in oenological practice.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist im Rahmen des FEI-Projektes "Vermeidung von Gärstörungen in Wein und Sekt durch frühzeitige Erkennung mit Hilfe der Flusszytometrie, AiF16623N" als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Dienstleistungszentrum ländlicher Raum (DLR Rheinpfalz) in Neustadt a.d. Weinstraße entstanden. Ich bedanke bei allen Beteiligten mich für die Bereitstellung der Fördermittel für mein Projekt.

Ganz besonders danke ich meiner Doktormutter Prof. Dr. Maren Scharfenberger-Schmeer, welche mich während meiner Arbeit betreut und unterstützt hat. Ich bedanke mich sehr für die immerwährende Unterstützung, konstruktive Diskussionen, Geduld und besonders für die Freiräume für eigene Entscheidungen und Ideen.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Ralf Kölling-Paternoga für die Übernahme des Amtes des Mitbetreuers. Vielen Dank für die stets vertrauensvolle Unterstützung, den fachlichen Austausch und den gewährten Freiraum bei meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Prof. Dr. Jochen Bogs möchte ich für die Übernahme des Amtes des Drittprüfers danken.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Stephan Sommer für die initiale Projektidee und die fachliche Unterstützung.

Des Weiteren danke ich Kimmo Sirén, Roxana Tudorie und Sascha Wolz für die Bereitstellung der Praxisproben.

Meine Arbeit wäre ohne die Unterstützung vieler MitarbeiterInnen des Weincampus Neustadt, des DLR Rheinpfalz und des Staatsweingutes, allen voran der Arbeitsgruppe Weinmikrobiologie, nicht realisierbar gewesen. Ich möchte allen danken, die mich während meiner Arbeit unterstützt haben. Ein herzlicher Dank geht hierbei allen voran an Jutta Kramm für ihre stete Hilfe und gute kollegiale Zusammenarbeit. Auch Christian Vogelei möchte ich herzlich für die Mitarbeit an meinem Thema im Rahmen seiner Masterarbeit und die auch danach noch stets

konstruktiven Ideen und fachlichen Diskussionen danken. Ohne euch beide wäre es manches Mal um einiges schwieriger gewesen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie, allen voran meinem Mann und meiner Tochter bedanken. Danke für eure stete Unterstützung, Motivation und Geduld. Ohne euch wäre ich nicht soweit gekommen.

Abkürzungsverzeichnis

PNA engl.: Peptid nucleic acid; Peptidnukleinsäure

ATP Adenosintriphosphat

AWRI Australian Wine Research Institute

Dbrux spezifisch an *D. bruxellensis* bindende 26S-rRNA-Sonde

DSM siehe DSMZ

DSMZ Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zell-

kulturen GmbH, Braunschweig

Euk516 an Eukaryonten bindende 18S-rRNA-Sonde (Amann et al. 1990)

FACS Fluorescent absorbing cell sorting

FCS-Datei Flow Cytometry Standard

FISH Fluoreszenz in situ Hybridisierung

FL1-4 Fluoreszenzdetektoren

Flow-FISH Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit Detektion durch Flusszyto-

metrie

FSC Vorwärtsstreulicht; engl.: forward scatter

FTIR Fourier-transform Infrarot Spektroskopie

GTP Guanosintriphosphat

Huv spezifisch an *H. uvarum* bindende 26S-rRNA-Sonde

Non-Euk516 komplementäre Sonde zu Euk516, bindet nicht an Eukaryonten

(Kosse et al. 1997)

NTU nephelometric turbidity units

OD Optische Dichte

Pan spezifisch an *P. anomala* bindende 26S-rRNA-Sonde

PBS engl.: *Phosphatbuffered saline*; phosphatgepufferte Salzlösung

RFLP Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

rpm engl.: rounds per minute; Umdrehungen pro Minute

Sce spezifisch an *S. cerevisiae* bindende 26S-rRNA-Sonde

SSC Seitwärtsstreulicht; engl.: sideward scatter

VBNC Viable but not culturable / lebensfähig aber nicht kultivierbar

YPD-Medium engl.: Yeast Pepton Dextrose Medium

Inhaltsverzeichnis

Zu	ısamı	menfas	sung	I
ΑŁ	ostrac	et		٧
Da	anksa	gung		VII
ΑŁ	okürz	ungsve	erzeichnis	IX
Inl	halts	verzeic	hnis	ΧI
ΑŁ	bildu	ıngsve	rzeichnis	χV
Та	belle	nverze	ichnis	XIX
1.	Einl	eitung		1
	1.1.	Mikrob	piologie der Weingärung	1
		1.1.1.	Ablauf der Weinfermentation	1
	1.2.	Hefen		9
		1.2.1.	Zusammensetzung der Hefeflora vor Fermentationsbeginn	9
		1.2.2.	Sacharomyces cerevisiae	10
		1.2.3.	Schadhefen	10
	1.3.	Metho	den zur Detektion von (Schad)hefen	15
		1.3.1.	Ausplattieren auf selektiven Medien	16
		1.3.2.	Indirekte, kulturabhängige Nachweismethoden	17
		1.3.3.	Direkte, kulturunabhängige Nachweismethoden	19
		1.3.4.	Optische Methoden	20
	1.4.	Schad	hefendetektion mittels Flow-FISH	20
		1.4.1.	Historie der FISH	21
		1.4.2.	Fixiermethoden	22
		1.4.3.	Hybridisierungssonden	23

		1.4.4.	Abhängigkeit der Hybridisierbarkeit der Zellen vom Riboso-	
			mengehalt	26
		1.4.5.	Hilfssonden und andere Fluoreszenzverstärker	27
		1.4.6.	Flow-FISH	28
	1.5.	Flussz	rytometrie	29
		1.5.1.	Ablauf einer flusszytometrischen Messung	29
		1.5.2.	Fluorochrome und Fluoreszenzmessung	35
		1.5.3.	Auswertung der Daten	39
		1.5.4.	Auswertung einer Flow-FISH in der Literatur	42
	1.6.	Zielset	tzung	43
2.	Mate	erial un	nd Methoden	45
	2.1.	Geräte	9	45
		2.1.1.	Flusszytometer	45
		2.1.2.	Spektralphotometer	45
		2.1.3.	Weitere Geräte und Materialien	46
	2.2.	Chemi	ikalien	47
	2.3.	Puffer	und Lösungen	49
		2.3.1.	PBS-Puffer	49
		2.3.2.	YPD-Flüssigmedium	49
		2.3.3.	20 % Formaldehydlösung	49
		2.3.4.	Hybridisierungspuffer	49
		2.3.5.	Waschpuffer	50
	2.4.	Fluore	szenz in situ Hybridisierung	50
		2.4.1.	Verwendete Hefestämme	50
		2.4.2.	Probenvorbereitung / Zellkulturen	51
		2.4.3.	Zellfixierung	52
		2.4.4.	Detektion von Schadhefen mittels flusszytometerbasierter	
			Fluoreszenz in situ Hybridisierung (Flow-FISH)	54
3.	Erge	ebnisse	9	61
	3.1.	Optimi	ierung der Hybridisierungsbedingungen	61
		3.1.1.	Negativkontrolle	61
		3.1.2.	Optimierung von Temperatur, Sondenkonzentration und In-	
			kubationsdauer der Hybridisierung	62

		3.1.3.	Optimierung der SDS-Konzentration des Hybridisierungs-	
			puffers	66
		3.1.4.	Optimierung der Fixierungsmethode	67
	3.2.	Erhöhı	ung der Fluoreszenzintensität durch Hilfssonden	72
		3.2.1.	Erstellung der Hilfssonden	72
		3.2.2.	Hilfssondeneinsatz bei H. uvarum	75
		3.2.3.	Hilfssondeneinsatz bei <i>S. cerevisiae</i>	75
		3.2.4.	Hilfssondeneinsatz bei P. anomala und D. bruxellensis	81
	3.3.	Einflus	ss der Wachstumsphase auf die Hybridisierungseffizienz	83
		3.3.1.	Einfluss der Wachstumsphase auf die Hybridisierungseffi-	
			zienz von <i>H. uvarum</i>	85
		3.3.2.	Wachstumsverhalten von S. cerevisiae	91
		3.3.3.	Effekt der Hilfssonden auf den Nachweis der Hefen in ver-	
			schiedenen Wachstumsphasen	91
	3.4.	Fremd	sonden / Kreuzreaktivität	96
	3.5.	Minde	stzellzahl für einen erfolgreichen FISH-Assay	100
		3.5.1.	Mindestzellzahl <i>H. uvarum</i>	100
		3.5.2.	Mindestzellzahl <i>S. cerevisiae</i>	101
	3.6.	FISH i	n Mischungen / Wiederfindung	101
	3.7.	FISH r	mit verschiedenen Hefestämmen	108
	3.8.	Praxis	proben	110
4.	Disk	ussion	1	119
	4.1.	Optimi	ierung der Hybridisierungsbedingungen	119
		4.1.1.	Negativkontrolle	119
		4.1.2.	Optimierung von Temperatur, Sondenkonzentration, Inku-	
			bationsdauer der Hybridisierung und der SDS-Konzentration	
			des Hybridisierungspuffers	120
		4.1.3.	Optimierung der Fixiermethode	123
	4.2.	Erhöhı	ung der Fluoreszenzintensität durch Hilfssonden	125
	4.3.	Einflus	ss der Wachstumsphase auf die Hybridisierungseffizienz	127
	4.4.	Fremd	sonden / Kreuzreaktivität	129
	4.5.	Minde	stzellzahl für einen erfolgreichen FISH-Assay	135
	4.6.	FISH i	n Mischungen / Wiederfindung	136
	4.7	FISH r	nit verschiedenen Hefestämmen	138

	4.8.	Praxis	oroben	139
5.	Sch	lussbet	rachtung und Ausblick	143
Lit	eratu	ırverze	ichnis	147
Α.	Anh	ang		167
	A.1.	Versuc	hsdaten	167
		A.1.1.	Negativkontrolle	167
		A.1.2.	Optimierung der Hybridisierungsbedingungen	168
		A.1.3.	Optimierung der Fixierungsmethode	170
		A.1.4.	Einsatz von Hilfssonden	172
		A.1.5.	Einfluss der Wachstumsphase auf die Hybridisierungseffi-	
			zienz	174
		A.1.6.	Fremdsonden / Kreuzreaktivität	187
		A.1.7.	Mindestzellzahl für einen erfolgreichen FISH-Assay	188
		A.1.8.	FISH in Mischungen	189
		A.1.9.	FISH mit verschiedenen Hefestämmen	190
		A.1.10	.Praxisproben	191

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Glykolyse und alkoholische Gärung	4
1.2.	Mikroskopische Abbildung des H. uvarum-Stamms DSM 26650 .	11
1.3.	Mikroskopische Abbildung zweier verschiedener D. bruxellensis-	
	Stämme	14
1.4.	Hydrodynamische Fokussierung in der Messküvette	30
1.5.	Schematisch vereinfachter Strahlengang des 488nm Lasers eines	
	Flusszytometers am Beispiel eines PARTEC SYSMEX CUBE 6	31
1.6.	Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC)	32
1.7.	Darstellung einer Messung als Dichtegradient beziehungsweise	
	Dot-Plot	33
1.8.	Histogrammplot von FL1 einer Messung von FITC-gefärbten Hefe-	
	zellen	34
1.9.	Gating einer Hefepopulation im FSC/SSC-Plot und Darstellung	
	des Gates im FL1-Histogramm	34
1.10.	Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Zahl der gebun-	
	denen Fluorochrommoleküle	36
1.11.	Struktur von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	37
1.12.	Emissionsspektren drei häufig verwendeter Fluorochrome	38
1.13.	Setzen eines Markers zur Auswertung flusszytometrischer Daten	
	am Beispiel einer Flow-FISH-Analyse	40
1.14.	Auswertung einer Flow-FISH-Analyse nach Markierung der hells-	
	ten 2% der Negativkontrolle	41
1.15.	Auswertung einer Flow-FISH-Analyse mittels Overton-Substraktion	42
2.1.	Schematischer Arbeitsablauf zur Durchführung eines FISH-Assays	54
3.1.	Prozentuale Anteile der hybridisierten Zellen von H. uvarum nach	
	Berücksichtigung des FITC-induzierten Hintergrundrauschens	62

3.2.	Auswirkung der Hybridisierungstemperatur, Sondenkonzentration und Hybridisierungsdauer auf den Anteil mit Huv-Sonde hybridisierter Zellen von <i>H. uvarum</i>	64
3.3.	Abhängigkeit von der Hybridisierungsdauer bei der Hybridisierung von <i>H. uvarum</i>	65
3.4.	Abhängigkeit von der SDS-Konzentration bei der Hybridisierung von <i>H. uvarum</i>	67
3.5.	Auswirkung von Änderungen der Fixierzeit auf die Hybridisierung von <i>H. uvarum</i> in 4 % Formaldehyd fixiert	68
3.6.	Auswirkung der Fixiermethode auf die Hybridisierung von <i>H. uva-rum</i>	69
3.7.	Auswirkung der Fixiermethode auf die Hybridisierung von <i>S. cerevisiae</i>	69
3.8.	Auswirkung der Fixiermethode auf die Hybridisierung von <i>S. ce-revisiae</i> - Histogramme der FITC-Fluoreszenz	70
3.9.	Auswirkung der Fixiermethode auf die Hybridisierung von <i>S. ce-revisiae</i> - SSC-FSC-Plots	71
3.10.	Lage der Binderegionen der Sonden auf der 26SrRNA von <i>H. uvarum</i>	73
3.11.	Lage der Binderegionen der Sonden auf der 26SrRNA von <i>S. cerevisiae</i>	74
3.12.		76
3.13.		77
3.14.		78
3.15.	Anzahl hybridisierter Zellen [%] bei Verwendung der verschiedenen Hilfssonden bei <i>H. uvarum</i> (Teil2)	79
3.16.	Effekt der Hilfssonden bei <i>S. cerevisiae</i>	80
3.17.	Effekt der Hilfssonden bei <i>Pichia anomala</i>	82
3.18.	Effekt der Hilfssonden bei <i>Dekkera bruxellensis</i> (AWRI 1499)	84
3.19.	Wachstumskurve von <i>H. uvarum</i> (DSM 26650) in Chardonnay- most (oben) und YPD-Medium (unten)	86

3.20.	Einfluss der Wachstumsphase von <i>H. uvarum</i> (DSM 26650) zum Zeitpunkt der Fixierung auf die Hybridisierungseffizienz	87
0.01		07
3.21.	Wachstumskurven verschiedener <i>H. uvarum</i> -Stämme in YPD-Flüssigkultur	89
3.22.	Einfluss der Wachstumsphase von H. uvarum (DSM 26650) zum	
	Zeitpunkt der Fixierung auf die Hybridisierungseffizienz in YPD-	
	Medium	90
3.23.	Wachstumskurven von <i>S. cerevisiae</i> (DSM 70416) in YPD-Flüssigkultur	92
3.24.	Effekt der Hilfssonden im Verlauf des Kulturwachstums in YPD-	
	Medium bei <i>H. uvarum</i>	94
3.25.	Effekt der Hilfssonden im Verlauf des Kulturwachstums bei P. an-	
	omala	95
3.26.	Effekt der Hilfssonden im Verlauf des Kulturwachstums bei D. bru-	
	xellensis	95
3.27.	H. uvarum mit spezifischen und unspezifischen Sonden	96
3.28.	S. cerevisiae mit spezifischen und unspezifischen Sonden	97
3.29.	H. uvarum mit spezifischen und unspezifischen Sonden - Histo-	
	gramme der FL1-Fluoreszenz	98
3.30.	S. cerevisiae mit spezifischen und unspezifischen Sonden - Hi-	
	stogramme der FL1-Fluoreszenz	99
3.31.	,	
	ausgehend von der üblicherweise verwendeten Zellzahl von 2*10 ⁶	404
	Zellen pro Ansatzgefäss	101
3.32.	Hybridisierte <i>S. cerevisiae</i> -Zellen in verschiedenen Verdünnun-	
	gen ausgehend von der üblicherweise verwendeten Zellzahl von 2*10 ⁶ Zellen pro Ansatzgefäss	102
3.33.	Hybridisierte Zellen in verschiedenen Mischungen aus H. uvarum	
	und <i>S. cerevisiae</i> bei Verwendung von 2*10 ⁶ Zellen je Ansatzge-	
	fäss und der Sondenkombination HuvH1H2L	104
3.34.	Lineare Auftragung gemessener zum Anteil vorhandener Huv-	
	Zellen in Mischungen aus H. uvarum und S. cerevisiae bei Ver-	
	wendung von 2*10 ⁶ Zellen je Ansatzgefäss und der Sondenkom-	
	bination HuvH1H2L	104

3.35.	Histogramme der FITC-Fuoreszenz mit Overton-Substraktion in	
	verschiedenen Mischungen aus H. uvarum und S. cerevisiae bei	
	Verwendung von 2∗10 ⁶ Zellen je Ansatzgefäss und der Sonden-	
	kombination HuvH1H2L:	105
3.36.	Hybridisierte Zellen in verschiedenen Mischungen aus H. uvarum	
	und S. cerevisiae bei Verwendung von 2*10 ⁴ Zellen je Ansatzge-	
	fäss und der Sondenkombination HuvH1H2L	106
3.37.	Lineare Auftragung gemessener zum Anteil vorhandener Huv-	
	Zellen in verschiedenen Mischungen aus H. uvarum und S. cere-	
	visiae bei Verwendung von 2∗10 ⁴ Zellen je Ansatzgefäss und der	
	Sondenkombination HuvH1H2L	106
3.38.	Hybridisierte Zellen in verschiedenen Mischungen aus H. uva-	
	rum, S. cerevisiae und P. anomala	107
3.39.	Verschiedene Stämme von H. uvarum und ihre Hybridisierbarkeit	
	mittels FISH	109
3.40.	Verschiedene Stämme von S. cerevisiae und ihre Hybridisierbar-	
	keit mittels FISH	110
3.41.	Proben aus Spontangärungen 1. Variante	111
3.42.	Proben aus Spontangärungen 2. Variante	112
3.43.	Proben aus Spontangärungen 3. Variante	112
3.44.	Proben aus Spontangärungen 4. Variante	113
3.45.	Proben aus Spontangärungen 5. Variante	114
3.46.	Proben aus Spontangärungen Zellen/ml in der Gärung	114
3.47.	Proben aus mit S .cerevisiae angeimpften Fermentationen aus	
	dem Staatsweingut; Tank 16 Riesling	116
3.48.	Proben aus mit S. cerevisiae angeimpften Fermentationen aus	
	dem Staatsweingut; Tank 71 Silvaner	116
3.49.	Proben aus 1. Spontanfermentation aus Geisenheim nach Fixie-	
	rung in 70%-igem Ethanol	118
3.50.	Proben aus 2. Spontanfermentation aus Geisenheim nach Fixie-	
	rung in 70%-igem Ethanol	118

Tabellenverzeichnis

1.1.	Wellenlängenbereiche der im CUBE 6 installierten Bandpassfilter .	31
2.1.	Weitere verwendete Geräte	46
2.3.	Verwendete Materialien	47
2.4.	Verwendete Chemikalien	48
2.6.	Verwendete Hefestämme	51
2.7.	Verwendete hefespezische DNA-Sonden	55
2.8.	Basensequenzen der Hilfssonden für die Flow-FISH-Detektion von	
	H. uvarum	56
2.9.	Basensequenzen der Hilfssonden für die Flow-FISH-Detektion von	
	S. cerevisiae	57
2.10	.Basensequenzen der Hilfssonden für die Flow-FISH-Detektion von	
	D. bruxellensis	57
2.11	.Basensequenzen der Hilfssonden für die Flow-FISH-Detektion von	
	P. anomala	57

1. Einleitung

Mit Hilfe dieser Arbeit soll eine einfache praxisnahe flusszytometrische Methode entwickelt werden, mit deren Hilfe erwünschte und unerwünschte Hefespezies während des Fermentationverlaufes nachgewiesen werden können. Als Basis dienen hierbei Fluoreszenz in situ Hybridisierungen (FISH) mittels fluoreszenzmarkierter rRNA-Sonden.

1.1. Mikrobiologie der Weingärung

Die Bedingungen der Weinfermentation beispielsweise der hohe Zuckergehalt, der niedrige pH-Wert, anaerobe Bedingungen und das Vorliegen phenolischer Komponenten bieten eine ideale Umgebung für eine Vielzahl von Mikroorganismen, allen voran den für die Fermentation verantwortlichen Hefen (Bisson u. Joseph, 2009). Diese bauen den Zucker des Mostes ab und produzieren damit Ethanol und Aromastoffe, welche den späteren Charakter des Weines ausmachen.

1.1.1. Ablauf der Weinfermentation

Nach Lese der Trauben und Pressung des Mostes, mit eventuellem Klären und Schönen, folgt der Prozess der alkoholischen Fermentation, der zum gewünschten Produkt Wein führt.

1.1.1.1. Möglichkeiten zum Fermentationsstart

Es gibt viele verschiedene Möglichkeiten eine alkoholische Fermentation (siehe Kapitel 1.1.1.2) einzuleiten. Heutzutage wird der Most meist mit speziell für die

Traubenmostfermentation gezüchteten Hefestämmen inokuliert, um die Fermentation zu starten. Aber auch die klassische Variante der Spontanfermentation, das Warten bis der Most auf Grund nativ vorkommender Hefestämme mit der Fermentation beginnt, gewinnt wieder zunehmend an Beliebtheit.

Inokulierung mit Reinzuchthefen Bei einer inokulierten Fermentation werden Reinzuchthefen dem Most zum Start der Fermentation hinzugefügt. Hierzu werden von der Industrie verschiedene Hefestämme gezüchtet und zum Kauf angeboten. Üblicherweise werden die Hefen, nach Anzucht im Fermenter, getrocknet und kommen in Vakuumverpackungen zum Winzer. Meist handelt es sich bei diesen sogenannten Reinzuchthefen um Stämme von Sacharomyces cerevisiae (siehe Kapitel 1.2.2). Vor der Inokulation müssen Trockenreinzuchthefen rehydriert werden. In Folge bieten sie einen recht sicheren Fermentationsstart. Verunreinigungen durch wilde Hefen beziehungsweise Bakterien können vorkommen, in geringer Zellzahl unter eine Zelle pro 10⁶ Gesamtzellen, so dass der Erfolg der Fermentation dadurch üblicherweise nicht in Gefahr gerät. Es besteht die Möglichkeit, auf Grund der Zusammensetzung des Mostes und der gewünschten aromatischen und charakteristischen Ausprägung des Endproduktes, die für diesen Zweck am Besten geeignete Reinzuchthefe zu wählen. Die Inokulierung erfolgt mit einer vordefinierten Zellzahl. So kann sichergestellt werden, dass die Fermentation von dem inokulierten Hefestamm dominiert wird und die Fermentation abläuft, bis der gewünschte Restzuckergehalt beziehungsweise Alkoholgehalt erreicht ist. Gelegentlich kann es aber auch bei einer Fermentation mit Reinzuchthefen zu Gärstörungen (siehe Kapitel 1.1.1.4) beziehungsweise Verunreinigungen durch Schadhefen kommen (siehe Kapitel 1.2.3).

Spontanfermentationen Diese ursprüngliche und schon in vorindustrieller Zeit angewandte Methodik der Weinbereitung beruht auf einem spontanen Beginn der Fermentation ohne vorhergehende Inokulation mit speziellen Hefestämmen. Hierbei wird darauf vertraut, dass die auf den Beeren und im Keller wild vorkommenden, und so in den Most eingetragenen Hefespezies, die Fermentation durchführen. Meist dominieren zu Beginn Nicht-Saccharomyceten die Fermentation (siehe auch Kapitel 1.2.1). Üblicherweise handelt es sich dabei hauptsächlich um *Hanseniaspora uvarum* und auch *Metschnikowia pulcherrima* (Fleet et al., 1984;

Schuetz u. Gafner, 1993a), die bereits zu einem großen Anteil auf den Beeren vorkommen (siehe Kapitel 1.2.1 und 1.2.3.1). Nach Erreichen eines bestimmten Alkoholgehaltes von 2 bis etwa 4 vol % übernimmt die *Sacharomyces cerevisiae*-Population die Fermentation, während der Gehalt an Nicht-Saccharomyceten abnimmt (Dittrich u. Grossmann, 2010). Während der Haupt- und Endgärphase wird die Fermentation meist von *S. cerevisiae* dominiert.

Durch die Vielzahl der vorhandenen und auch an der Fermentation beteiligten Hefearten, kann es zur vermehrten Bildung von Fehltönen und dem Auftreten von Gärproblemen kommen (siehe Kapitel 1.1.1.4).

1.1.1.2. Zuckerabbau

Hefen können, in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Sauerstoff, Zucker auf zwei verschiedenen Stoffwechselwegen abbauen: alkoholische Gärung und Atmung. Beide Wege beginnen mit der sogenannten Glykolyse, dem Abbau von Glukose zu Pyruvat. Der Glykolyse folgen Atmung beziehungsweise Gärung. Während der Weinbereitung verarbeiten die im Most befindlichen beziehungsweise zugegebenen Hefen, bei denen es sich zumeist um Saccharomyceten handelt, den im Most vorhanden Zucker im Rahmen einer alkoholischen Gärung zu Ethanol. Außer Ethanol entstehen beim Zuckerabbau durch die alkoholische Fermentation je Glukosemolekül zwei Kohlendioxidmoleküle und Energie in Form von zwei Adenosintriphosphatmolekülen (ATP).

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2$$

Des Weiteren entstehen während der Fermentation neben Ethanol diverse weitere Aromastoffe, die den späteren Charakter des Weines ausmachen.

Nachdem Glukose unter Verbrauch von zwei ATP in mehreren Schritten zu Fruktose1.6-biphosphat umgewandelt wurde, wird dieses mit Hilfe von Aldolase in Dihydroxyacetonphosphat und Glyceraldehyd-3-phosphat aufgespalten. Glyceraldehyd-3phosphat wird unter NADH+H+-Bildung zu 1,3-Biphosphoglycerat umgesetzt. Unter
ATP-Bildung wird daraus 3-Phosphogylcerat, welches durch Umlagerung der Phosphatgruppe zu 2-Phosphoglycerat umgewandelt wird. Unter Freisetzung von Wasser entsteht Phosphoenolpyruvat. Pyruvatkinase wandelt dieses unter Bildung
von ATP zu Pyruvat um (Abb. 1.1).

Nach diesen Schritten der Glykolyse folgt unter anaeroben Bedingungen die alkoholische Gärung. Pyruvat wird durch die Pyruvatdecarboxylase decarboxiliert. Dabei wird Kohlendioxid freigesetzt. Das aus Pyruvat entstehende Acetaldehyd wird durch Alkoholdehydrogenase unter NADH+H⁺-Verbrauch zu Ethanol umgewandelt (Abb. 1.1).

Abbildung 1.1.: Glykolyse und alkoholische Gärung: Verlauf der Glykolyse und der alkoholischen Gärung bei Hefen (adaptiert von Ribereau-Gayon et al., 2006, S. 56)

Liegt ausreichend Sauerstoff im Most vor, kann der Stoffwechsel der Hefen dem Weg der aeroben Atmung folgen. Hierbei wird wesentlich mehr Energie als bei der alkoholischen Gärung, nämlich 36 ATP und 2 GTP, gebildet. Bei der Respiration entstehen aus einem Glukosemolekül und jeweils sechs Wasser- und Sauerstoffmolekülen sechs Kohlendioxidmoleküle und zwölf Wassermoleküle.

$$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 12H_2O$$

Ob der Zuckerabbau mittels Fermentation oder mittels Respiration stattfindet, wird durch den Pasteur- und den Crabtree-Effekt reguliert. Der Pasteur-Effekt besagt, dass in Gegenwart von Sauerstoff Respiration stattfindet. Bei Hefen tritt dieser Effekt nur eingeschränkt auf. Stattdessen nutzen Hefen den Crabtree-Effekt. Dieser besagt, dass Hefen bei Vorliegen höherer Glukosekonzentrationen auch unter aeroben Bedingungen den Stoffwechselweg der Fermentation wählen, und somit Ethanol gebildet wird (Crabtree, 1929).

1.1.1.3. Hefevermehrung während der Fermentation

Eine Fermentation läuft im Großen und Ganzen immer nach demselben Schema ab. Zu Beginn der Fermentation befinden sich die Hefezellen in der sogenannten Latenzphase, in welcher ihre Vermehrung beginnt. Nach kurzer Zeit ist das Medium bereits anaerob. Durch den hohen Zuckergehalt sind die osmotischen Bedingungen dann für die Hefevermehrung suboptimal. Die Notwendigkeit der Anlaufphase ist hauptsächlich in der Anpassung an diese im Most vorherrschenden Bedingungen begründet. Nach wenigen Stunden beginnt die exponentielle Phase der Hefevermehrung, bis die Zelldichte in etwa 50*10⁶ bis 100*10⁶ Zellen/ml beträgt. Die Fermentation beginnt schon während der exponentiellen Phase. Fermentation liefert den Hefezellen nicht ausreichend Energie zur Vermehrung. Aus diesen und weiteren Gründen wie Ethanoltoxizität, Nährstoffmangel und sinkenden Transportkapazitäten der Zellen (Rodicio u. Heinisch, 2009), stagniert die Hefepopulation auf einem gewissen Level, die Hauptfermentation beginnt. In der stationären Phase, die durch die Zunahme hefeschädigender Metabolite, allen voran die Zunahme des Ethanolgehaltes, und zunehmenden Stress geprägt ist, sterben immer mehr Hefezellen ab. Die Population befindet sich zunehmend in der Absterbephase. Die Hefezellen sedimentieren und autolysieren. (Beschreibung Fermentationsablauf siehe Dittrich u. Grossmann, 2010)

1.1.1.4. Gärstörungen

Damit eine Weinfermentation als komplett abgeschlossen gilt, sollte sie einen Restzuckergehalt von weniger als 2-4g/l Wein erreicht haben (Alexandre u. Charpentier, 1998). Aus diversen Gründen wird dieser Restzuckergehalt nicht bei

jeder Fermentation erreicht. Es kommt zu stockenden oder verlangsamten Fermentationen, welche man verallgemeinernd als Gärstörungen bezeichnet. Man kann problematische Fermentationen grob in vier Kategorien aufteilen: Erstens in verlangsamt beginnende Fermentationen, die eventuell wieder normale Fermentationsgeschwindigkeit erreichen; zweitens in verlangsamt beginnende Fermentationen, deren Fermentationsrate auf niedrigem Level verbleibt; drittens in normal beginnende Fermentationen, welche im Verlauf verlangsamen und viertens in normal verlaufende Fermentationen, welche abrupt abstoppen (Bisson u. Butzke, 2000). Gärstörungen werden in der Literatur auf verschiedene Faktoren zurückgeführt. Meist liegt eine Kombination aus mehreren Faktoren vor.

Unter anderem führt ein zu hoher Zuckergehalt im Ausgangsmost zu einer Gärstörung (eigene Versuche, Lafon-Lafourcade et al., 1979). Dies ist auf das übliche Wachstumsverhalten der Hefen zurückzuführen. Bei einem normalen Zuckergehalt des Ausgangsmostes von unter 200 g/l ist die Fermentation recht schnell, während der exponentiellen und der quasistätionären Wachstumsphase der Hefezellen, abgeschlossen (siehe Kapitel 1.1.1.3). Bei einem erhöhten Zuckergehalt im Ausgangsmost müssen die Hefen auch noch in der stationären Phase abfallenden Wachstums Zucker fermentieren. (Lafon-Lafourcade et al., 1979) Fehlen in dieser Phase Überlebensfaktoren wie Sterole, welche in das Cytoplasma der Hefen eingelagert werden, und somit für eine erhöhte Ethanoltoleranz sorgen (Aguilera et al., 2006; Thomas et al., 1978), wird die metabolische Aktivität der Hefen gehemmt oder kommt ganz zum Erliegen (Lafon-Lafourcade et al., 1979). Es verbleibt ein Restzuckergehalt im Wein, was meist mit einer Gärstörung assoziiert wird. Schuetz u. Gafner (1993b) führen Gärstörungen auf ein zu niedriges Glukose-/Fruktoseverhältnis zurück. Vor Beginn der Fermentation ist das Verhältnis von Glukose zu Fruktose im Most nahezu gleich. Da die meisten Weinhefen Glukose besser als Fruktose verwerten können, nimmt dieses Verhältnis nicht gleichmässig ab. Gegen Ende der Fermentation liegt das Glukose zu Fruktoseverhätnis in etwa bei 0,1. Bei auf Grund von Gärstörungen gestoppten Fermentationen liegt dieser Wert deutlich darunter (Schuetz u. Gafner, 1993b). Auch die Ethanolempfindlichkeit der Hefezellen ist bei erhöhten Zuckergehalt erhöht, was im Umkehrschluss heißt, je höher der Zuckergehalt des Mediums, umso eher kommt es zu Gärstörungen (Casey u. Ingledew, 1986).

Auch unter Sauerstoff- (Ingledew u. Kunkee, 1985), Vitamin- (Ough et al., 1989) oder Stickstoffmangel (Agenbach, 1977; Blateyron u. Sablayrolles, 2001; Ingle-

dew u. Kunkee, 1985; Salmon, 1989) kann die Fermentation zum Erliegen kommen. Unter anaeroben Bedingungen fehlt, wie Ingledew u. Kunkee (1985) zeigen, Sauerstoff für die Bereitstellung von Zellmembrankomponenten, nicht aber unbedingt für die Zellatmung. Stehen genügend Überlebensfaktoren (siehe Lafon-Lafourcade et al., 1979) zur Verfügung, verläuft die Fermentation mit üblicher Geschwindigkeit (Ingledew u. Kunkee, 1985). Sauerstoff ist nur in der Phase aktiven Zellwachstums zu Beginn der Fermentation notwendig. Dort ist ein aerober Most bedeutsam, da nur so metabolisch verfügbarer Stickstoff verarbeitet werden kann (Ingledew u. Kunkee, 1985). Der Großteil der Metabolisierung von ammonischem Stickstoff findet zu Beginn der Fermentation statt, laut Salmon (1989) in den ersten 20 Stunden, unabhängig wieviel davon zur Verfügung steht (Salmon, 1989). Steht nicht ausreichend metabolisch verfügbarer Stickstoff zur Verfügung, kommt es zur irreversiblen Inaktivierung der Glukosetransporter, was zu einer Fermentationsstörung führt (Salmon, 1989). Ein Überdecken des Mostes mit Kohlendioxid oder molekularem Stickstoff sollte vermieden werden, da dies zu einem anaeroben Zustand zu Fermentationsbeginn und somit oft zu stockenden Fermentationen führt (Ingledew u. Kunkee, 1985).

Des Weiteren senkt ein zu hoher Ethanolgehalt die metabolische Aktivität der Hefen (Casey u. Ingledew, 1986), in dem intrazelluläre Enzyme inhibiert werden (Thomas et al., 1978), und beeinflusst somit den Verlauf der Fermentation. Die Abnahme der Gäraktivität ist dabei direkt proportional zum Ethanolgehalt, wie schon Rahn (1929) beschrieb. Die Ethanoltoleranz, die je nach Hefestamm unterschiedlich hoch ist, ist wahrscheinlich zum Teil auf die Fähigkeit eine unterschiedlich starke Barriere aus Sterolen aufzubauen, die den Ethanol an einem Eindringen in die Zelle hindert, zurückzuführen (Aguilera et al., 2006; Thomas et al., 1978).

Auch ein exzessives Klären des Ausgangsmostes kann zu Gärstörungen führen (Groat u. Ough, 1978). Das kritische Level in Most, unter welchem die Fermentation langsamer verläuft, liegt für unlösliche Substanzen, zum Beispiel Bentonit, zwischen 0,1 und 0,5% (v/v)(Groat u. Ough, 1978). Generell wird empfohlen, dass der NTU-Gehalt (Trubgehalt) des vorgeklärten Mostes zwischen 100 und 250 liegt. Ist der NTU-Gehalt niedriger, kann es zu einem Fermentationsstopp kommen, oberhalb dieses Wertebereiches besteht die Gefahr von unerwünschten Aromaveränderungen (Ribereau-Gayon, 1999). Die Hefen sinken in einem zu stark geklärten Most auf den Fermentationsbehälterboden ab und werden, gera-

de in großen Tanks, dort durch erhöhten Druck und erhöhte Kohlendioxidkonzentration in ihrer metabolischen Aktivität stark eingeschränkt (Lemperle, 2007). Des Weiteren kann es, vor allem in großen Gärtanks, zu einem Versieden des Weines kommen. Hier wird die optimale Temperatur zur Hefeentwicklung von 25 °C überschritten, so dass es zu einem Gärstopp kommt (Lemperle, 2007).

Durch nicht optimale Bedingungen für die meist inokulierte Hauptfermentationshefe S. cerevisiae können andere Hefen, die im Ausgangsmost in einer großen Vielzahl vorliegen können, einen Teil der Fermentation übernehmen (siehe auch Kapitel 1.2.3). In Folge dessen kommt es zu Fehltönen im Endprodukt oder stockenden Fermentationen. Vor allem bei Spontanfermentationen ist die Anzahl "wilder" nativer Hefen, meist Nicht-Saccharomyceten, hoch (siehe auch Kapitel 1.1.1.1 und Kapitel 1.2.1). Diese sorgen hier für ein Angären des Mostes, da in der natürlichen Hefeflora kaum Saccharomyces-Hefen vorliegen (siehe Kapitel 1.2.1). Die Ethanolproduktion der Nicht-Saccharomyceten ist eher gering (Clemente-Jimenez et al., 2004; Heard u. Fleet, 1988). Oberhalb eines Alkoholgehaltes von 4 vol % und unter zunehmend anareoben Bedingungen nimmt die Fermentationstätigkeit der Nicht-Saccharomyceten ab und die mittlerweile ausreichend vorhandenen Saccharomyces-Hefen übernehmen den restlichen Zuckerabbau (Ganga u. Martinez, 2004; Lemperle, 2007, S. 25f.). Zu diesem Zeitpunkt können im Wein bereits ungünstige Aromaverbindungen für das Endprodukt vorliegen.

Liegt eine hohe Konzentration von flüchtigen Säuren (van Rij, 2013) oder toxischen Fettsäuren (Viegas et al., 1989) vor, schränkt die Hauptfermentationshefe *S. cerevisiae* ihre metabolische Aktivität ein. Zu hohe Konzentrationen an flüchtigen Säuren werden hauptsächlich von sogenannten Schadhefen (siehe Kapitel 1.2.3), zum Beispiel *Brettanomyces, Hanseniaspora, Candida* und anderen produziert (van Rij, 2013). In dieser Arbeit soll eine Nachweismethode entwickelt werden, um eine Kontamination mit diesen häufig vorkommenden Schadhefen rechtzeitig zu erkennen. So kann frühzeitig einer Gärstörung entgegen gewirkt werden, bevor die Schadhefe die Fermentation negativ beeinflusst hat, und somit einem wirtschaftlichen Schaden des Winzers vorgebeugt werden.

1.2 Hefen Einleitung

1.2. Hefen

1.2.1. Zusammensetzung der Hefeflora vor Fermentationsbeginn

Im Most liegen diverse natürlich vorkommende Hefestämme vor. Diese können auf vielerlei Wegen in den Most gelangen. Schon auf der Haut der Beeren befinden sich viele verschiedene native Hefen (Clemente-Jimenez et al., 2004; Fleet, 2003, u. a.). Sie sitzen über Rissen in der Beerenoberfläche und am Fruchtpolster der Beerenstiele, da sie sich mittels des zuckerreichen Saftes mit Nährstoffen versorgen können. Auf der unverletzten Beerenoberfläche finden sich nur wenige einzelne Hefezellen. Werden die Beeren bei der Ernte verletzt und Saft tritt aus, können sich auch diese Hefezellen deutlich vermehren. Beim Pressen geraten die Hefezellen so in den Most. Auch durch Insekten, die durch den Saft verletzter Beeren angelockt werden, werden Hefen auf noch unverletzte Beeren übertragen. Durch Wespenfraß können die Hefen tief ins Beereninnere eindringen und sich dadurch optimal vermehren. So kann es bereits zum Angären der noch am Stock hängenden Beeren kommen. (Dittrich u. Grossmann, 2010)

Die Zusammensetzung und Größe der wilden Hefeflora ist von vielen Faktoren, unter anderem dem Gesundheitszustand der Trauben (s.o.), abhängig. Als Hauptvertreter ist hier *Hanseniaspora uvarum* zu nennen, die in einer Konzentration von über 90 % auf der Beerenhaut vorliegen kann (Dittrich u. Grossmann, 2010). Auch viele weitere wild vorkommende Hefen, zum Beispiel diverse *Candida*-Arten (vor allem *Candida stellata*), *Torulaspora delbrueckii, Metschnikowia sp.* und *Pichia sp.* können über die Traube in den Most gelangen (Dittrich u. Grossmann, 2010; Clemente-Jimenez et al., 2004; Schuetz u. Gafner, 1993a). Zu einem geringen Prozentsatz kommt auch *Saccharomyces cerevisiae* auf den Trauben vor (ungefähr 0,1–1 % laut Dittrich u. Grossmann, 2010).

Das quantitative Volumen der auf den Beeren vorkommenden Hefeflora unterscheidet sich klimabedingt. Dagegen wird die Zusammensetzung der Hefeflora weder durch Klimaunterschiede, Rebsorten, Bodenunterschiede oder weinbauliche Maßnahmen stark beeinflusst (Dittrich u. Grossmann, 2010). Schuetz u. Gafner (1994) hingegen zeigen eine Weinberg- und Jahrgangsabhängigkeit der Florenzusammensetzung. Unter *Botrytis*-Befall steigen die Zellzahlen der natürlichen Hefeflora stark an (Dittrich u. Grossmann, 2010).

Wieviele Hefearten und Zellen letztendlich während der Fermentation vorhanden sind, hängt stark von den Umgebungsparametern während der Weinbereitung ab (Bisson u. Joseph, 2009). Durch moderne Konservierungsmethoden, beispielsweise die Zugabe von Schwefeldioxid zum Traubenmost oder die Pasteurisierung, wird der Anteil an Nicht-Saccharomyceten im Most deutlich reduziert (Henick-Kling et al., 1998). Werden die nativen Hefen aus dem Most nicht reduziert, können diese unerwünschte Fehltöne produzieren. Gerade in der Anfangsphase der Fermentation ist die Gefahr hierfür hoch, da ihre Vermehrung noch nicht durch den Ethanolgehalt gehemmt wird (siehe Kapitel 1.1.1.1 und 1.1.1.4). Einem effektiven Nachweis dieser Schadhefen gerade zu Beginn einer Fermentation kommt somit eine große wirtschaftliche Bedeutung zu, da so Schäden am Endprodukt Wein vermieden werden können.

1.2.2. Sacharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae ist die für die Weinfermentation hauptverantwortliche Hefeart. Es handelt sich um runde bis ovale Zellen, welche meist einzeln oder in kleinen Sproßverbänden von zwei bis acht Zellen vorliegen (Schwann, 1837). Die Vermehrung erfolgt durch Sproßung oder Ascosporenbildung. Unter den anaeroben Bedingungen einer Fermentation tritt Ascosporenbildung so gut wie gar nicht auf (Dittrich u. Grossmann, 2010). S. cerevisiae kann Glukose, Saccharose, Maltose, Raffinose und Ethanol assimilieren. Nitrat und Pentosen kann S. cerevisiae nicht verwerten. (Fugelsang u. Edwards, 2007) S. cerevisiae verwertet Glukose schneller als andere Zuckerarten, zum Beispiel Fructose und ist somit glukophil (Moreira et al., 2008).

S. cerevisiae-Reinkulturen werden sehr häufig zum Inokulieren von Fermentationen verwendet (siehe Kapitel 1.1.1.1). Auch in Spontanfermentationen ist *S. cerevisiae* nach Fermentationsstart die am häufigsten vorkommende Hefespezies (siehe Kapitel 1.1.1.1).

1.2.3. Schadhefen

Als Schadhefen werden Hefegattungen aus dem Bereich der Nicht-Saccharomyceten bezeichnet, welche durch Bildung von zum Beispiel unerwünschten Aromastoffen oder flüchtigen Substanzen zu einer Schädigung des Weines führen

1.2 Hefen Einleitung

(siehe auch Kapitel 1.1.1.4).

Bei den meisten natürlich in Traubenmost vorkommenden Hefen handelt es sich um Nicht-Saccharomyceten, welche häufig als Schadhefen auftreten. Vor allem in Spontanfermentationen (siehe Kapitel 1.1.1.1) ist ihr Anteil auch nach Fermentationsbeginn hoch. Einige der bekanntesten und am meisten wirtschaftlichen Schaden verursachenden Vertreter wurden in dieser Arbeit versucht mittels Flow-FISH zu detektieren. Diese werden im Folgenden näher beschrieben. Des Weiteren gibt es noch viele weitere Hefearten, die als Schadhefen auftreten können.

1.2.3.1. Hanseniaspora uvarum / Kloeckera apiculata

Hanseniaspora uvarum gehört zu den Hefearten die apiculate, das heißt zitronenbeziehungsweise keulenförmige Zellen bilden, welche meist an einem oder beiden Polen zitronenförmig zugespitzt sind (siehe Abb. 1.2). Daneben kommen auch elliptische und ovale Zellen vor. Die Zellen sind deutlich kleiner als Sacharomyceten. Es handelt sich bei *H. uvarum* und *K. apiculata* um diesselbe Spezies,



Abbildung 1.2.: Mikroskopische Abbildung des H. uvarum-Stamms DSM 26650

die auf Grund ihrer Fähigkeit zur Sporenbildung in der älteren Nomenklatur mit einem speziellen Namen differenziert wurde. *Hanseniaspora uvarum* ist die teleomorphe Form, die auch zur Vermehrung Ascosporen bildet. Bei *Kloeckera apiculata* handelt es sich um die anamorphe Form, die heutzutage systematisch als *Hanseniaspora uvarum* eingeordnet wird. *Hanseniaspora uvarum* ist weit verbreitet und vermehrt sich auf verletzten Beeren massenhaft. Diese Art kann in einer Konzentration von über 90% auf der Beerenhaut vorliegen (Dittrich u. Grossmann, 2010) (siehe auch Kapitel 1.2.1). Bei einer Spontanfermentation gärt *H. uva-*

rum den Most an und hemmt die Vermehrung von *S. cerevisiae*. Möglicherweise geschieht diese Hemmung auf Grund der Bildung sogenannter Killerfaktoren, welche das Wachstum von *S. cerevisiae* inhibieren können (Radler et al., 1985). Erst ab einer Alkoholkonzentration von 2 bis maximal 4 vol % stellt *H. uvarum* ihree Fermentationstätigkeit ein, da das Gärsubstrat zunehmend anaerob wird, und die Fermentation wird von *S. cerevisiae* übernommen (*Dittrich u. Grossmann, 2010*) (siehe auch Kapitel 1.1.1.1). Auch wenn der Anteil von *H. uvarum* an der Hefepopulation während der Fermentation stark sinkt, können Zellen überleben und sich in unterschwefelten Weinen sogar in der Flasche vermehren (Dittrich u. Grossmann, 2010). *H. uvarum* fermentiert, von einigen fructophilen Stämmen abgesehen (Ciani u. Fatichenti, 1999), Glucose und Fructose gleich stark, kann aber keine Saccharose vergären (Dittrich u. Grossmann, 2010).

Erfolgt eine Fermentation mit Reinzuchthefen kann ein Einfluss von H. uvarum nahezu ausgeschlossen werden. Kontaminationen mit H. uvarum kommen aber auch dort vor (Schuetz u. Gafner, 1993a). In Spontanfermentationen ist eine Weinschädigung durch *H. uvarum* häufiger anzutreffen. Schuetz u. Gafner (1993a) stellen einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von H. uvarum in der ersten Fermentationsphase und einem Effekt von H. uvarum auf Geschmack und Aroma des fertigen Weines her. Dieser Effekt auf den Gesamteindruck des Weines kann recht deutlich ausfallen. H. uvarum bildet deutlich mehr Glycerin (Sponholz et al., 1990) und flüchtige Säure als S. cerevisiae (Dittrich u. Grossmann, 2010). Durch starke H. uvarum-Vermehrung kann es bei zu langen oder zu warmen Maischestandzeiten durch eine erhöhte Produktion von Essigsäureethylester zur Bildung eines Estertons kommen, welcher mit einem Geruch nach Nagellack beziehungsweise UHU einhergeht. (Dittrich u. Grossmann, 2010). Die Produktion von Isoamylacetat durch H. uvarum wird hingegen als positiv für den sensorischen Gesamteindruck eines Weines beschrieben (Moreira et al., 2008). Durch Temperaturkontrolle während der Lese und Pressung, die die Temperatur konstant unter 10 °C hält, kann eine Vermehrung von H. uvarum stark reduziert werden (Aust, 2007). Auch eine SO₂-Zugabe unterdrückt das Wachstum von H. uvarum, auf Grund der hohen SO₂-Empfindlichkeit, zuverlässig (Henick-Kling et al., 1998; Aust, 2007).

1.2 Hefen Einleitung

1.2.3.2. Dekkera / Brettanomyces

Dekkera/Brettanomyces finden sich bevorzugt in neuen Barriquefässern. Sie sind recht anspruchslos und können sich während des Ausbaus in Barriques auch noch ohne jegliche Zuckerreste im Wein vermehren (Lemperle, 2007), da sie Cellobiose (Freer, 1991) und den Holzzucker Xylose (da Silva et al., 2020) metabolisieren und so in den Poren der Holzfässer auch längere Zeit überleben. Aber auch auf Trauben, Mosten und Weinen können Dekkera/Brettanomyces nachgeweisen werden (Dittrich u. Grossmann, 2010; Aust, 2007). Sie beeinflussen stark die Weinqualität, indem sie zu spezifischen sensorischen Veränderungen beitragen. Diese können dazu führen, dass der Wein auf Grund starker sensorischer Fehler nicht mehr oder zu einem deutlich geringeren Preis vermarktbar ist. In geringen Ausprägungen kann ein Brettanomyces-Ton eine positive Auswirkung auf die sensorische Komplexität und den Charakter vor allem von Rotweinen haben (Fugelsang u. Edwards, 2007). Bei vermehrtem Auftreten von Brettanomyces lässt sich sensorisch ein teerartiger, pferdeschweißartiger Geruch beziehungsweise Geschmack feststellen, welcher durch flüchtige phenolische Stoffwechselprodukte verursacht wird (Lemperle, 2007). Es reichen schon eine recht geringe Anzahl an Brettanomyces-Zellen (10³ bis 10⁴ Zellen/ml) aus, um die Geruchs- und Geschmacksschwellenwerte dieses Fehltons zu überschreiten (Chatonnet et al., 1995). Des Weiteren bilden einige Stämme heterozyklische Verbindungen, welche den sogenannten Mäuselton verursachen (Lemperle, 2007). Die Essigsäurebildung in Form von flüchtiger Säure ist meist hoch (Dittrich u. Grossmann, 2010).

Brettanomyces ist in Ländern mit warmem Anbauklima weit verbreitet, kommt aber auch in Deutschland im Zuge der Klimaerwärmung immer häufiger vor. Eine Kartierungsarbeit von Roeder (2007) zeigt ein Vorkommen von Brettanomyces bei mehr als jedem sechsten untersuchten Weingut in Rheinhessen. Bei der Ernte wird Brettanomyces in den Keller eingebracht, wo sie sich vor allem in holzfassgelagerten Rotweinen vermehren und etablieren können (Roeder et al., 2007; Roeder, 2007).

Bei *Brettanomyces* handelt es sich um die anamorphe Form dieser Gattung, die sich asexuell vermehrt. *Dekkera* ist die teleomorphe und somit Ascosporen bildende Form, mit sexueller Vermehrung. Es handelt sich bei *Dekkera* und *Brettanomyces* phylogenetisch um diesselbe Gattung, die auf Grund ihrer Fähigkeit

zur Sporenbildung in der älteren Nomenklatur mit einem speziellen Gattungsnamen differenziert wird. Je nach Alter der Kultur und den jeweils vorliegenden Wachstumsbedingungen zeigt *Brettanomyces* eine variable Zellmorphologie. Üb-



Abbildung 1.3.: Mikroskopische Abbildung zweier verschiedener *D. bruxellensis*-Stämme: links DSM 70001 mit Pseuodomycel, rechts AWRI 1499 als Einzelzellen

licherweise werden Brettanomyces-Zellen als ogival oder bootsförmig beschrieben (Smith, 1998). Diese Form trifft man vor allem in älteren Kulturen an (siehe Abb. 1.3 rechts). Dekkera anomala neigt zur Ausbildung von Pseudomycelien. Oft ist mikroskopisch in den Filamenten keine Zellunterteilung mehr zu erkennen, sie sind aseptisch. Die gebildeten Ascosporen agglutinieren mit den Asci und bilden so verzweigte Filamente (Smith, 1998). Dekkera bruxellensis bildet kürzere Pseudomycelien aus, da hier die gebildeteten Ascosporen nur teilweise an die vorhandenen Filamente agglutinieren. Hier sind deutlich hutförmige bis spheroide Ascosporen zu erkennen (Smith, 1998). Die Intensität der Pseudomycelienausbildung ist, außer von den Wachstumsbedingungen, auch von dem jeweiligen Stamm abhängig (siehe Abb. 1.3). Nicht jeder Stamm bildet ein ausgeprägtes Pseudomycelium aus, so dass sich diese Stämme besonders für die flusszytometrische Detektion eignen. In Wein werden so gut wie keine Ascosporen gebildet. Die daraus resultierende geringe Pseudomycelbildung macht es möglich, auch aus praxisnahen Proben Brettanomyces beziehungsweise Dekkera flusszytometrisch nachzuweisen.

1.2.3.3. Pichia anomala / Wickerhamomyces anomalus

Pichia anomala wurde von Kurtzman (2011) reklassifiziert und in Wickerhamomyces anomalus umbenannt. Da Pichia anomala nach wie vor die gängigere Artbezeichnung ist, wird sie in dieser Arbeit beibehalten. *P. anomala* zählt zu den sogenannten Kahmhefen. Diese Hefen wachsen bevorzugt aerob und bilden auf dem befallenen Wein eine Kahmhaut. Durch Fermentation unter Sauerstoffausschluss kann eine Vermehrung nahezu ausgeschlossen werden. *P. anomala* kommt auf Trauben und somit auch in Mosten vor. Sie gären bei Spontanfermentationen zusammen mit *H. uvarum* den Most an, um nach Erreichen eines bestimmten Alkoholgehaltes von *S. cerevisiae* unterdrückt zu werden. Bei unsauberer Gärführung und Eintrag von Sauerstoff kann es zu erneuter Vermehrung und zur Bildung einer Kahmhaut kommen (Dittrich u. Grossmann, 2010).

P. anomala produziert ein Killertoxin (Kurtzman et al., 2011), das andere Hefespezies in ihrem Wachstum hemmt. Bei fermentativem Wachstum ist *P. anomala* fähig, zusätzlich zu großen Mengen Essigsäure, Ethylacetat und Isoamylacetat, 0,2% bis 4,5% (v/v) Alkohol und einige für die Weinherstellung positiv zu wertende Metabolite zu bilden (Shimazu u. Watanabe, 1981; Padilla et al., 2018). Dies zeigt sich auch darin, dass es kommerzielle Reinzuchthefen mit *Pichia*, in diesem Falle *P. kluyveri* gibt, welche in einer Doppelbeimpfung mit *S. cerevisiae* zu zusätzlichen fruchtigen Noten im Endprodukt führen sollen (FrootZen[®], Chr. Hansen GmbH)

1.3. Methoden zur Detektion von (Schad)hefen

Die Unterscheidung der diversen in Fermentationen vorkommenden Hefearten kann sich schwierig gestalten. Auf Grund ihres variablen Erscheinungsbildes ist es schwer Hefearten rein an Hand ihrer Morphologie zu differenzieren. In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Methoden entwickelt, um Hefespezies zu detektieren und zu unterscheiden. Zur Detektion von Hefen gibt es verschiedene Methoden, welche kulturabhängig oder kulturunabhängig sein können. Eine Kulturführung vor dem Nachweis kann zu einer verfälschten Darstellung der tatsächlichen Population führen. Durch die Zeitdauer einer Kultivierung kommt es zu einer Verzögerung des Eingreifens in den Fermentationsprozess, der durch kulturunabhängige Nachweismethoden verhindert werden kann.

1.3.1. Ausplattieren auf selektiven Medien

Zum Nachweis von bestimmten Hefearten, kann eine Ausplattierung auf einem selektivem Medium hilfreich sein. Zur genaueren Bestimmung der kultivierten Hefearten können indirekte molekularbiologische Methoden dienen (siehe Kapitel 1.3.2).

Um Sacharomyces von Nicht-Saccharomyceten zu unterscheiden, kann eine Ausplattierung auf Lysin-Agar erfolgen (Fowell, 1965). Auf diesen Platten können im Idealfall nur Nicht-Saccharomyceten wachsen, da Saccharomyces nicht mit Lysin als einziger Stickstoffquelle wachsen sollte. Zudem ist die Unterscheidung nicht ganz eindeutig, da einige Saccharomyces-Stämme auch auf Lysin wachsen, wenn auch langsam, und einige Nicht-Saccharomyceten schlechtes Wachstum auf Lysin-Agar zeigen. (Bisson u. Joseph, 2009)

Über Ausplattierung auf Cycloheximidhaltigem Medium kann *Brettanomyces* (Boulton et al., 1996) und *H. uvarum* (Di Maio et al., 2011) selektiv angezogen werden. Ein nicht-selektives Medium wie Wallersteins-Nährmedium (WL) (Green u. Gray, 1950) kann dazu dienen ein breites Spektrum an Hefearten nachzuweisen. Die Hefen werden an Hand ihrer Koloniemorphologie und Farbaufnahmefähigkeit identifiziert.

Das Ausplattieren auf selektiven Medien war lange Zeit die am häufigsten genutzte Art bestimmte Mikroorganismen nachzuweisen, da sie meist preisgünstig und einfach durchzuführen ist. Die Methode dient eher zum Nachweis bestimmter spezifischer Arten, als zur Darstellung der gesamten Flora im untersuchten Umweltmilieu, da das verwendete Nährmedium zur Bestimmung der Arten meist spezifisch optimal ist. Durch Wachstumsvorteile einer bestimmten Art kann es zur verzerrten Darstellung der Gesamtflora kommen, weswegen es meist notwendig ist, auf diversen Medien auszuplattieren, um verschiedene Hefearten zu differenzieren. Auch die Problematik der lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren Hefen (VBNC) (Oliver, 1993; Salma et al., 2013) gilt es zu beachten, welche mit den beschriebenen Nachteilen bezüglich der Verfälschung der nachgewiesenen Kulturzusammensetzung einhergeht. Lebensfähige aber nicht kultivierbare Hefen befinden sich in einem ruhenden Zustand in welchem sie durch Plattenkultivierung nicht nachweisbar sind. Sie sind jedoch dazu fähig jederzeit wieder in einen vermehrungsfähigen Zustand zurückzuwechseln. (Oliver, 1993; Salma et al., 2013) Heutzutage wurden Ausplattierungsmethoden nahezu vollständig zu Gunsten von molekularen Techniken abgelöst (siehe Kapitel 1.3.3 und 1.3.2). (Bisson u. Joseph, 2009) Stellenweise wird für die molekularen Techniken eine Vorkultivierung auf Platte genutzt (siehe Kapitel 1.3.2).

1.3.2. Indirekte, kulturabhängige Nachweismethoden

Indirekten Nachweismethoden geht ein Kultivierungsschritt der untersuchten Hefekolonien voran. Hierdurch kann das tatsächliche Verhältnis und Vorkommen verfälscht werden. Hefearten, die nur vereinzelt oder in geringer Zellzahl vorliegen, können entweder nicht nachgewiesen oder in ihrer Anzahl als zu hoch bewertet werden. Bei Anzucht in nicht-selektiven Medien haben schnell wachsende Hefen wie Saccharomyces einen Vorteil gegenüber langsamer wachsenden spezialisierteren Hefen. Ändert man das Medium, fügt also Inhibitoren zu oder ändert die Bedingungen, um schnell wachsende Hefen zu unterdrücken, werden auch oft langsam wachsende Stämme und Spezies in ihrem Wachstum gehemmt (Bisson u. Joseph, 2009). Gerade Zellen mit geringem Ribosomengehalt, die mit Nachweis durch kulturunabhängige Methoden, zum Beispiel einer FISH, keine große Rolle spielen, können durch Kultivierung in ihrer Anzahl und damit ihrer Wichtigkeit in der gesamten Nativprobe überschätzt werden (Wallner et al., 1995). Des Weiteren kommt es durch eine Kultivierung zu einer nicht unbedingt notwendigen Verzögerung im Nachweisprozess, so dass möglicherweise ein Eingriff in die Fermentation zu spät erfolgt und eine Kontamination bereits schädlichen Effekt auf das Endprodukt genommen hat.

1.3.2.1. Identifikation auf Spezieslevel

Sequenzierung der D1-/D2-Region nach PCR der 26S-ribosomalen RNA

Für eine PCR der 26S-ribosomalen RNA ist eine DNA-Extraktion aus einer Reinkultur notwendig. Nach Amplifizierung der D1-/D2-Region des 26S-RNA-Gens wird das Amplicon sequenziert. Der existierende Datenbestand zu Sequenzen der D1-/D2-Region verschiedener Spezies ist hoch und erlaubt so die Identifizierung von unbekannten Isolaten. Zwischen verschiedenen Spezies unterscheidet sich die Sequenz der D1-/D2-Region um mehr als 1 %. (Baleiras Couto et al., 2005; Kurtzman u. Robnett, 1997, 1998; OIV, 2011)

rDNA PCR-RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) Diese Methode beruht auf der Amplifizierung spezifischer rDNA-Regionen, wie ITS1 und ITS2 und den 5,8S- und 26S-rRNA-Genen (Baleiras Couto et al., 2005; Cadez et al., 2002; de Llanos Frutos et al., 2004; Esteve-Zarzoso et al., 1999; Teresa Fernandez-Espinar et al., 2000; Gonzalez et al., 2006; Guillamon et al., 1998; Sipiczki, 2004; Zanol et al., 2010). Diese Regionen der rDNA sind stark konserviert und weisen eine hohe genetische Variabilität zwischen verschiedenen Spezies auf. Die Sequenzunterschiede zeigen sich durch die Verwendung verschiedener Restriktionsendonukleasen bei einer Restriktionsanalyse, indem sich die Restriktionsmuster verschiedener Spezies unterscheiden. Diese Methode wird genutzt, um diverse Hefespezies zu differenzieren. Die dazugehörigen Restriktionsprofile finden sich beispielsweise bei Esteve-Zarzoso et al. (1999) und Zanol et al. (2010). (OIV, 2011)

1.3.2.2. Identifikation auf Stammlevel

mtDNA RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) Mittels Restriktionsanalyse der mitochondrialen DNA (mtDNA) können weinspezifische *S. cerevisiae*-Stämme differenziert werden. Die Analysemethode wurde von Querol et al. (1992) und Lopez et al. (2001) vereinfacht. Die DNA-Extraktion erfolgt aus einem Reinkulturisolat. Für die Restriktionsanalyse werden die Restriktionsenzyme Hinfl oder RSAI verwendet (Guillamon et al., 1994; Lopes et al., 2006; Schuller et al., 2004). (OIV, 2011)

Amplifikation der Delta-Sequenzen Für die Delta-PCR wird mit spezifischen Primern gearbeitet, welche an die sogenannten Delta-Sequenzen binden. Delta-Sequenzen flankieren meist Ty1-Retrotransposons in *S. cerevisiae*. Es liegen zwischen 35 und 55 Kopien dieser Elemente im Hefegenom vor. Die Anzahl und Lage dieser Delta-Sequenzen ist intraspezifisch variabel. Ness et al. (1993) designten die Primer δ_1 und δ_2 zur Unterscheidung von *S. cerevisiae*-Stämmen. Legras u. Karst (2003) designten zwei weitere Primer δ_{12} und δ_{21} . So können *S. cerevisiae*-Stämme noch genauer differenziert werden. (Legras u. Karst, 2003; Ness et al., 1993; Schuller et al., 2004; OIV, 2011)

Genotyping durch Mikrosatelliten Mikrosatelliten sind polymorph und erlauben eine Differenzierung auf Stammebene. Es handelt sich hierbei um kurze Nukleotidsequenzen aus Tandemwiederholungen von zwei bis zehn Nukleotiden Länge, welche im Genom oft wiederholt werden. Legras et al. (2005) unterscheiden damit diverse *Sacharomyces cerevisiae*-Stämme. Die Kombination von sechs Mikrosatelliten-Loci ermöglicht es geographische und technologische Verwandschaftsverhältnisse zwischen Stämmen und das Stammprofil von *S. cerevisiae* während der Fermentation darzustellen. (Legras et al., 2005; Schuller et al., 2004; Schuller u. Casal, 2007; OIV, 2011)

1.3.3. Direkte, kulturunabhängige Nachweismethoden

Direkte Nachweismethoden weisen die tatsächlich vorhandenen Mikroorganismen im Medium nach, ohne zusätzliche Kultivierungsschritte, die das tatsächliche Verhältnis und Vorkommen an Hefearten verfälschen könnten. Außerdem ermöglichen sie ein schnelles Handeln, sollte ein negativer Effekt auf den Fermentationsprozess durch Kontamination mit einer Schadhefenspezies drohen.

1.3.3.1. PCR mit DGGE (Denaturierungsgradientengelelektrophorese)

Eine PCR mit darauf folgender DGGE ermöglicht eine Identifizierung von Hefen auf Spezieslevel. Die Methode beruht auf der Amplifizierung der 26S-rDNA mit den universellen Primern U1 und U2. Die Auftrennung der Fragmente erfolgt in einem denaturierenden Polyacrylamidgel mit einem Harnstoff- und Formamid-Gradienten von 20 % zu 60 %. Die gewünschten Fragmente werden aus dem Gel ausgeschnitten und zur Speziesidentifizierung sequenziert. Diese Methode ermöglicht auch den Nachweis von lebensfähigen aber nicht kultivierbaren (VBNC) Hefen, ist aber nicht zur Quantifizierung geeignet. Die Nachweisgrenze liegt bei 1000 Zellen / ml. (Cocolin et al., 2000; Cocolin et al., 2001; OIV, 2011)

1.3.3.2. Quantitative PCR (qPCR)

Mittels qPCR können Hefen schnell auf Speziesebene detektiert und quantifiziert werden. Hierfür werden universelle Hefeprimer verwendet, welche an die

D1-/D2-Region des 26S-rRNA-Gens binden. Die Quantifizierung erfolgt an Hand der Anzahl der benötigten Polymerisationszyklen, bis eine gewisse Signalgrundlinie überschritten ist. Je mehr an Ziel-DNA in der Probe vorhanden ist, umso mehr Zyklen sind notwendig, um die Signalgrundlinie (Ct-Wert) zu überschreiten. (OIV, 2011) Oberhalb dieses Ct-Wertes steigt die Fluoreszenz exponentiell über den Hintergrundwert an und wird als positiv gewertet. Diese Methode erfordert die Erstellung umfangreicher Standardkurven (Casey u. Dobson, 2004).

Diese Methode wurde bereits genutzt um *D. bruxellensis* (Phister u. Mills, 2003), *Candida stellata*, *S. cerevisiae* und *H. uvarum* (Hierro et al., 2006; Zott et al., 2010) in gemischten Fermentationen sowohl in Wein als auch in synthetischem Medium nachzuweisen. Die Nachweisgrenze liegt bei 100 koloniebildenden Einheiten/ml und wird nicht von anderen Weinmikroorganismen in der Probe beeinflusst. Zott et al. (2010) verbesserten die Methode weiter. Ihnen gelang der Nachweis und die Quantifizierung weiterer Nicht-Saccharomyceten.(OIV, 2011)

1.3.4. Optische Methoden

Es gibt verschiedene Methoden Hefen auf Grund ihrer optischen Eigenschaften voneinander zu unterscheiden. Dies kann sogar ohne zusätzliche Fluoreszenzfärbung geschehen. Bhatta et al. (2006) postulieren die Möglichkeit Hefen speziesspezifisch an Hand von ihren Emissions- und Excitationsspektren im Fluoreszenzspektroskop zu unterscheiden. Eine weitere Möglichkeit zur Hefeunterscheidung auf Speziesebene bietet die Fourier-transform Infrarot Spektroskopie (FTIR) (Adt et al., 2010; Helm et al., 1991). Auch hier werden Fluoreszenzspektren ohne vorherige Fluoreszenzfärbung verglichen. Beide Methoden sind allerdings indirekt, ihnen geht eine vorherige Plattenkultivierung voraus.

Um mittels Fluoreszenzfärbung Hefespezies optisch zu unterscheiden, kann die Methode der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) genutzt werden, auf welche im folgenden Kapitel näher eingegangen wird (siehe Kapitel 1.4).

1.4. Schadhefendetektion mittels Flow-FISH

Zur Detektion von in der Fermentation unerwünschten Hefen, welche auch an der Entstehung einer Gärstörung (siehe Kapitel 1.1.1.4) beteiligt sein können, soll in

dieser Arbeit eine auf flusszytometrischer Detektion basierte Fluoreszenz in situ Hybridisierung (Flow-FISH) Anwendung finden. Sie kann indirekt (zum Beispiel Xufre et al., 2006) aber auch direkt (zum Beispiel Andorra et al., 2011; Branco et al., 2019; Serpaggi et al., 2010; Wang et al., 2014), ohne vorherige Plattenkultivierung, durchgeführt werden. Bei der verwendeten optimierten Methode handelt es sich ohne vorhergehende Zellkultivierung um ein weiteres direktes und kulturunabhängiges Verfahren (siehe auch Kapitel 1.3.3), welches einen Nachweis auf Spezieslevel ermöglicht. Des Weiteren ist so ein Nachweis von lebensfähigen aber nicht kultivierbaren (VBNC) Mikroorganismen möglich (Moter u. Goebel, 2000).

Eine typische FISH Prozedur besteht immer aus einer Fixierung der Zellen (siehe auch Kapitel 1.4.2), der Probenvorbereitung mit anschließender Hybridisierung mittels markierter Sonden (siehe auch Kapitel 1.4.3) und einem Waschschritt mit abschließender Visualisierung der Probe (Moter u. Goebel, 2000).

1.4.1. Historie der FISH

Bereits Ende der 1960er Jahre konnten mittels radiomarkierter DNA oder 28SrRNA Nukleinsäuresequenzen innerhalb tierischer Zellen ohne Zerstörung derselben untersucht werden (ISH) (John et al., 1969; Pardue u. Gall, 1969). Mit der Entwicklung von Fluoreszenzmarkern wurden nach und nach die radioaktiv markierten Sonden durch diese ersetzt (Moter u. Goebel, 2000). DeLong et al. (1989) nutzten erstmals fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden zur Detektion einzelner mikrobieller Zellen. Im Laufe der letzten Jahrzehnte hat sich die FISH als nützliches Werkzeug zum Nachweis verschiedener Mikroorganismen im phylogenetischen, ökologischen und diagnostischen Rahmen erwiesen (Amann et al., 1990b; Moter u. Goebel, 2000). Amann et al. (1990a) verwendeten erstmals die Technik der Flusszytometrie zur Detektion von Mikroorganismen in Suspension und entwickelten eine universelle an alle Bakterien (Eub338) beziehungsweise Eukaryonten (Euk516) bindende Sonde. Das von Wallner et al. (1993) optimierte Protokoll findet in vielen Publikationen Anwendung (Andorra et al., 2011; Serpaggi et al., 2010; Xufre et al., 2006). Stender et al. (2001) entwickelten eine Nachweismethode für Brettanomyces in Wein unter Verwendung von Peptidnukleinsäuren-Sonden (PNA). Der Grundstein der verwendeten Oligonukleotidsonden wurde von Inacio et al. (2003) gelegt. Die von ihnen dargestellte Karte der D1-/D2-Region der 26S-rRNA von *S. cerevisiae* dient als Grundlage für die unter anderem von Xufre et al. (2006) entwickelten Oligonukleotidsonden, die auch in dieser Arbeit verwendet werden. 26S-rRNA-Sonden zur Detektion von *Brettanomyces*-Spezies wurden von Roeder et al. (2007) im Rahmen von fluoreszenzmikroskopischen FISH-Studien vorgestellt und wenige Jahre später zum flusszytometrischen Nachweis derselben genutzt (Serpaggi et al., 2010).

Zur Detektion von Weinmikroorganismen wurden fluoreszenzmarkierte rRNA-Sonden und die FISH-Methodik bereits in einigen Studien verwendet (siehe unter anderem Branco et al. (2019); Roeder et al. (2007); Serpaggi et al. (2010); Stender et al. (2001); Wang et al. (2014); Xufre et al. (2006)). Ausgewertet werden diese Studien zum Nachweis von Weinmikroorganismen entweder klassisch mittels Fluoreszenzmikroskop (Branco et al., 2019; Roeder et al., 2007; Xufre et al., 2006) oder mittels Flusszytometer (Branco et al., 2019; Serpaggi et al., 2010; Wallner et al., 1993; Wang et al., 2014) als Flow-FISH.

1.4.2. Fixiermethoden

Eine Fixierung der Zellen dient dazu, diese möglichst permeabel für die Fluoreszenzsonden zu machen. Dabei ist es notwendig, dass Zelllyse vermieden wird und die Integretät der Zellen gewahrt bleibt (Amann u. Fuchs, 2008).

In der Literatur finden sich unterschiedliche Vorgehensweisen zur Fixierung der Zellen vor der Hybridisierung. Auch wenn sich die Methoden im Detail unterscheiden, kann man im Allgemeinen zwischen Fixierung in Lösungsmitteln wie Ethanol und Methanol oder Aldehyden wie Formaldehyd trennen (Moter u. Goebel, 2000). Ethanol dehydriert die Zellen und führt so zu einer Präzipitation von Nukleinsäuren und Proteinen. Die Wirkweise von Formaldehyd besteht aus einer Quervernetzung der Nukleinsäuren und Proteine durch die Ausbildung von Methylenbrücken.

Amann et al. (1990a) fixieren mit reinem Ethanol im Verhältnis 1:1 mit PBS-Puffer und lagern diese Mischung für maximal zwei Wochen bei -20 °C. Branco et al. (2019) fixieren Hefezellen in reinem Ethanol. Andorra et al. (2011) beschreiben eine Ethanolfixierung in 50%-igem Ethanol, die an die Fixierung in Formaldehyd anschließt. Amann et al. (1990b), DeLong et al. (1989), Serpaggi et al. (2010) und Yilmaz u. Noguera (2004) fixieren mit Formaldehyd. Mit Formaldehyd fixierte Zellen für spätere FISH lassen sich bis zu acht Wochen bei 4 °C lagern, mögli-

cherweise geht dabei aber der rRNA-Gehalt etwas zurück (Amann et al., 1990b). In der Literatur werden die Hybridisierungsproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten zur Fixierung entnommen. Amann et al. (1990a); Wallner et al. (1993, 1995); Xufre et al. (2006) verwenden Zellen in der späten logarithmischen exponentiellen Phase. Yilmaz u. Noguera (2004) verwenden Zellen in der frühen stationären Wachstumsphase. Auch Branco et al. (2019) analysieren *D. bruxellensis* in der lag-Phase und weitere Hefespezies in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase. Auch in dieser Arbeit werden Hefezellen, so fern nichts anderes erwähnt ist, in der mittleren logarithmischen exponentiellen Wachstumsphase untersucht. Die Gründe für die Zellentnahme in dieser Wachstumsphase sind in Kapitel 1.4.4 erläutert.

1.4.3. Hybridisierungssonden

Zur Markierung der zu detektierenden Hefezellen werden bei einer FISH fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden verwendet. Die in dieser Arbeit genutzten Sonden wurden am 5'-Ende mit FITC markiert. Eine erfolgreiche Bindung an die Zielregion wird mittels optischer Methoden, wie Fluoreszenzmikroskopie oder Flusszytometrie (siehe Kapitel 1.5), als Fluoreszenz detektiert.

Als Zielregionen der DNA-Oligonukleotidsonden für FISH-Versuche bieten sich rRNA-Sequenzbereiche an. Ribosomen und somit auch ribosomale RNA (rRNA) kommen in allen lebenden Organismen in hoher Anzahl in allen Zellen vor. Ribosomale RNA ist relativ stabil und enthält hochkonservierte aber auch variable Sequenzbereiche. Vor allem die größeren Abschnitte der großen Untereinheit (26S) und der kleinen Untereinheit (18S) eignen sich auf Grund ihrer Länge als Zielbereiche für Oligonukleotidsonden. Die dabei entstehenden Hybride aus RNA und DNA weisen gegenüber RNA-RNA-Verbindungen eine höhere Stabilität auf (Lesnik u. Freier, 1995). Ribosomale RNA werden auch für molekulare Phylogeniestudien vielfältiger Mikroorganismen eingesetzt und in deren Rahmen sequenziert. Dadurch liegen große Datenbanken vor, aus denen rRNA-Sequenzen entnommen werden können. Ein weiterer Vorteil ist, dass rRNA-Sonden heutzutage ohne vorherige Kultivierung gewonnen werden können (Amann et al., 2001). Die Sequenzunterschiede zwischen den diversen rRNA-Genen haben die vorher übliche Klassifikation von Mikroorganismen deutlich verändert (Woese, 1987) und führten zu einigen Reklassifizierungen. Diese Datenbanken können genutzt werden, um Hybridisierungssonden zu designen (Amann et al., 1990a). Amann et al. (1990a) gehörten zu den Ersten, die 16S-rRNA-Sonden zur flusszytometrischen Analyse von gemischten Bakterienpopulationen nutzen, allerdings im Bereich der aquatischen Mikrobiologie. Im Rahmen ihrer Versuche wurde auch die in dieser Arbeit verwendete, für Eukaryonten spezifische Sonde Euk516 entwickelt (Amann et al., 1990a). Die verwendeten Sonden können allerdings nur so gut sein, wie die Datenbank, welche für ihr Design verwendet wird (Amann et al., 2001). Amann et al. (2001) schlagen vor, regelmässig die verwendeten Sonden zu re-evaluieren, ob die Sequenzen noch für die gewünschte Spezies passend sind oder verbessert werden können. Laut Amann u. Fuchs (2008) hat die, auch in dieser Arbeit verwendete, Eukaryontensonde Euk516 ein Problem mit falsch-positiver Identifizierung von diversen Crenacheota. Für die Identifikation von Mikroorganismen in Wein beziehungsweise Most ist dies irrelevant, zeigt aber, wieso eine regelmässige Re-evaluierung der Sonden und die Anpassung an aktuelle Datenbanken notwendig ist. Die Nutzung von gruppenspezifischen Sonden ist nur im Kontext mit mehreren Sonden, bevorzugt speziesspezifischen, empfohlen (Amann et al., 1995; Amann u. Fuchs, 2008), da der Anteil an falsch-positiven Identifikationen signifikant hoch ausfallen kann. Des Weiteren ist unklar in wie fern von S. cerevisiae (Inacio et al., 2003) vorhandene in situ Zugänglichkeitskarten auf andere Mikroorganismen übertragen werden können. Es wäre möglich, dass sie nur bei phylogenetisch ähnlichen Organismen gültig sind (Behrens et al., 2003a). Das hieße gruppenspezifische Sonden, wie im Fall der in dieser Arbeit verwendeten Euk516-Sonde, könnten durch speziesspezifische Sekundär- beziehungsweise Tertiärstrukturen je nach Spezies unterschiedlich effektiv binden.

Eine typische Oligonukleotidsonde, wie sie für FISH verwendet wird, ist zwischen 15 und 30 Nukleotiden lang und am 5'-Ende kovalent an ein Fluoreszenzmolekül gebunden (Amann et al., 2001). Sie bindet im Falle von Hefen an die D1- und D2-Region der 26S-rRNA, welche sich durch ihre kurze Länge von durchschnittlich 600 Nukleotiden dafür anbietet (Inacio et al., 2003). Häufig verwendete Fluorophore sind Fluorescein (FITC) (zum Beispiel bei Wang et al., 2014; Xufre et al., 2006; Yilmaz u. Noguera, 2004), Tetramethylrhodamin (zum Beispiel bei Amann et al., 1990a), Texas Red oder andere Farbstoffe im roten Lichtspektrum wie ATTO 647N und AF 647 (zum Beispiel bei Branco et al., 2019) und Carbocyan-Farbstoffe zum Beispiel Cy3 (zum Beispiel bei Inacio et al., 2003; Roeder et al., 2007; Yilmaz u. Noguera, 2004) oder Cy5 (zum Beispiel bei Amann et al., 2001;

Branco et al., 2019; Southwick et al., 1990).

Zusätzlich zu einfachen Oligonukleotidsonden gibt es Studien, welche Peptidnukleinsäuren (PNA) zum FISH-Nachweis nutzen. Dank ihres ungeladenen Peptidrückgrates zeigen sie eine wesentlich höhere Bindungsaffinität als Oligonukleotidsonden (Zwirglmaier, 2005). Stender et al. (2001) gelang mit PNA die FISH-Detektion von *D. bruxellensis*. Für eine routinemäßige Verwendung in der Weinindustrie sind PNA allerdings, trotz ihrer erhöhten Sensitivität gegenüber normalen Oligonukleotidsonden, zu teuer in der Herstellung (Roeder et al., 2007).

Auch energetische Aspekte sind bei einer FISH zu beachten. Eine Abnahme der Gibbschen freien Energie um mehr als -13 kcal/mol korreliert mit einer effektiven FISH-Detektion (Amann u. Fuchs, 2008; Yilmaz u. Noguera, 2004; Yilmaz et al., 2006). Durch Modifikation der Sondenlänge kann möglicherweise trotzdem eine ausreichende Fluoreszenzintensität erzielt werden (Yilmaz et al., 2006). Ist die Hybridisierungstemperatur höher als die Schmelztemperatur der Sonde, dürfte die Sekundärstruktur derselben die Hybridisierungseffizienz nicht signifikant beeinflussen (Yilmaz u. Noguera, 2004). Yilmaz u. Noguera (2004) stellen die These auf, dass 51 % der Helligkeitsunterschiede bei mit Fluorescein markierten Proben auf thermodynamische Aspekte zurück zu führen sind.

Des weiteren kann die Fluoreszenzintensität durch Fluorophorquenching zwischen dem Fluorophor und einem Nukleotid reduziert werden (Amann u. Fuchs, 2008; Behrens et al., 2004; Torimura et al., 2001). Torimura et al. (2001) belegen unter anderem Quenching nach der Hybridisierung bei 5-FAM, welches strukturell FITC sehr ähnlich ist, durch Interaktion mit Guaninen und Adeninen. Behrens et al. (2004) halten das Quenching bei Fluorescein für das FISH-Protokoll für irrelevant. Laut Yilmaz et al. (2006) hingegen ist das Fluorophorquenching eines der Hauptprobleme bei der Sondensensivität. Beim Design der Sonden ist auf Fluorophorquenching zu achten (Torimura et al., 2001). Auch die Zugänglichkeit der Sondenbindungsregion spielt bei der Wahl der Sondensequenzen eine große Rolle (Yilmaz u. Noguera, 2004). Behrens et al. (2003b) zeigen, dass es keinen signifikanten Unterschied bei dem Effekt, dass die Sondenzugänglichkeit der rRNA die Fluoreszenzintensität beeinflusst, gibt.

Zeigt eine ordnungsgemäss designte Sonde kein ausreichendes Fluoreszenzsignal bei einer FISH, liegen die Gründe meist in unzureichender Zellpermeabilisierung, zu geringem Ribosomengehalt (siehe Kapitel 1.4.4) oder daran, dass die Binderegion auf Grund einer höhergradigen rRNA-Struktur nicht erreichbar

ist (Amann et al., 1995; Amann u. Fuchs, 2008; Zwirglmaier, 2005). Auf Möglich-keiten, die Fluoreszenzintesität zu erhöhen, wird in Kapitel 1.4.5 näher eingegangen.

Die in dieser Arbeit verwendeten spezifischen Oligonukleotidsonden wurden von Amann et al. (1990a); Kosse et al. (1997); Roeder et al. (2007) und Xufre et al. (2006) designt (siehe Kapitel 2.4.4.2). Bei Xufre et al. (2006) fand hierbei die Zugänglichkeitskarte von *S. cerevisiae* von Inacio et al. (2003) Anwendung. Die Sonden unterscheiden sich in wenigstens vier Basen von den Sequenzen nahe verwandter Hefespezies (Xufre et al., 2006).

1.4.4. Abhängigkeit der Hybridisierbarkeit der Zellen vom Ribosomengehalt

DeLong et al. (1989) zeigen, dass der Anteil der gebundenen rRNA-Sonden abhängig ist vom Ribosomengehalt und damit dem Anteil der vorhandenen Bindestellen. Der Ribosomengehalt der Zellen ist beeinflusst von der Wachstumsphase und der untersuchten Spezies, was unter anderem DeLong et al. (1989), Kemp et al. (1993), Ruimy et al. (1994), Schaechter et al. (1958), Waldron u. Lacroute (1975) und Wallner et al. (1993) beweisen. Ein abnehmender rRNA-Gehalt korreliert mit einer abnehmenden Wachstumsrate (Amann et al., 1995). Bei Hefen kommt außerdem ein Effekt abnehmender Ribosomenaktivität mit abnehmender Wachstumsrate hinzu (Waldron u. Lacroute, 1975). Nur während der schnellen, exponentiellen Wachstumsphase einer Hefekultur werden Ribosomen mit maximaler Effektivität genutzt (Waldron u. Lacroute, 1975). Somit ist auch die Fluoreszenzintensität der Probe von der Wachstumsphase der Zellen abhängig (DeLong et al., 1989). Häufig sind niedrige Fluoreszenzsignale, gerade in nativen Proben, auf den geringen Ribosomengehalt in langsam wachsenden oder metabolisch inaktiven Zellen zurückzuführen (Zwirglmaier, 2005). Bei geringem rRNA-Gehalt empfehlen Amann et al. (1990b) mehrere Sonden gleichzeitig zu benutzen. Auch die Möglichkeit sogenannte Hilfssonden zu nutzen, bietet sich an (siehe Kapitel 1.4.5 und 3.2).

1.4.5. Hilfssonden und andere Fluoreszenzverstärker

Häufig kommt es bei der Durchführung von FISH-Versuchen zu Problemen mit mangelnder Signalintensität (siehe auch Kapitel 1.4.3 und 1.5.4). Es liegen diverse Studien vor, die sich darauf konzentrieren, die Fluoreszenzaktivität einer FISH zu steigern. Bei einer einfachen rRNA-FISH erfolgt nur eine Fluoreszenzmarkierung pro Ribosom. Durch Einbringen mehrerer bindungsfähiger Fluoreszenzsonden pro Ribosom, kann die Fluoreszenzaktivität erhöht werden (Amann et al., 1990a). Dieser Effekt wird in dieser Arbeit bei D. bruxellensis genutzt, wo ein Nachweis mit zwei verschiedenen Sonden inklusive Hilfssonden sich als am effektivsten erweist (siehe Kapitel 3.2.4). Eine weitere Möglichkeit zur Signalsteigerung bietet zum Beispiel die Nutzung von mit Meerettichperoxidase (HRP, engl.: horseradish peroxidase) markierten Oligonukleotidsonden, die über enzymatische Signalamplifikation verstärkte Signale liefern können, wo mit einfachen Oligonukleotidsonden die Autofluoreszenz höher wäre, als die gewünschte Sondenfluoreszenz (Schoenhuber et al., 1999). Eine andere Variante ist eine Markierung mit Digoxigenin (DIG) und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Zarda et al., 1991). Auch hier kommt es zu einer Signalverstärkung.

In dieser Arbeit wurde die Nutzung von unmarkierten, in der Nähe der spezifischen markierten Sonde bindenden, Hilfssonden untersucht. Enthält der Hybridisierungspuffer SDS, wird die dreidimensionale Struktur der Ribosomen denaturiert, so dass wahrscheinlich die Sekundärstruktur, beispielweise Loops, für das Bindeunvermögen von spezifischen Sonden verantwortlich sind (Amann u. Fuchs, 2008). Hier erscheint die Verwendung von zusätzlichen Sonden, die in der Nähe der spezifischen fluoreszenzmarkierten Sonde an die ribosomale RNA binden und somit die Sekundärstruktur öffnen, am vielversprechendsten (Fuchs et al., 2000a). Auch hierzu gibt es verschiedene Möglichkeiten. Fuchs et al. (2000a) verwenden hierfür unmarkierte Sonden, die direkt angrenzend an die spezifische Sonde binden. Roeder et al. (2007) verwenden markierte Sonden, die spezifisch an die von ihnen untersuchte Brettanomyces-Spezies binden. Es handelt sich hierbei allerdings sowohl um direkt angrenzende, als auch um einige Basenpaare entfernt von der spezifischen Sonde bindende Hilfssonden. In dieser Arbeit werden unmarkierte, in direkter Nachbarschaft der spezifischen Hefesonde bindende Hilfssonden verwendet (siehe Kapitel 3.2.1).

1.4.6. Flow-FISH

In der Literatur erfolgt eine Hybridisierung für Flow-FISH über mehrere Stunden über Nacht (Serpaggi et al., 2010) oder deutlich verkürzt über 2 bis 5 h (Amann et al., 1990a; Andorra et al., 2011; Branco et al., 2019; Wang et al., 2014). Für einen fluoreszenzmikroskopisch ausgewerteten FISH-Assay ist die Hybridisierungszeit meist nur wenige Stunden lang (Amann et al., 1990b; Roeder et al., 2007; Xufre et al., 2006). Amann et al. (1990b) und Roeder et al. (2007) hybridisieren hierbei direkt auf den im Nachhinein untersuchten Objektträgern. Da hier deutlich weniger Zellen vorliegen als bei einem FISH-Assay in Suspension, erscheint hier die kurze Hybridisierungszeit als realistisch. Branco et al. (2019) verwenden ein leicht angepasstes RNA-FISH Protokoll für Suspensionen, welches ursprünglich zur Analyse von Mikrobiomen von Kulturerbestätten entwickelt wurde (Gonzalez-Perez et al., 2017). Xufre et al. (2006) hybridisieren in Suspension und übertragen die Zellen erst nachträglich auf Objektträger. Die Zellen für die FISH stammen bei Xufre et al. aus Kolonien von Platte, die mit Fermentationsproben angeimpft wurden. Dieser Versuchsaufbau mit Plattenkultivierung kann durch Selektion der Kolonien und eventueller Existenz von VBNC-Spezies zu einer Verfälschung der realen Kulturzusammensetzung in der Fermentation führen. Ein Vorteil der Plattenkultivierung ist die ausreichend vorhandene Anzahl an Hefezellen, die überwiegend in logarithmischer Wachstumsphase vorliegen. Eine getroffene Aussage über die Zusammensetzung der ursprünglichen Fermentationskultur allein über die ausgewählten Kolonien und deren Zusammensetzung kann, aber muss nicht der realen Zusammensetzung entsprechen. Der Hybridisierungsversuchsaufbau von Andorra et al. (2011) baut auf Xufre et al. (2006) auf, wurde aber auf die direkte Nutzung von Fermentationsproben optimiert. Wang et al. (2014) verwenden eine verbesserte Variante der von Andorra et al. (2011) weiter entwickelten Hybridisierungsdurchführung. Auch in dieser Arbeit wurde die Methode von Andorra et al. (2011) verwendet, nachdem sie weiter optimiert wurde.

1.5. Flusszytometrie

Um die mit fluoreszierenden Farbstoffen markierten RNA-Sonden dieser Arbeit, welche spezifisch an die jeweilige Hefespezies binden, nachzuweisen, wird die Methodik der Flusszytometrie angewendet.

Das Prinzip der Flusszytometrie beruht auf der Vereinzelung von Partikeln beziehungsweise Zellen. Diese werden in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laser vorbeigeführt. Abhängig von der Probenvorbereitung und den jeweiligen Zell- beziehungsweise Partikeleigenschaften senden die untersuchten Zellen beziehungsweise Partikel charakteristische Emissionssignale aus, welche mittels Photodetektoren registriert werden. So können die in dieser Arbeit untersuchten Hefezellen hinsichtlich ihrer Form, Größe und Fluoreszenzemission beurteilt werden. Die Auswertung der Messung erfolgt nach verschiedenen Gesichtspunkten, welche unter anderem in Kapitel 1.5.1.2, 1.5.3 und 1.5.4 näher erläutert werden.

1.5.1. Ablauf einer flusszytometrischen Messung

Mittels Flusszytometrie ist es möglich, Zellen allein an Hand ihrer Größe, Granularität und Dichte in einzelne Populationen aufzutrennen. Zur Identifizierung bestimmter Hefespezies werden in dieser Arbeit Hefekulturen beziehungsweise Proben aus Weinfermentationen mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) (siehe Kapitel 1.4) mit spezifischen fluoreszenzmarkierten RNA-Sonden (siehe Kapitel 1.4.3) hybridisiert. Dank der Fluoreszenzmarkierung kann eine Identifizierung der Hefespezies mittels Flusszytometrie erfolgen.

1.5.1.1. Ablauf der Messung

Im Probeninjektor und in der Messküvette wird der nötige Unterdruck erzeugt, um die Probensuspension aufzusaugen. Der dabei produzierte Hüllstrom aus Fließmittel (engl.: sheath fluid) ummantelt den Probenstrom. Durch die Querschnittverringerung der Messküvette wird der Probenstrom beschleunigt und dadurch die Zellen vereinzelt. Diese hydrodynamische Fokussierung macht eine Anregung einzelner Partikel durch den Laserstrahl möglich (siehe Abb. 1.4). Der Probendruck lässt sich am zur Verfügung stehenden Flusszytometer Partec Sysmex

CUBE 6 stufenlos einstellen. So lässt sich die Zahl der analysierten Zellen pro Sekunde regulieren. Am in dieser Arbeit verwendeten PARTEC SYSMEX CUBE 6 sind quantitative Messungen möglich, da das gewünschte zu messende totale Probenvolumen und das zu messende Volumen pro Sekunde vordefiniert werden kann. Dies ermöglicht zum Beispiel auch einfache Zellzählungen (siehe Kapitel 2.1.1.1).

Die Probenmessung erfolgt nach Anregung durch das Licht von einem oder mehreren Lasern definierter Wellenlänge. Das in dieser Arbeit genutzte PARTEC SYSMEX CUBE 6 verfügt über zwei Laser von 488 nm (blau) und 638 nm (rot) Wellenlänge. Es wurde lediglich der blaue Laser mit 488 nm Wellenlänge verwendet. Dies ist auch die standardmässig am meisten genutzte Wellenlänge, da sie die grösste Vielfalt an stark und breit anregbaren Fluorochomen bietet. Das von den Partikeln der Probe emittierte Licht wird durch diverse optische Filter, die nur bestimmte Wellenlängen passieren lassen, zu den Photodetektoren geleitet (siehe Abb. 1.5).

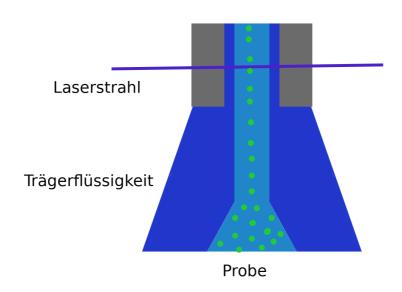


Abbildung 1.4.: Hydrodynamische Fokussierung in der Messküvette:

Durch die Querschnittsverringerung der Messküvette wird die Probenflüssigkeit beschleunigt und die Zellen bzw. Partikel werden vereinzelt. So ist eine Einzelanregung durch den Laserstrahl und somit auch die Analyse einzelner Partikel möglich. (Graphik angelehnt an BDBIOSCIENCES Schulungsunterlagen zur Flusszytometrie)

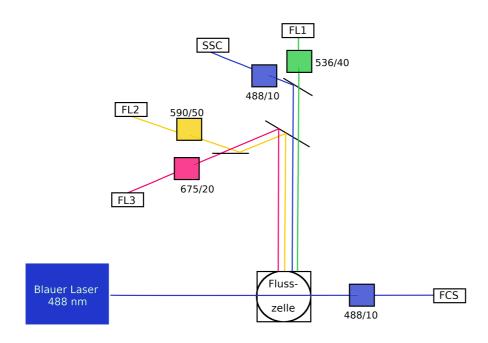


Abbildung 1.5.: Schematisch vereinfachter Strahlengang des 488 nm Lasers eines Flusszytometers am Beispiel eines Partec Sysmex Cube 6:

Der 488 nm Laser ermöglicht die Detektion von Fluoreszenzsignalen unterschiedlicher Wellenlänge in drei verschiedenen Kanälen und die Analyse des seitwärts und vorwärts gestreuten Lichts. (Graphik verändert nach BDBIOSCIENCES Schulungsunterlagen zur Flusszytometrie)

Tabelle 1.1.: Wellenlängenbereiche der im CUBE 6 installierten Bandpassfilter:

Die Filter lassen das Licht innerhalb des genannten Wellenlängenbereiches passieren.

Fluoreszenzdetektor	durchlässige Wellenlänge X/+-
FL1	536/40 nm
FL2	590/50 nm
FL3	675/20 nm
FL4	675/20 nm

Das Cube 6 verfügt über drei Fluoreszenzdetektoren (FL1, FL2, FL3) für den 488 nm Laser und einem Fluoreszenzdetektor für den 638 nm Laser (FL4) und je einen Seitwärtsstreulicht- (SSC, engl.: *sideward scatter*) und Vorwärtsstreulichtdetektor (FSC, engl.: *forward scatter*). Das Licht, welches hinter dem Probenstrom in einem 180°-Winkel zum Laser detektiert wird, wird als Vorwärtsstreulicht (FSC) bezeichnet. Es liefert vor allem eine Aussage über die Größe des gemes-

Einleitung

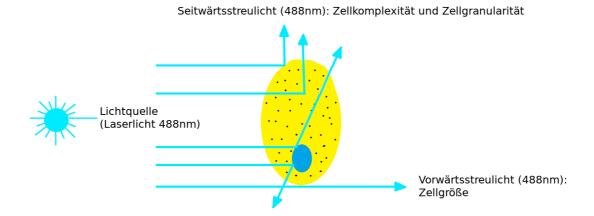


Abbildung 1.6.: Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC):

Das Vorwärtsstreulicht wird entlang der Achse $(1-10\,^\circ)$ des einfallenden Lichts gemessen und gibt eine Aussage über die Größe des gemessenen Partikels. Der Seitwärtsstreulichtdetektor detektiert das im 90 °-Winkel zum einfallenden Licht gestreute Licht und ermöglicht es Aussagen über die Komplexität und Granularität des gemessenen Partikels zu treffen. (Graphik angelehnt an BDBIOSCIENCES Schulungsunterlagen zur Flusszytometrie)

senen Partikels. Das von dem Partikel abgestreute Licht wird in einen Winkel von 90° zum Eintrittwinkel detektiert und als Seitwärtsstreulicht (SSC) bezeichnet. Es ermöglicht eine Aussage über die Beschaffenheit und Granularität des Partikels (siehe Abb. 1.6). Bei den optischen Filtern handelt es sich beim CUBE 6 um sogenannte Bandpassfilter. Das heißt, sie beschränken den Lichtdurchlass auf einen Bereich ± einer definierten Wellenlänge (siehe Tab. 1.1). Die Photodetektoren wandeln optische Signale (Photonen) in elektrische Signale (Spannungspulse) um. Die Pulshöhe, also die Spannung, die erzeugt wird, wenn ein Partikel den Laserstrahl passiert, definiert hierbei die Fluoreszenzintensität des Partikels. Das CUBE 6 kann Partikel beziehungsweise Zellen mit einer Größe von 0,2-50 µm analysieren. Dies ermöglicht die Analyse von zum Beispiel Blutzellen, Algen, Bakterien, diversen tierischen Zelltypen und, wie in dieser Arbeit, Hefen.

1.5.1.2. Auswertung allgemein

Die ermittelten Daten werden in Tabellenform in einer sogenannten FCS-Datei abgespeichert. Hierin wird für jeden analysierten Partikel und für jeden Parameter ein Kanalwert abgelegt. Das CUBE 6 verfügt über 16.384 Kanäle, denen

die gemessenen Signale zugeordnet werden. Diese Werte werden im Messprogramm Cy Flow Software (SYSMEX PARTEC GMBH) und im Auswerteprogramm FCSExpress 4 (DE NOVO SOFTWARE, Los Angeles, USA) in Form verschiedener individuell definierter Plottypen dargestellt. Zur Populationsdetektion oder bei Verwendung von mehreren Fluoreszenzfarbstoffen gleichzeitig ist die Darstellung in sogenannten Dot-Plots sinnvoll (siehe Abb. 1.7). Hier wird jeder Partikel durch

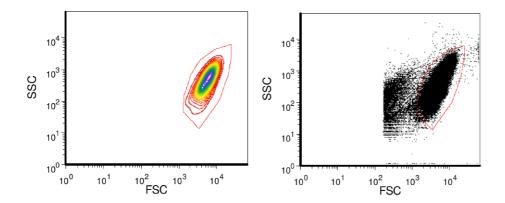


Abbildung 1.7.: Darstellung einer Messung als Dichtegradient beziehungsweise Dot-Plot:

Es ist jeweils FSC und SSC gegeneinander aufgetragen. Man erkennt eine Verdichtung der Zellen, die die analysierte Hefepopulation darstellt. Durch das Setzen eines FSC-Schwellenwertes werden Kleinstpartikel von der Messung ausgeschlossen.

einen Punkt in einem zweidimensionalen Koordinatensystem repräsentiert. Gibt es mehrere Partikel mit gleichen Parametern, überlagern sich diese. Die Anzahl von Partikeln mit gleichen Messparametern ist im einfachen Dot-Plot nicht erkennbar. Hier verwendet man eine Darstellung mit Dichtegradientenwolken oder unterschiedlich gefärbten Punkten im Dot-Plot. Benötigt man eine genauere graphische Information bezüglich der Anzahl gleich stark emittierender Partikel, ist die Darstellung in einem Histogrammplot sinnvoll (siehe Abb. 1.8). Ein Histogrammplot zeigt immer nur die von einem Detektor gemessenen Werte. Dargestellt wird jeweils die Anzahl der Partikel pro Kanal.

Durch das sogenannte Gating können einzelne Populationen von den restlichen gemessenen Partikeln abgegrenzt werden. Hierbei wird eine Population mit einem Gate eingerahmt und kann so ausgeschlossen beziehungsweise näher betrachtet werden (siehe Abb. 1.9). Gating ist sowohl in bivariaten Plots als auch in univariaten Histogrammen möglich. Mit der Kombination mehrerer Gates nacheinander lassen sich Populationen in mehrere Subpopulationen auftrennen. So ist auch

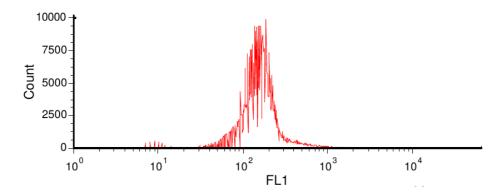


Abbildung 1.8.: Histogrammplot von FL1 einer Messung von FITC-gefärbten Hefezellen:

Dargestellt ist die Emissionsverteilung von 10.000 Partikeln als Einzelparameterhistogramm im FL1-Detektor

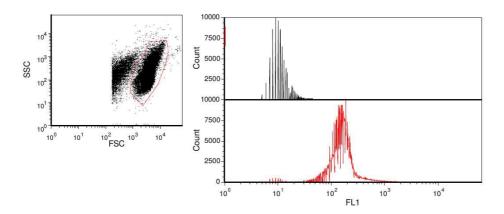


Abbildung 1.9.: Gating einer Hefepopulation im FSC/SSC-Plot und Darstellung des Gates im FL1-Histogramm: Die Population der Hefezellen ist im FSC/SSC-Plot deutlich zu erkennen. Mit der Umrahmung durch ein Gate kann diese Population getrennt von Zelltrümmern und anderen Partikeln auf ihre Fluoreszenz hin im Histogrammplot untersucht werden. Im FL1-Plot sind im oberen Bereich die Ereignisse der nonEuk-Kontrolle als Negativkontrolle angezeigt im unteren Bereich die gegateten Zellen der analysierten Probe, in diesem Fall Hefezellen mit gebundener Euk-Sonde.

eine Untersuchung von komplexem Probenmaterial, zum Beispiel Blut mit seinen unterschiedlichen Zelltypen, möglich. In dieser Arbeit wird Gating genutzt, um die Hefepopulation von Zelltrümmern und Trubpartikeln abzutrennen und somit nur die Fluoreszenz der Hefezellen zu betrachten.

1.5.2. Fluorochrome und Fluoreszenzmessung

Man kann Partikel beziehungsweise Zellen allein an Hand ihrer relativen Größe (FSC) und ihrer relativen Granularität und internen Komplexität (SSC) differenzieren. Um in Größe und Komplexität ähnliche Zellen zu unterscheiden, benötigt man jedoch zusätzlich die Hilfe von Fluorochromen. Diese werden mittels diverser Techniken an die zu untersuchenden Zellen gekoppelt. Die Kopplung der Fluorochrome kann indirekt über zum Beispiel mit Fluorochromen gekoppelte Antikörper oder RNA-Sonden erfolgen. Zellen können aber auch direkt mit Fluorochromen markiert werden. Dann erfolgt die Bindung zum Beispiel durch Interkalation mit der DNA oder Bindung an Strukturen der Zellwand.

Die Fluorochrome werden mittels des Laserlichtes im Flusszytometer angeregt (Exzitation) und dadurch auf ein höheres Energieniveau angehoben. Beim Zurückfallen in ein niedrigeres Energieniveau wird Energie in Form von Wärme, Lichtemission und Schwingungen frei. Durch die verlorene Energie in Form von Schwingungen und Wärme hat das emittierte Photon eine größere Wellenlänge. Die Energiedifferenz zwischen absorbiertem und emittiertem Licht bezeichnet man als Stokes Shift (Shapiro, 2003). Die Anzahl der gebundenen Fluorochrommoleküle pro Zelle sind dabei proportional zum emittierten Fluoreszenzlicht (siehe Abb. 1.10). Die relative Fluoreszenzintensität lässt sich hierbei nur geringfügig durch die Geräteeinstellungen beeinflussen.

Bei der Auswahl der verwendeten Fluorochrome spielt die Wellenlänge des monochromatischen Anregungslichtes des Lasers eine große Rolle. Das ausgewählte Fluorochrom sollte mit dem vorhandenen Laserlicht ausreichend angeregt werden können, um eine ausreichend hohe Fluoreszenzausbeute zu liefern. Auch die Emissionsbandbreite des Fluorochroms verdient Beachtung. Diese sollte innerhalb der Durchlässigkeit der vorhandenen Filter (siehe Tab. 1.1) liegen. Bei gleichzeitiger Färbung mit mehreren Fluorochromen muss sichergestellt sein, dass die Überstrahlungen in Nachbarkanäle gering ausfallen. Des Weiteren ist es notwendig, eine Kompensation durchzuführen (siehe Kapitel 1.5.2.2).

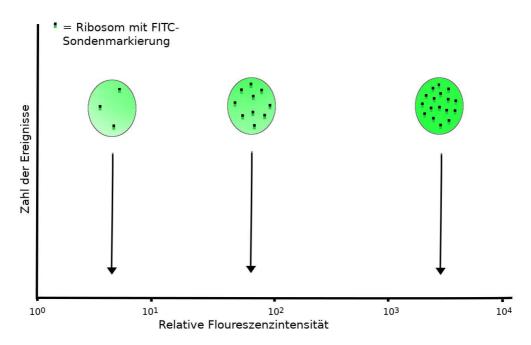


Abbildung 1.10.: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle:

Je mehr mit Fluorochromen markierte S-rRNA-Sonden an Ribosomen in der Hefezelle gebunden haben, desto höher ist die Fluoreszenzintensität. Die relative Fluoreszenzintensität lässt sich nur geringfügig mittels Geräteeinstellungen beeinflussen. (Graphik angelehnt an BDBIOSCIENCES Schulungsunterlagen zur Flusszytometrie)

Nicht immer ist die positive Population gut abtrennbar. Zeigt die negative Population eine geringe Fluoreszenzintensität, kann die positive Population gut abgegrenzt werden. Hat die negative Population jedoch eine hohe Fluoreszenzintensität, ist die Trennung von der positiven Population schwer. Hat die negative Population auch noch einen großen Variationskoeffizienten, ist eine Abgrenzung zur positiven Population allein durch Gating nicht möglich. Bei der negativen Population handelt es sich nicht nur um komplett unmarkierte und somit negative Partikel. Auch Zellen, die in einem anderen Fluoreszenzkanal positiv sind, können im betrachteten Kanal als negativ erscheinen. Bei Verwendung einer Negativkontrolle, also eine in der Versuchsreihe mitgeführte unmarkierte beziehungsweise negativ markierte Probe, können mittels der Technik der Overton-Substraktion (siehe Kapitel 1.5.3) nur die rechnerisch positiv markierten Zellen betrachtet werden.

1.5.2.1. Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

Fluoresceinisothiocyanat ist ein Derivat des Fluoresceins, an das eine reaktive Isothiocyanat-Gruppe konjugiert wurde (Abb. 1.11). Durch diese Gruppe kann FITC an Amine und Sulfhydrylgruppen von Proteinen binden. FITC ist somit gut für die Konjugation mit Antikörpern oder Nukleinsäuren geeignet und wird vielfältig für verschiedene Fluoreszenzmarkierungen verwendet (siehe unter anderem (Crissman u. Steinkamp, 1973, 1982; Coons u. Kaplan, 1950; Riggs et al., 1958; Ziomek, 1982).

Abbildung 1.11.: Struktur von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

Das Excitationsmaximum von FITC liegt bei 495 nm, was eine Anregung mit dem 488 nm-Laser des Flusszytometers ermöglicht. Das Emissionsmaximum liegt bei 519 nm und somit im grünen Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichts. FITC wird im FL1-Detektor des Flusszytometers detektiert. Durch die Breite seines Emissionsspektrums kommt es zusätzlich zu Überstrahlungen in die anderen Detektoren und damit zu dort fälschlicherweise positiven Signalen (siehe auch Abb. 1.12). Dies lässt sich rechnerisch durch die sogenannte Kompensation (siehe Kapitel 1.5.2.2) lösen, ist aber nur bei Verwendung mehrerer Farbstoffe gleichzeitig in einer Messung von Bedeutung.

FITC ist ein relativ kostengünstiger Farbstoff. Er neigt jedoch dazu, unter UV-Lichteinfluss recht schnell auszubleichen (Photobleaching). Es ist aus diesem Grund darauf zu achten, dass mit FITC gefärbte Proben möglichst wenig Tageslicht ausgesetzt werden und, dass die Analyse zügig erfolgt.

1.5.2.2. Kompensation

Auf Grund unterschiedlich breiter Emissionsspektren von Fluorochromen kann es zu Überlappungen der Spektren kommen (siehe Abb. 1.12). So wird zum Bei-

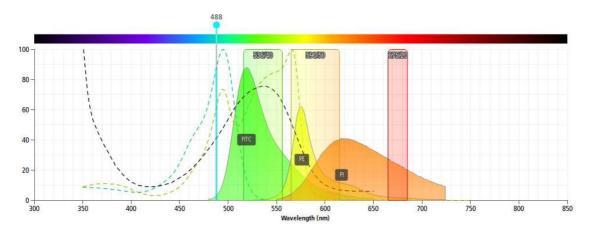


Abbildung 1.12.: Emissionsspektren drei häufig verwendeter Fluorochrome: Nach Anregung der Flurochrome mit Licht von 488 nm Wellenlänge werden Photonen mit einem breiten Wellenlängenbereich emittiert. Die so emittierten Photonen werden von mehreren Fluoreszenzdetektoren des Flusszytometers detektiert. Solche fälschlicherweise in mehreren Detektoren detektierten Signale sollen mittels den Kompensationeinstellungen vermindert werden.

(gestrichelte Linien: Absorptionssprektren; farbige Flächen: Emissionsspektren bei Anregung mit 488 nm; FITC: Fluoresceinisothiocyanat; PE: Phycoerythrin; PI: Propidiumiodid

(Grafik erstellt mit BD Fluoreszenz Spectrum Viewer; BDBIOSCIENCES)

spiel das von FITC emittierte Lichtsignal, welches lediglich im FL1-Detektor detektiert werden sollte, auch vom FL2-Detektor detektiert. Dies führt zu positiven FL2-Signalen, auch wenn kein in FL2 zu detektierendes Fluorochrom verwendet wurde. Wird zusätzlich ein in FL2 zu detektierendes Fluorochrom verwendet, wird dessen Signal fälschlicherweise erhöht. Mittels der Analysesoftware des Flusszytometers ist es möglich, die durch Überlappung der diversen Emissionsspektren entstehenden Signale von der tatsächlichen Emission des in diesem Kanal detektierten Fluorochromes zu substrahieren. Diesen Vorgang bezeichnet man als Kompensation. Manche Geräte, zum Beispiel das CUBE 6, ermitteln die Kompensation automatisch rechnerisch aus einer mehrfach gefärbten Probe. In dieser Arbeit wurde nur mit Einfachmarkierungen gearbeitet, so dass keine Kompensation notwendig war. Für die Möglichkeit der Nutzung von mehreren Sonden in einer

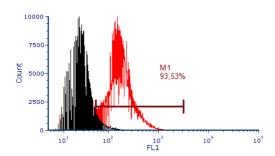
Probe hätte diese Thematik eine stärkere Relevanz.

1.5.3. Auswertung der Daten

Um mehrere Histogrammdaten zu vergleichen und die gewonnenen Daten auszuwerten, ist es notwendig, jedes einzelne Histogramm auf die Anzahl der fluoreszierenden Zellen oder die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen zu reduzieren. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen war es notwendig, den Fluoreszenzunterschied zur Negativkontrolle festzustellen.

Zur Bestimmung der positiven Zellen kann subjektiv ein Fluoreszenzlevel festgelegt werden, welches die nicht-fluoreszierenden von den fluoreszierenden Zellen trennt. Hierfür kann beispielsweise ein Marker an der Trenngrenze zwischen Negativkontrollpeak und Probenpeak gesetzt werden (siehe Abb. 1.13). Der Prozentsatz an positiven Zellen entspricht dann dem Anteil der Zellen, welche mindestens an diesem Niveau liegen. Dabei wird allerdings ein Teil der unspezifischen Bindungen der Negativkontrolle den als positiv gewerteten Zellen hinzugerechnet. Deutlich wird die Subjektivität der Markertrennung, wenn normierte und unnormierte Ereignisanzahlen betrachtet werden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Histogramme werden die Graphen in dieser Arbeit auf eine Partikelanzahl von 10.000 normiert. Das Setzen eines Markers führt so im Beispiel zu einer positiven Population von 93,5 % der gesamten Zellen (siehe Abb. 1.13 links). Wird auf das Normieren verzichtet und der Marker an derselben Trennlinie zwischen Negativkontrolle und Probenhistogramm gesetzt, werden nur noch 90,6 % der Zellen als positiv bewertet (siehe Abb. 1.13 rechts). Diese Unterschiede sind darauf zurückzuführen, dass die Beurteilung der Markerlage rein optisch in den Histogrammen erfolgt. Diese Methodik entspricht in etwa dem Beobachten und Einteilen fluoreszierender Zellen durch ein Fluoreszenzmikroskop. Sie ist ähnlich subjektiv und vom Können des Beobachters abhängig und somit auch ungenau. Diese Methode ist in der Analyse flusszytometrischer Daten üblich und wird auch in der Literatur zu Flow-FISH verwendet (Serpaggi et al., 2010). Weitere Möglichkeiten zur Auswertung einer Flow-FISH zusätzlich zur Overton-Substraktion sind in Kapitel 1.5.4 erläutert.

Für eine objektive Beurteilung der Fluoreszenzhistogramme gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine Möglichkeit ist, ab beispielsweise der intensitätsstärksten 2% der Kontrollzellen einen Marker zu setzen und alle Testzellen, die rechts dieses



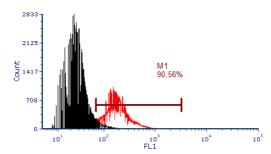


Abbildung 1.13.: Setzen eines Markers zur Auswertung flusszytometrischer Daten am Beispiel einer Flow-FISH-Analyse: Setzen eines Markers an der Trennlinie beider Populationen. Links mit Normierung der Populationen auf 10.000 Partikel; Rechts ohne Normierung der Populationen. Es ist deutlich zu erkennen, dass unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden. Das Ergebnis ist subjektiv, je nachdem wo der Marker gesetzt wird, ändert sich die Anzahl positiver Zellen.

Markers liegen, als positiv zu betrachten (Loar et al., 1986; Strong et al., 1982). Hier werden mit der Beispieldatei aus Abb. 1.13 70,7 % der Zellen als positiv gewertet (siehe Abb. 1.14). Ein Problem dieser Methode ist, dass sie bei Probenhistogrammen, welche das Kontrollhistogramm überlappen, den Anteil positiver Zellen unterschätzt (Overton, 1988).

Eine genauere Methode zur objektiven Beurteilung der Zellpopulation bietet die maximale positive Differenz. Hier wird jeweils das Kontrollhistogramm und das Testhistogramm vom zweiten bis zum letzten Kanal integriert. Der so ermittelte Prozentanteil an der Gesamtanzahl der analysierten Zellen des Histogramms der Negativkontrolle wird von dem Prozentanteil des Histogramms der Probe subtrahiert. Dieses Prozedere wird auch für die integrierten Histogramme vom dritten bis zum letzten Kanal und zwischen jedem weiteren Kanal und dem letzten Kanal durchgeführt. Wurde dies für alle Kanäle durchgeführt, wird die maximale positive Differenz ermittelt. Dieser Prozentsatz ist der Anteil der positiven Zellen an der Grundgesamtheit. (Overton, 1988)

Eine weitere Möglichkeit der objektiven Probenbeurteilung ist, das Kontrollhistogramm vom Testhistogramm Kanal für Kanal zu subtrahieren (Scher et al., 1980; Schipper et al., 1980). Bei der Kanal-von-Kanal-Subtraktion werden negative Differenzen als Wert Null gesetzt. Der Prozentanteil der positiven Zellen errechnet sich aus der Summe der Unterschiede aller Kanäle bezogen auf die Gesamtzellzahl der Probe (Overton, 1988).

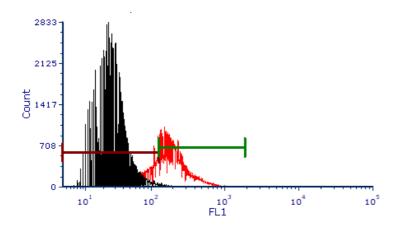


Abbildung 1.14.: Auswertung einer Flow-FISH-Analyse nach Markierung der hellsten 2% der Negativkontrolle

Overton (1988) entwickelte eine modifizierte Histogrammsubstraktionsmethode, die kumulative Substraktion, nach welcher auch in dieser Arbeit ausgewertet wurde. Die eingesetzte Auswertesoftware FCSExpress 4 (DENOVO SOFTWARE) führt diese Art der Substraktion standardmässig und automatisch aus. Im Unterschied zu der einfachen Histogrammsubstraktionsmethode (Scher et al., 1980; Schipper et al., 1980) wird für negative Unterschiede nicht generell der Wert Null angenommen. Stattdessen wird eine negative Differenz zu einer positiven Differenz im niedrigeren Kanal hinzugerechnet. Dies führt zu einer gegenseitigen Aufhebung von negativen Differenzen bei höheren Fluoreszenzintensitäten und von positiven Differenzen bei niedrigen Fluoreszenzintensitäten. Nach kumulativer Subtraktion aller Kanäle wird ein Histogramm erstellt, welches die positiven Differenzen zeigt, indem für jeden Kanal mit einer nach wie vor vorhandenen negativen Differenz der Wert Null gesetzt wird (siehe Abb. 1.15). Der Prozentanteil der positiven Zellen wird aus der Summe aller positiven Differenzen dividiert durch die Grundgesamtheit der Probe errechnet. (Overton, 1988) Bei einer Overton-Substraktion macht eine Normierung der dargestellten Partikelanzahl keinen Unterschied, da sie rechnerisch ermittelt wird. Mit der Beispielanalyse aus Abb. 1.13 und Abb. 1.14 werden mit Overton-Substraktion 81,85 % der Zellen als positiv gewertet (siehe Abb. 1.15). Bei dieser Form der Auswertung kann ein versehentliches Mitbewerten von unspezifischen Bindungen, beispielsweise beim Setzen von Markern, auf Grund der Methodik ausgeschlossen werden.

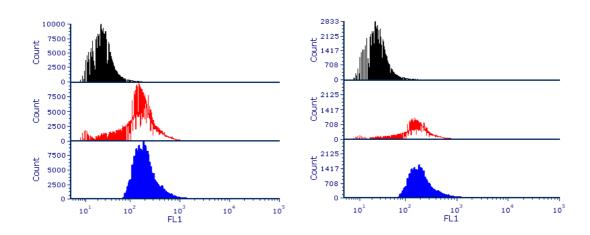


Abbildung 1.15.: Auswertung einer Flow-FISH-Analyse mittels Overton-Substraktion links: normierte dargestellte Partikelanzahl; rechts: unnormierte Partikelanzahl

1.5.4. Auswertung einer Flow-FISH in der Literatur

In der Literatur finden sich diverse Varianten eine flusszytometrisch durchgeführte FISH-Analyse auszuwerten. Die in dieser Arbeit verwendete Methode mittels Overton-Substraktion wird in Kapitel 1.5.3 vorgestellt.

Die einfachste Methode negativ von positiv hybridisierten Zellen zu trennen, besteht, wie schon in Kapitel 1.5.3 dargestellt, in dem Setzen eines Markers im Fluoreszenzhistogramm der analysierten Proben (Serpaggi et al., 2010). Diese Methode ist eher subjektiv und somit ungenau, da der Grenzwert willkürlich bestimmt wird, selbst wenn eine Negativkontrolle hinzugezogen wird. Häufig besteht die Negativkontrolle lediglich aus unmarkierten Zellen (Andorra et al., 2011; Serpaggi et al., 2010; Wang et al., 2014). Damit bleiben unspezifische Bindungen des Farbstoffes und etwaige unspezifische Reaktionen der Sonde unberücksichtigt.

Amann et al. (1990a) werten ihre Flusszytometriedaten über den Mode-Wert aus. Der Mode-Wert beschreibt den Wert, der das Maximum eines Histogramms anzeigt, das heißt an dem am meisten Messpunkte mit derselben Fluoreszenzintensität vorliegen. Eine quantitative Auswertung ist so schwer möglich. Inacio et al. (2003) analysieren 10.000 Zellen und ermitteln die Fluoreszenzintensität über den Mittelwert in einem Gate eines FSC-/FL1-Dotplots. Branco et al. (2019) legen auch ein Gate in einem FSC-/FL1-Dotplot, analysieren aber lediglich 1000 beziehungsweise 5000 Zellen je Probe. Als Negativkontrolle nutzen

1.6 Zielsetzung Einleitung

Branco et al. EUB338, eine an theoretisch alle Bakterien bindende universelle Sonde, wie auch Wallner et al. (1993) sie nutzen. Allerdings weisen Branco et al. (2019) in ihren Versuchen im Gegensatz zu Wallner et al. (1993) keine Bakterien sondern Hefen nach. Den Prozentanteil an fluoreszierenden Zellen errechnen Branco et al. (2019), indem sie die Summe der fluoreszierenden Zellen in der Negativkontrolle von denen der Probe subtrahieren und durch die Anzahl der analysierten Zellen dividieren. Auch Yilmaz u. Noguera (2004) analysieren 10.000 Zellen aber im FCS/SSC-Plot. Das Gate im Fluoreszenzhistogramm legen Yilmaz u. Noguera (2004) an Hand ihrer Negativkontrolle nonEUB (komplementär zu einer an nahezu alle Bakterien bindenden Sonde EUB338, Wallner et al., 1993). Die nonEUB-Sonde dient hierbei als Kontrolle, um unspezifische Bindungen auszuschließen (Yilmaz et al., 2006). Dies entspricht, bis auf die Auswertung durch das Gate an Stelle der Overton-Subtraktion, der in dieser Arbeit verwendeten Auswertung mit nonEuk-Negativkontrolle (siehe Kapitel 3.1.1 und Kosse et al., 1997).

1.6. Zielsetzung

Wilde Hefen, wie zum Beispiel *H. uvarum*, *D. bruxellensis* und *P. anomala*, tragen zur Entwicklung von Fehltönen und Fermentationschwierigkeiten bei der Weinherstellung bei. Sensorisch und optisch lässt sich eine Kontamination oft erst in späten Fermentationsphasen erkennen, wenn eine Schädigung des Endproduktes nicht mehr verhindert werden kann. Durch eine frühzeitige Detektion von unerwünschten Mikroorganismen kann eine Schädigung des Weines und ein daraus resultierender wirtschaftlicher Schaden für den Winzer möglicherweise verhindert werden.

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, auf Basis vorheriger Studien, eine effiziente flusszytometrische FISH-Analyse mittels rRNA-Sonden verschiedener häufig vorkommender Schadhefen zu entwickeln, zu validieren und für den Praxisgebrauch zu etablieren. Der Fokus liegt hierbei auf einer praxistauglichen Methodik für den Alltagsgebrauch im Weinlabor.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

2.1.1. Flusszytometer

Die flusszytometrische Auswertung erfolgte an einem CUBE 6 Flusszytometer (SYSMEX PARTEC GMBH, Münster), welches mit zwei Lasern mit 488 nm beziehungsweise 638 nm Anregungswellenlänge ausgestattet ist. Zur Detektion der Fluoreszenzemissionen werden Bandpassfilter mit einer Durchlässigkeit bei 536 / 40 nm (FL1), 590 / 50 nm (FL2) und 675 / 20 nm (FL3) Wellenlänge verwendet. Die Grundlagen zur Technik der Flusszytometrie sind der Einleitung zu entnehmen (siehe Kapitel 1.5). Die hier durchgeführten Analysen wurden, nach FITC-Markierung der Hybridisierungssonden, mit dem 488 nm Laser mit Auswertung im 536 / 40 nm (FL1) Filter durchgeführt. Die Flussrate während der Messungen betrug 1 µl / s bei einem Messvolumen von 50 µl.

2.1.1.1. Zellzählung mittels Flusszytometrie

Dank der festen Flussrate von 1 µl/s bei einem Messvolumen von 50 µl wurde während der Flow-FISH-Analysen (siehe Kapitel 2.4.4.5) parallel eine Zellzählung durchgeführt. Die Zellzahl wird als Zellen/ml angegeben.

2.1.2. Spektralphotometer

Die optische Dichte der Zellkulturen wurde mit dem Spektralphotometer Cary 100UV-Vis (AGILENT TECHNOLOGIES, Waldbronn) bestimmt. Für die Messungen wurden BRAND Mikroküvetten mit 8,5 mm Zentrumshöhe verwendet. Das Analysevolumen betrug 1 ml Flüssigkultur. Die Analyse erfolgte mit Licht von 600 nm

Wellenlänge bei einer Spektralbandbreite von 1,5 nm. Vor jeder Messung wurde eine Nullkalibration gegen den Diluenten, in dieser Arbeit Most beziehungsweise YPD-Medium, durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software VARIAN CARY WINUV ADVANCED READS APPLICATION.

2.1.3. Weitere Geräte und Materialien

In dieser Arbeit wurden des Weiteren die in Tab. 2.1 und Tab. 2.3 aufgeführten Geräte und Materialien verwendet.

Tabelle 2.1.: Weitere verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav VE-95	SYSTEC GMBH, Wettenberg
Fluoreszenzmikroskop	KEYENCE DEUTSCHLAND GMBH,
BZ-8000 BIOZERO	Neu-Isenburg
FTIR-Spektrometer	Foss GmbH, Hamburg
Foss Winescan FT120	
Inkubationshaube TH15	EDMUND BÜHLER GMBH, Hechingen
Magnetrührer D6010	NEOLAB MIGGE LABORBEDARFS-VERTRIEBS
	GмвH, Heidelberg
Mikroskop AXIO LAB A1	CARL ZEISS MICROSCOPY GMBH, Jena
Neubauer Zählkammer	KARL HECHT GLASWAREN GMBH,
ASSISTENT	Sondheim
pH-Meter FiveEasy FE20	METTLER-TOLEDO GMBH, Gießen
Präsizionswaage M-PACT	SARTORIUS AG, Göttingen
AX623	
Rotator-Mixer	ELMI SIA., Riga, Lettland
ELMI INTELLI-MIXER RM-2	
Schüttler KS15	EDMUND BÜHLER GMBH, Hechingen
Sicherheitswerkbank	ASTEC MICROFLOW, Hampshire,
	Großbritannien
Ultraschallbad SONOREX	BANDELIN ELECTRONIC GMBH & CO KG,
SUPER	Berlin

Gerät	Hersteller
Vortexer D6012	NEOLAB MIGGE LABORBEDARFS-VERTRIEBS
	GмвH, Heidelberg
Wasseraufbereitungsanlage	ELGA LABWATER, VWS DEUTSCHLAND
PURELAB FLEX	GмвH, Celle
Wasserbad WNE7-45	Меммект GмвН & Co KG, Schwabach
Zentrifuge HERAEUS PICO 17	THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., Waltham,
	USA
Zentrifuge ROTINE 420 R	ANDREAS HETTICH GMBH & CO KG,
	Tuttlingen

Tabelle 2.3.: Verwendete Materialien

Material	Hersteller
Deckgläser	GERHARD MENZEL GMBH, Braunschweig
Eppendorfgefäße 1,5 ml und	NEOLAB MIGGE LABORBEDARFS-VERTRIEBS
2 ml	GмвH, Heidelberg
Flusszytometerküvetten	BRAND GMBH & Co KG, Wertheim
Mikroküvetten,	BRAND GMBH & Co KG, Wertheim
8,5 mm Zentrumshöhe	
Objekträger	GERHARD MENZEL GMBH, Braunschweig
Röhrchen 10 ml und 15 ml	NEOLAB MIGGE LABORBEDARFS-VERTRIEBS
	GмвH, Heidelberg

2.2. Chemikalien

Für die Versuche dieser Arbeit wurden die in Tab. 2.4 aufgeführten Chemikalien verwendet.

Tabelle 2.4.: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Dekontaminationslösung	SYSMEX PARTEC GMBH, Münster
Flusszytometer (lila)	
Dextrose	VWR INTERNATIONAL GMBH, Darmstadt
Ethanol (<i>EtOH</i>), vergällt, 70 %	АРРІСНЕМ GMBH, Darmstadt
Ethanol (<i>EtOH</i>), 99,5 %	MERCK KGAA, Darmstadt
Glycerin	APPLICHEM GMBH, Darmstadt
Chlorwasserstoff (HCI)	APPLICHEM GMBH, Darmstadt
Hefeextrakt	АРРІСНЕМ GMBH, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCI)	APPLICHEM GMBH, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat	APPLICHEM GMBH, Darmstadt
(K_2HPO_4)	
Kaliumdihydrogenphosphat	АРРІСНЕМ GMBH, Darmstadt
(KH ₂ PO ₄)	
Kalibrationslösung pH-Meter	NEOLAB MIGGE LABORBEDARFS-VERTRIEBS
pH 4,0	GмвH, Heidelberg
Kalibrationslösung pH-Meter	NEOLAB MIGGE LABORBEDARFS-VERTRIEBS
pH 7,0	GмвH, Heidelberg
Natriumchlorid (NaCl)	APPLICHEM GMBH, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	АРРLICHEM GMBH, Darmstadt
(Na ₂ HPO ₄)	
Natriumazid (NaN)	MERCK KGAA, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	APPLICHEM GMBH, Darmstadt
Paraformaldehyd	АРРLICHEM GMBH, Darmstadt
Pepton	APPLICHEM GMBH, Darmstadt
Reinigungslösung	SYSMEX PARTEC GMBH, Münster
Flusszytometer (grün)	
Saponin	APPLICHEM GMBH, Darmstadt
Natriumlaurylsulat (SDS)	APPLICHEM GMBH, Darmstadt
Tris-HCI	АРРІСНЕМ GMBH, Darmstadt
Triton X-100	АРРІСНЕМ GMBH, Darmstadt

2.3. Puffer und Lösungen

2.3.1. PBS-Puffer

PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline) ist ein Standardpuffer in der Mikrobiologie. In dieser Arbeit wird er für diverse Wasch- und Verdünnungschritte und zum Ansetzen von Puffern verwendet. Die Zusammensetzung für einen Liter 1x PBS-Puffer ist wie folgt: 8 g NaCl (137 mM), 0,2 g KCl (2,7 mM), 1,44 g Na₂HPO₄ (20 mM) und 0,24 g KH₂PO₄ (1,8 mM) in 800 ml H_2O_{bidest} lösen, pH auf 7,2 einstellen und auf 1 l mit H_2O_{bidest} auffüllen.

2.3.2. YPD-Flüssigmedium

YPD-Flüssigmedium ist ein Standardmedium zur Kultivierung verschiedener Hefespezies in Supension. In dieser Arbeit wird es zur Anzucht der Hefevorkulturen verwendet. Die Zusammensetzung für einen Liter Medium ist wie folgt: 10 g Hefeextrakt (1 %), 20 g Pepton (2 %) und 20 g Dextrose (2 %), 1 l H_2O_{bidest} hinzufügen.

2.3.3. 20 % Formaldehydlösung

Zur Fixierung der Zellen wird eine 20%-ige Formaldehydstocklösung benötigt. Diese Lösung sollte möglichst frisch angesetzt werden und zum Zeitpunkt der Fixierung nicht älter als eine Woche sein. Es werden am Vortag der Fixierung 20 g Paraformaldehyd in 90 ml PBS-Puffer (siehe Kapitel 2.3.1) unter Rühren für 16 h bei 70 °C gelöst. Zur vollständigen Lösung bis zum Aufklaren werden danach einige Tropfen (4-5) 1 M NaOH zugegeben. Danach wird der pH auf 7,2 eingestellt und mit PBS-Puffer auf 100 ml aufgefüllt. Zur Lagerung verbleibt die Lösung lichtgeschützt bei Raumtemperatur.

2.3.4. Hybridisierungspuffer

Der Mastermix des Hybrisierungspuffers zur Flow-FISH setzt sich aus 0,9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl und 0,01 % (w/v) SDS zusammen. Zur Hybridisierung muss noch

mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Oligonukleotidsonde in gewünschter Konzentration (Standard: 3 pmol/µl) dazugegeben werden (siehe Kapitel 2.4.4.4).

2.3.5. Waschpuffer

Der Waschpuffer für den Waschschritt nach der Hybridisierung der Flow-FISH besteht aus 25 mM Tris-HCl und 0,5 M NaCl.

2.4. Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die in dieser Arbeit verwendete Fluoreszenz in situ Hybridisierung findet in der diagnostischen, ökologischen und technologischen Mikrobiologie ihre Anwendung. Auf die Hintergründe und Entwicklung dieser effizienten Methode vor allem in Bezug auf die Detektion von Mikrobiomen in verschiedenen Systemen wird in Kapitel 1.4 näher eingegangen.

2.4.1. Verwendete Hefestämme

Für die Experimente zur Etablierung der Flow-FISH wurden Reinkulturen des DSMZ (LEIBNIZ-INSTITUT DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH, Braunschweig) verwendet. Der verwendete *Hanseniaspora uvarum* Stamm (DSM 26650) hat seinen Ursprung in Chardonnay-Most. Auch der verwendete *Saccharomyces cerevisiae* Stamm (DSM 70416) wurde ursprünglich aus Traubenmost isoliert. Durch Nutzung von Stammsammlungsstämmen kann sichergestellt werden, dass die Versuche mit einer Reinkultur von *Hanseniaspora uvarum* durchgeführt werden und keine anderen Organismen die Hybridisierungseffizienz beeinflussen. Da die Stämme ursprünglich aus Wein beziehungsweise Most isoliert wurden, ist eine Vergleichbarkeit mit der Praxis gegeben. Für die Validierung der Flow-FISH-Methode (siehe Kapitel 3.7) wurden Wildisolate aus der Stammsammlung des DLR Rheinpfalz beziehungsweise kommerziell erhältliche Hefestämme verwendet.

Weitere Validierungsversuche wurden mit anderen Hefearten und den jeweiligen FISH-Sonden (Roeder et al., 2007; Xufre et al., 2006) durchgeführt (siehe

Tab. 2.6). Die *H. uvarum*-Stämme H32-35 wurden von Christian von Wallbrunn zur Verfügung gestellt. Es wurde darauf geachtet, dass die Hefen, wenn möglich, ursprünglich aus Trauben oder Traubenmost isoliert wurden, um eine Vergleichbarkeit mit in Weinfermentationen nativ vorkommenden Hefen zu gewährleisten. Die Etablierungs- und Validierungsversuche wurden vorrangig mit Stämmen aus kommerziellen Stammsammlungen durchgeführt.

Tabelle 2.6.: Verwendete Hefestämme

Hefestamm	interne Bez.	Stammsammlungsnr.	isoliert aus
Hanseniaspora uvarum	H30	DSM 26650	Traubenmost
	H32 12-SB-MG-G2-Spe-1		
	H33	12-SB-MG-G2-Spe-5	
	H34	12-SB-MG-G2-Spe-62	
	H35	12-SB-MG-G2-Spe-67	
Saccharomyces cerevisiae	H38	DSM 70416	Traubenmost
	H5	Schwarzenbach 1895-A	Wein (1895 Jahrgang)
	Reinzuchthefe	Lalvin CY3079	
	Reinzuchthefe	Fermicru VB1	
	Reinzuchthefe	Uvaferm 228	
	Reinzuchthefe	Lalvin EC1118	
Pichia anomala	H54	DSM 70130	Brauerei
Dekkera bruxellensis	Dekkera bruxellensis H36		Lambic Bier
	H43	AWRI 1499	Wein

Aus den gefriergetrockneten Stammkulturen wurden Glycerinkulturen für die hausinterne Stammsammlung angelegt. Die Kulturen werden bei -80 °C gelagert und in regelmäßigen Abständen durch Rekultivierung erneuert.

2.4.2. Probenvorbereitung/Zellkulturen

Die ersten Validierungen wurden aus Hefezellkulturen in YPD-Medium (siehe Kapitel 2.3.2) durchgeführt. Als Most für die Hefezellkulturen im Laufe der weiteren Validierung wurde Most der Rebsorte Chardonnay, Jahrgang 2013 verwendet. Kurz nach Keltern und Schönen wurde dieser Most für zwei Minuten bei 76 °C pasteurisiert und in 5 Liter-Gebinden steril abgefüllt und bis zur Verwendung kühl und im Dunkeln gelagert. Vor der Verwendung wird der Most steril filtriert (0,22 µm), um so mögliche Kontaminationen ausschließen zu können.

Als Vorkultur werden 50 ml YPD-Medium oder pasteurisierter Most mit 50 μ l einer Glycerinreinkultur versetzt und über Nacht inkubiert (150 rpm, 30 °C). Die Hauptkultur aus 100 ml sterilem Medium beziehungsweise Most wird mit 400 μ l der Vorkultur angeimpft und unter kontinuierlichem Schütteln (150 rpm) bei 30 °C bis zum Erreichen der gewünschten Wachstumsphase inkubiert. Für die Validierungen wurden, sofern nicht anders erwähnt, Proben während der mittleren logarithmischen Wachstumsphase der Zellkultur entnommen (OD_{600} 1,0) und fixiert. Bei H. uvarum ist diese Phase des Kulturwachstums unter den gegebenen Bedingungen in etwa nach 5,5 h erreicht.

2.4.2.1. Erstellung von Wachstumskurven

Als erster Schritt zur Etablierung wurde eine Wachstumskurve der verschiedenen Hefearten mit Kultivierung bei 30 °C in Reinkultur in YPD-Flüssigmedium erstellt. Hierfür wurde die OD_{600} zu mehreren Zeitpunkten photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.1.2) und die Zellzahl der Flüssigkultur flusszytometrisch ermittelt bis eine stationäre Wachstumsphase erreicht war. Nach Erstellung der Wachstumskurven konnten die Zeitpunkte bestimmt werden, wann die Kulturen ungefähr ihre lag-, log- oder stationäre Phase erreicht haben sollten (siehe Kapitel 3.3). So konnte die gewünschte Wachstumsphase genau abgepasst werden und die Hybridisierungen immer in der gleichen Wachstumsphase der Kultur ausgeführt werden. Ein Einfluss der Wachstumsphase der Zellen auf die Hybridisierungseffizienz kann so ausgeschlossen werden. Vor Entnahme der Zellen zur Fixierung wird die OD_{600} der Kultur bestimmt.

2.4.3. Zellfixierung

Die in YPD-Flüssigmedium angezogenen Zellen, werden, nachdem die OD_{600} der Kultur spektralphotometrisch bestimmt wurde, entnommen und auf verschiedene Art und Weise fixiert.

2.4.3.1. Fixierung mit Formaldehyd

Die Fixierung der Hefezellen erfolgt mittels Paraformaldehyd, wie von Andorra et al. (2011) beschrieben, mit einer 4%-igen Formaldehydlösung nach einem in

Anlehnung an Andorra et al. (2011) modifiziertem Protokoll. Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Zellen für die in dieser Arbeit vorgestellten Analysen wie folgt fixiert:

Für die Fixierung mit Formaldehyd werden 32 ml Probe mit 8 ml 20%-iger (w/v) Formaldehydlösung versetzt (Endkonzentration 4 % Formaldehyd) und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt beziehungsweise auf dem Rotator Intelli-Mixer mit 20 rpm über Kopf gedreht. Als Formaldehydlösung wird eine maximal eine Woche alte, aus Paraformaldehyd und PBS angesetzte Stocklösung verwendet (siehe Kapitel 2.3.3). Nach Abzentrifugieren des Überstandes (4500 rpm, 5 min) werden die Zellen zweimal mit 10 ml PBS (pH 7,2) gewaschen (4500 rpm, 5 min). Nach Resuspendieren in 10 ml PBS können die fixierten Hefezellen bis zu drei Wochen bei 4 - 8 °C gelagert werden. Auch eine Lagerung über einen längeren Zeitraum ist, in 6 % (w/v) Saccharose in PBS zur Stabilisierung, bei -20 °C möglich, wie in Vorversuchen bestätigt wurde.

2.4.3.2. Fixierung in Ethanol

Für eine einfache Ethanolfixierung wurde mit in 70%-igem Ethanol fixierten Zellen gearbeitet. Hierfür werden 32 ml Probe abzentrifugiert (5 min, 4500 rpm) und der Überstand verworfen. Danach wird einmal in 10 ml PBS gewaschen (4500 rpm, 5 min) und das Pellet in 10 ml 70%-igem Ethanol resuspendiert. Die Lagerung erfolgt bei 4-8 °C. Nach 24 h ist die Fixierung abgeschlossen und das Ethanol kann ausgewaschen werden. Eine weitere Lagerung bis zur Hybridisierung erfolgt in PBS bei 4-8 °C.

2.4.3.3. Fixierung mit aufsteigender Ethanolreihe

Für die Fixierung über eine mehrschrittige Alkoholreihe werden 32 ml Probe pelletiert (5 min, 4500 rpm). Das Zellpellet wird in 10 ml 50%-igem Ethanol resuspendiert und bei 4-8 °C für 60 min inkubiert. Anschließend wird die Probe abzentrifugiert (5 min, 4500 rpm) und in 10 ml 60%-igem Ethanol resuspendiert und erneut 60 min bei 4-8 °C inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren (5 min, 4500 rpm) wird das Pellet in 10 ml 70%-igem Ethanol aufgenommen, resuspendiert und bei 4-8 °C 24 h inkubiert. Danach wird die Fixierung pelletiert und in 10 ml PBS resuspendiert, um die Zellen zu rehydrieren. Die Verkürzung der jeweiligen Inkuba-

tionszeiten von 60 min auf 30 min ist möglich und wurde durch Versuche im Laufe dieser Arbeit bestätigt (siehe Kapitel 3.1.4). Die weitere Lagerung der Zellen bis zur Hybridisierung erfolgt bei 4-8 °C.

2.4.4. Detektion von Schadhefen mittels flusszytometerbasierter Fluoreszenz in situ Hybridisierung (Flow-FISH)

Aus Vorarbeiten und der Literatur stehen verschiedene Herangehensweisen zur Etablierung einer flusszytometrisch basierten Fluoreszenz in situ Hybridisierung zur Verfügung (Andorra et al., 2011; Amann et al., 1990a; Branco et al., 2019; Serpaggi et al., 2010; Wallner et al., 1993; Wang et al., 2014) (siehe auch Kapitel 1.4.6).

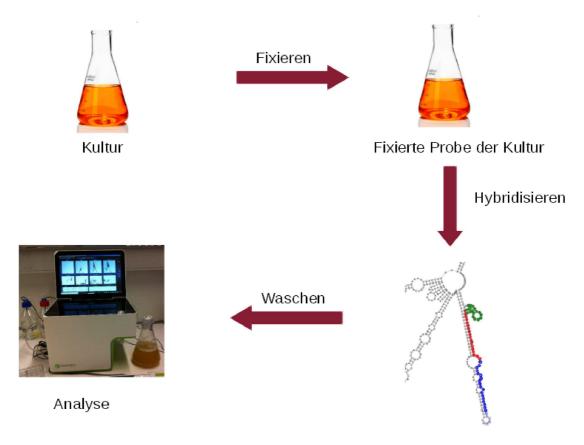


Abbildung 2.1.: Schematischer Arbeitsablauf zur Durchführung eines FISH-Assays

2.4.4.1. Ablauf eines FISH-Assays

Zur Erstellung von Hefekulturen für die Etablierungsversuche werden Hefezellen aus Glycerinkulturen in Nährmedium beziehungsweise in Most kultiviert und mittels Formaldehyd oder Ethanol fixiert. Wenn nicht anders erwähnt, werden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet ($OD_{600}=0,9-1,1$). Die fixierten Zellen (siehe Kapitel 2.4.3) werden mit der jeweiligen spezifischen Sonde hybridisiert und nach einem darauf folgenden Waschschritt (siehe Kapitel 2.4.4.4) am Flusszytometer analysiert (siehe Kapitel 2.4.4.5). Der schematische Ablauf eines Flow-FISH-Assays ist in Abb. 2.1 dargestellt.

2.4.4.2. FISH-Sonden

Die Sequenz und Herkunft aller Sonden ist Tabelle 2.7 zu entnehmen. Die Vorgänge zur Entwicklung der spezifischen Sonden und weitere Informationen sind in Kapitel 1.4.3 näher erläutert. Die verwendeten Sonden wurden von BIOMERS GMBH, Ulm synthetisiert und am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Zur Validierung des Testsystems erfolgte die Markierung aller Sonden mit dem gleichen Farbstoff. Hierfür wurde Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gewählt. Es ist mit dem verwendeten Laser ($\lambda=488\,\mathrm{nm}$) des Flusszytometers und mittels Fluoreszenzmikroskop gut anregbar und die Konjugate sind preiswert in der Herstellung.

Tabelle 2.7.: Verwendete hefespezische DNA-Sonden

Spezies	Sondenbez.	Sequenz (5'-3')	Quelle
Eukaryonten	Euk516	ACCAGACTTGCCCTCC	Amann et al. (1990a)
(Permeabilisierungs-			
kontrolle)			
unspezifisch	Non-Euk516	GGAGGGCAAGTCTGGT	Kosse et al. (1997)
(Negativkontrolle)			
Hanseniaspora	Huv	TCAATCCCGGCTAACAGTA	Xufre et al. (2006)
uvarum			
Saccharomyces	Sce	TGACTTACGTCGCAGTCC	Xufre et al. (2006)
cerevisiae			
Pichia anomala	Pan	GACAGGCAATATCAGCAGA	Xufre et al. (2006)
Dekkera bruxellensis	Dbrux1.1	CGTCTAGGCTCGCCGT	Roeder et al. (2007)
Dennera bruxerierisis	Dbrux1.2	CAAGACCCTTCTCCCAACA	Roeder et al. (2007)

Als Positivkontrolle für die Hybridisierbarkeit und erfolgreiche Permeabilisierung der Zellen wird eine an alle eukaryontischen Zellen bindende 18S-rRNA-Sonde verwendet (Amann et al., 1990a), welche auch mit FITC markiert ist (Euk516). Als Negativkontrolle dient eine nicht an Hefezellen bindende FITC-markierte Sonde, wie Kosse et al. (1997) vorschlagen. Hierbei handelt es sich um eine Oligonukleotidsonde aus der komplementären Sequenz zu Euk516, nonEuk. Bis auf die Euk516-Sonde, die an die 18S-rRNA bindet, binden alle anderen Sonden an die 26S-rRNA.

2.4.4.3. Hilfssonden

Zur Erhöhung der Fluoreszenzintensität wurden im Laufe dieser Arbeit unmarkierte Hilfssonden entwickelt. Das Prinzip der Hilfssonden ist in Kapitel 1.4.5 erläutert. In Kapitel 3.2.1 finden sich die Grundlagen zur Erstellung und Auswahl der passenden Hilfssonden. In Tab. 2.8 sind die verschiedenen Hilfssondensequenzen für *H. uvarum* aufgeführt. Die entprechenden Hilfsondensequenzen für

Tabelle 2.8.: Basensequenzen der Hilfssonden für die Flow-FISH-Detektion von *H. uvarum*: Üblicherweise sind die Hilfssonden 18 bp lang. Bei der langen (L) Version der Hilfssonden ist die Schmelztemperatur der Hilfssonde höher als bei der spezifischen Sonde.

Sondenbezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Huv	TCAATCCCGGCTAACAGTA
HuvH1	CTTGCCGAAGCGCAGTCC
HuvH2	TTCCAAAAAGCTATAACA
HuvH2L	TTCCAAAAAGCTATAACACTACCG
HuvH3	AACCATTATGCCAACATC
HuvH3L	GCATTTAACCATTATGCCAACATC
HuvH4	CTACCGAAGTAGCTACAT
HuvH4L	CTACCGAAGTAGCTACATTCTTAATG
HuvH5	ACATCCTTGCCGAAGCGC
HuvH6	AAAAGCTATAACACTACC
HuvH6L	AAAAGCTATAACACTACCGAAGTAG
HuvH7	TCCTGCTGCCAGAATTGA

S. cerevisiae sind in Tab. 2.9 zu finden. Tab. 2.10 zeigt die Sequenzen der Hilfssonden für D. bruxellensis und Tab. 2.11 die Hilfssondensequenzen für P. anomala.

Tabelle 2.9.: Basensequenzen der Hilfssonden für die Flow-FISH-Detektion von *S. cerevisiae*: Üblicherweise sind die Hilfssonden 18 bp lang.

Sondenbezeichnung	Sequenz (5'-3')
Sce	TGACTTACGTCGCAGTCC
SceH1	CCATTATGCCAGCATCCT
SceH2	TCAGTCCCAGCTGGCAGT

Tabelle 2.10.: Basensequenzen der Hilfssonden für die Flow-FISH-Detektion von *D. bru- xellensis:* Üblicherweise sind die Hilfssonden 17 bp (Dbrux1.1) beziehungsweise 19 bp (Dbrux1.2) lang. Bei der langen (L) Version der Hilfssonden ist die Schmelztemperatur der Hilfssonde höher als bei der spezifischen Sonde.

Sondenbezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Dbrux1.1	CGTCTAGGCTCGCCGT
Dbrux1.2	CAAGACCCTTCTCCCAACA
Dbrux1.1H1	GGTGGAAACCACCGCAC
Dbrux1.1H1L	GGTGGAAACCACCGCACACA
Dbrux1.1H2	CTGGTGCCTGTTATCGG
Dbrux1.1H2L	AGGCTGGTGCCTGTTATCGG
Dbrux1.2H1	ACCCACTCTGCCCGACCCT
Dbrux1.2H2	ACAGCTATCTCCTCCTCCG
Dbrux1.2H2L	TGCACAGCTATCTCCTCCTCCG

Tabelle 2.11.: Basensequenzen der Hilfssonden für die Flow-FISH-Detektion von *P. anomala:* Üblicherweise sind die Hilfssonden 19 bp lang. Bei der langen (L) Version der Hilfssonden ist die Schmelztemperatur der Hilfssonde höher als bei der spezifischen Sonde.

Sondenbezeichnung	Sequenz (5'-3')
Pan	GACAGGCAATATCAGCAGA
PanH1L	AGCTATAACACTCCACCGAAGT
PanH2	AGACGCAGCCCTCGATCCA

2.4.4.4. In situ Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgt größtenteils nach der von Andorra et al. (2011) beschriebenen Vorgehensweise. Aus Gründen der einfacheren Pipettierbarkeit wird mit 2*10⁶ Zellen je Ansatz gearbeitet. Im Laufe der Etablierung wurden einige kleine Veränderungen an der Methodik vorgenommen. Wenn nicht anders erwähnt, wurde nach der hier beschriebenen Methode gearbeitet.

Für die Hybridisierung werden der Fixierung je Ansatz $2*10^6$ Zellen entnommen und abzentrifugiert (9000 rpm, 2 min). Die Versuche werden jeweils als Triplikate ausgeführt. Der Zelltiter wird hierfür vorher aus der Zellfixierung flusszytometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.1.1.1). Der Hybridisierungspuffer wird vorgewärmt. Aus dem Puffer und der jeweils gewünschten Sonde wird ein Mastermix in ausreichender Menge angesetzt. Die Sondenkonzentration wurde im Laufe der Versuche mehrmals verändert. Als ideal hat sich eine Sondenkonzentration von 3 pmol/μl erwiesen. Das Pellet wird in 100 μl Mastermix resuspendiert und bei 41 °C und 350 rpm inkubiert. Auch die Inkubationsdauer wurde im Laufe der Versuche zur Optimierung des Verfahrens variiert. Wenn nicht anderes vermerkt ist, wurde 18 h über Nacht inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation werden die Zellen abzentrifugiert (9000 rpm, 2 min) und in doppeltem Volumen (200 μl) Waschpuffer gewaschen (30 min, 41 °C, 350 rpm). Nach Abzentrifugieren (9000 rpm, 2 min) werden die Zellen in 1600 μl PBS resuspendiert und flusszytometrisch vermessen.

2.4.4.5. Flusszytometrische Analyse

Jeder Hybridisierungsansatz wird mittels der Cy Flow Software (SYSMEX PARTEC GMBH) analysiert. Die Analyse erfolgt mit einem Messprogramm, welches genau $50\,\mu l$ mit einer Geschwindigkeit von $1\,\mu l/s$ je Probe misst und somit auch zu quantitativen Aussagen verwendet werden kann.

2.4.4.6. Auswertung

Die Auswertung erfolgt mit FCSExpress 4 (DE NOVO SOFTWARE, Los Angeles, USA). Die Berechnungen erfolgten jeweils über die Gesamtzahl der in 50 µl gemessenen Zellen, die Gesamtzahl der in Histogrammen dargestellten Zellen wurde auf eine Anzahl von 10.000 Zellen begrenzt.

Der Anteil positiver Zellen wurde mittels Overton-Subtraktion ermittelt. Die Grundlagen zur Technik der Overton-Subtraktion sind in der Einleitung zu finden (siehe Kapitel 1.5.3). Weitere in der Literatur verwendete Auswertearten sind in Kapitel 1.5.4 dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Optimierung der Hybridisierungsbedingungen

Grundlage zur Entwicklung eines Flow-FISH Assays ist hauptsächlich die Arbeit von Andorra et al. (2011). Für einen möglichst effektiven Flow-FISH Assay werden die Hybridisierungsbedingungen auf Basis der von Andorra et al. (2011) durchgeführten Arbeiten und Vorversuchen zu dieser Arbeit, im Rahmen der von mir betreuten Masterthesis von Christian Vogelei (Vogelei, 2014), zu einem fluoreszenzmikroskopischen FISH-Nachweis von Weinhefen am Beispiel von *H. uvarum*, optimiert. Ein direkter Nachbau des Protokolls von Andorra et al. (2011) brachte nicht die gewünschten Ergebnisse (Vogelei, 2014).

3.1.1. Negativkontrolle

Um ein effektives Testsystem zu entwickeln, benötigt man eine zuverlässige Negativkontrolle, die dazu dient, unspezifische Bindungen und anderweitige Reaktionen der spezifischen Sonden herauszurechnen. In dieser Arbeit wird zu diesem Zweck eine zu der Eukaryonten (Euk516)-Sonde komplementäre FITC-markierte Sonde (nonEuk) nach der Idee von Kosse et al. (1997) und Wallner et al. (1993) verwendet.

In Abb. 3.1 ist zu sehen, dass die Existenz von Eukaryonten in der Probe, hier *H. uvarum* in Reinkultur, mit Hilfe der Eukaryontensonde (Euk), welche alle eukaryontischen Zellen markiert, mit einer Effektivität von 83,6 % nachgewiesen werden kann. Im weiteren Verlauf kann durch Methodenoptimierungen eine Nachweiseffektivität der Euk-Sonde von 91,5 % bei *H. uvarum* erreicht werden. Ein spezifischer Nachweis von *Hanseniaspora uvarum* ist mit Hilfe der Huv-Sonde mit einer Effektivität von 79,8 % möglich. Im weiteren Verlauf der Etablierung können hier Nachweisraten von bis zu 94,7 % unter Verwendung von Hilfssonden

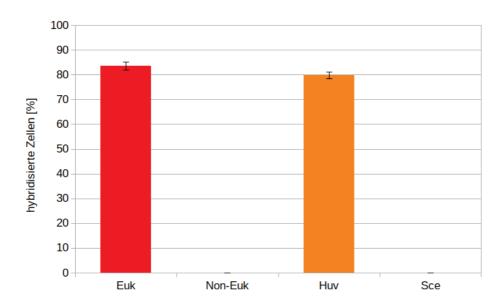


Abbildung 3.1.: Prozentuale Anteile der hybridisierten Zellen von *H. uvarum* nach Berücksichtigung des FITC-induzierten Hintergrundrauschens: Die *H. uvarum*-Zellen werden mit den spezifischen Sonden Euk und Huv, der Negativkontrolle (nonEuk) und der Sce-Sonde hybridisiert dargestellt; n = 3 - Daten aus Masterthesis Christian Vogelei

(siehe Kapitel 3.2.1) erreicht werden. Die *S. cerevisiae-Sonde* (Sce) zeigt in einer *H. uvarum-*Reinkultur, wie erwartet, kein Signal (siehe Abb. 3.1). Die Ergebnisse sind mit den Kreuzreaktivitäten der spezifischen Sonden mit den in dieser Arbeit entwickelten Hilfssonden (siehe Kapitel 3.2) vergleichbar (siehe Abb. 3.27).

3.1.2. Optimierung von Temperatur, Sondenkonzentration und Inkubationsdauer der Hybridisierung

Nach Einführung der Negativkontrollsonde (siehe Kapitel 3.1.1) werden die Test-parameter Hybridisierungstemperatur, Sondenkonzentration und Inkubationsdauer der Hybridisierung optimiert. Dies dient dazu, ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen und die optimalen Hybridisierungsbedingungen zu ermitteln. Nach Wallner et al. (1993) sind diese drei Faktoren relevant für eine erfolgreiche Hybridisierung. Es werden aufsteigende Sondenkonzentrationen von 1,5 pmol/µl, 3,0 pmol/µl und 6,0 pmol/µl bei drei unterschiedlichen Hybridisierungstemperaturen (41 °C, 46 °C und 51 °C) untersucht. Des Weiteren wird die Hybridisierungszeit zwischen 60 min, 180 min und 960 min variiert. Weitere unter-

suchte Hybridisierungszeiten sind 3 h, 4 h und 5 h und 16 h, 18 h, 20 h und 22 h (siehe 3.3). Eine Sondenkonzentration von 1,5 pmol/µl bei einer Hybridisierungstemperatur von 46 °C entspricht dabei in etwa der in der Arbeit von Andorra et al. (2011) verwendeten Konzentration von 10 ng/µl.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3.2 dargestellt. Es zeigt sich, dass mit einer Hybridisierungstemperatur von 41 °C bei allen verwendeten Sondenkonzentrationen bei der längsten Hybridisierungszeit von 960 min und bei einer Sondenkonzentration von 3 pmol/µl beziehungsweise 6 pmol/µl eine Hybridisierungseffizienz von 89,7 % beziehungsweise 88,2 % erreicht wird. Bei einer Sondenkonzentration von 1,5 pmol/µl werden hier nur 77,9 % Hybridisierungseffizienz erreicht. Bei einer Hybridisierungsdauer von 180 min kann eine maximale Hybridisierungseffizienz von 24,8 % bei der höchsten Sondenkonzentration erreicht werden. Bei einer Hybridisierungszeit von 60 min bewegt sich die Effizienz in einem Bereich von 1,4 % - 3,7 %.

Bei einer Hybridisierungstemperatur von 46 °C wird, bei einer Hybridisierungsdauer von 960 min, bei allen drei Sondenkonzentrationen eine Hybridisierungseffizienz von über 82 % (85,7 %; 84,3 % und 82,3 %) erreicht. Auch bei einer Hybridisierungszeit von 180 min steigen die Effizienzen auf einen Bereich von 30,3 % - 58,9 % an. Mit der kürzesten Hybridisierungsdauer von 60 min können nur mit der höchsten Sondenkonzentration Werte von 39,3 % Hybridisierungseffizienz erreicht werden, bei den beiden niedrigeren Konzentrationen liegen die Effizienzen nach wie vor in einem Bereich von 1,5 % - 5,2 %.

Bei einer Hybridisierungstemperatur von 51 °C werden, bei einer Hybridisierungsdauer von 180 und 960 min, Effizienzen von 52,3 % beziehungsweise 76,9 % erreicht. Bei der kürzesten Hybridisierungsdauer von 60 min steigt die Hybridisierungseffizienz auf Werte von 12,4 % - 33,7 % mit steigender Sondenkonzentration an. Es kommt zu einer Verstärkung unspezifischer Bindungen, was sich in einer gesteigerten Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle erkennen lässt (Ergebnis nicht graphisch dargestellt).

An Hand dieser Versuchsergebnisse werden die Standardhybridisierungsbedingungen für die weiteren Etablierungsversuche auf eine Dauer von 16 h (960 min) bei 41 °C mit einer Sondenkonzentration von 3 pmol/µl festgesetzt.

Zur Zeitdauer der Hybridisierung wurden weitere Versuche durchgeführt (siehe Abb. 3.3), da auch diese zur Effektivität des Assays beiträgt. Senkt man die Hybridisierungsdauer auf 5 h, 4 h beziehungsweise 3 h kann mit der spezifischen

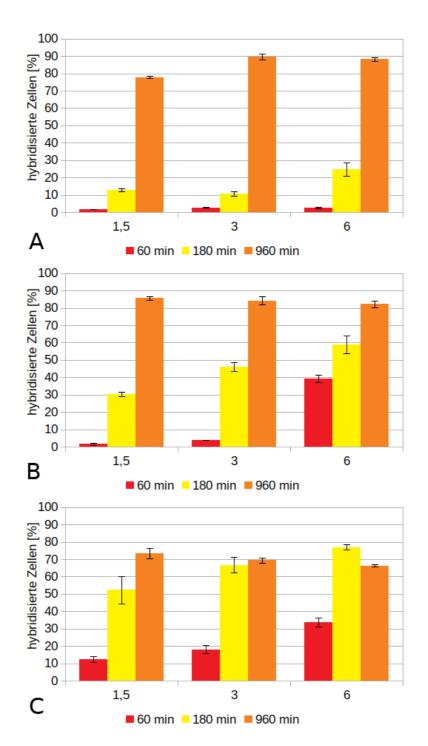


Abbildung 3.2.: Auswirkung der Hybridisierungstemperatur, Sondenkonzentration und Hybridisierungsdauer auf den Anteil mit Huv-Sonde hybridisierter Zellen von H. uvarum: Hybridisierung bei A 41 °C, B 46 °C, C 51 °C. Hybridisierungszeit: rot: 60 min; gelb: 180 min; orange: 960 min; n=3 - Daten aus Masterthesis Christian Vogelei

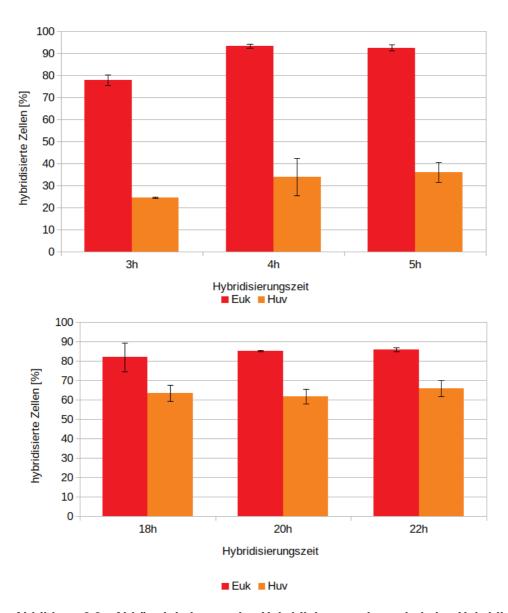


Abbildung 3.3.: Abhängigkeit von der Hybridisierungsdauer bei der Hybridisierung von *H. uvarum*: n = 3

Huv-Sonde nur noch eine Hybridisierungseffizienz von maximal 36% erreicht werden. Im Vergleich zu drei Stunden Inkubation führt eine Verlängerung der Inkubationszeit auf vier beziehungsweise fünf Stunden lediglich zu einer geringen Erhöhung der Hybridisierungseffienz der spezifischen *H. uvarum*-Sonde (siehe Abb. 3.3 oben). Mit der Euk-Sonde werden ähnliche Hybridisierungseffizienzen wie bei längerer Hybridisierungsdauer von über 16 h erreicht (siehe Abb. 3.2 und Abb. 3.3).

Verlängert man die Inkubationszeit auf 18 h, 20 h beziehungsweise 22 h zeigt sich, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Hybridisierungszeiten und einer Inkubationszeit von 16 h (960 min) existieren (siehe Abb. 3.3 unten). Eine Verlängerung der Hybridisierungsdauer auf bis zu 22 h ist also ohne Einbußen bezüglich der Hybridisierungseffizienz unbedenklich möglich. Eine Senkung der Hybridisierungsdauer unter 16 h (960 min) erweist sich nicht als ausreichend. Nur eine Hybridisierung über Nacht kann die gewünschte Effizienz liefern.

3.1.3. Optimierung der SDS-Konzentration des Hybridisierungspuffers

Zur weiteren Optimierung des Testprotokolls wird die SDS-Konzentration des Hybridisierungspuffers untersucht. Hiermit sollen unspezifische Bindungen weiter gesenkt werden, um ein ideales Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen. Es werden Konzentrationen von 0 %, 0,001 % und 0,01 % SDS [w/v] getestet. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Zunahme der hybridisierten Zellen mit zunehmender SDS-Konzentration auf eine Hybridisierungseffizienz von 83,6 % (Euk-Sonde) beziehungsweise 79,8 % (Huv-Sonde) (siehe Abb. 3.4). Auch der Anteil unspezifisch gebundener Zellen nimmt mit steigender SDS-Konzentration deutlich ab, was an einer sinkenden Fluoreszenzintensität der nonEuk-Kontrolle zu erkennen ist. Es ist davon auszugehen, dass SDS deutlich zur Verringerung unspezifischer Bindungen der Fluoreszenzsonden beiträgt und somit die spezifische Fluoreszenz erhöht. Auf Grund der Ergebnisse wird die SDS-Konzentration von 0,01 % [w/v] im Hybridisierungspuffer, wie sie auch Andorra et al. (2011) verwenden, beibehalten. Dieser Versuch beweist die Wichtigkeit von SDS, um eine ausreichende Hybridisierung bewerkstelligen zu können.

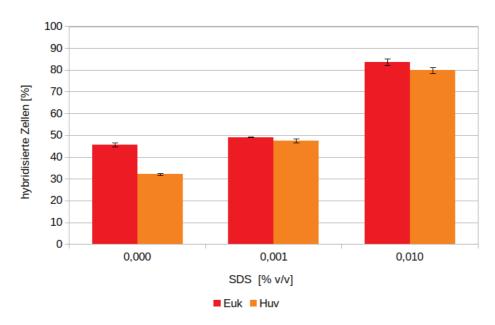


Abbildung 3.4.: Abhängigkeit von der SDS-Konzentration bei der Hybridisierung von *H. uvarum*: n = 2 - Daten aus Masterthesis Christian Vogelei

3.1.4. Optimierung der Fixierungsmethode

Nach Entwicklung der Negativkontrollsonde (siehe Kapitel 3.1.1) und Optimierung der Hybridisierungsbedingungen (siehe Kapitel 3.1.2 und Kapitel 3.1.3) werden auch die Fixiermethoden neu bewertet. Ziel ist es, die Fixierung der Hefezellen schneller und einfacher in der laborpraktischen Durchführung zu machen und eine möglichst rauscharme Fixierung zu erreichen. Rauscharm bedeutet, dass wenig Rauschen bei der flusszytometrischen Messung auftritt, beziehungsweise wenig Zelltrümmer und verklebte Zellen die Messung beeinflussen.

Hierfür wird zunächst die Hybridisierbarkeit von *H. uvarum* auf eine Korrelation mit der Fixierdauer in Formaldehyd untersucht. Die Zellen werden in einer 4%-igen Formaldehydlösung über verschiedene Zeiträume (30 min, 180 min und 1080 min) fixiert (siehe Kapitel 2.4.3.1). Die Hybridisierung erfolgt über 18 h. Die FISH-Ansätze zeigen bei der Formaldehydfixierung mit allen Fixierungszeiten vergleichbare Anteile hybridisierter Zellen über 91,8 % (Euk-Sonde) beziehungsweise 79 % (Huv-Sonde) Hybridisierungseffizienz (Abb. 3.5), so dass eine Formaldehydfixierung über 30 min als ausreichend betrachtet werden kann.

Alternativ zur Formaldehydfixierung über 30 min werden die Zellen mittels einer mehrschrittigen aufsteigenden Ethanolreihe (Gomez u. Forsburg, 2004) (siehe Kapitel 2.4.3.3) oder mittels direkter Zugabe von 70%-igem Ethanol (siehe Ka-

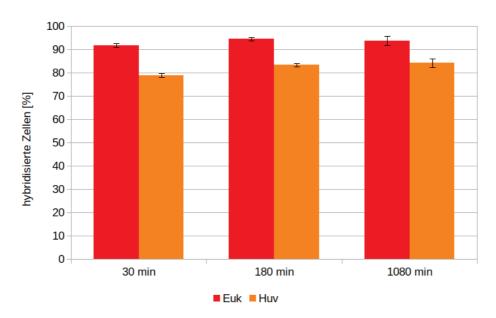


Abbildung 3.5.: Auswirkung von Änderungen der Fixierzeit auf die Hybridisierung von *H. uvarum* in 4 % Formaldehyd fixiert: n = 3 - Daten aus Masterthesis Christian Vogelei

pitel 2.4.3.2) fixiert. Die Hybridisierung erfolgt auch hier über 18 h. Zur besseren Vergleichbarkeit der beiden Ethanolfixierungsvarianten wird in den Versuchen (Abb. 3.6 und Abb. 3.7) eine dreißigminütige Formaldehydfixierung mitanalysiert. Die Hybridisierung erfolgt unter Nutzung der jeweils sondenspezifischen Hilfssonden (siehe Kapitel 3.2). Ein vergleichbarer Versuch ohne die Nutzung von Hilfssonden wurde im Rahmen der von mir betreuten Masterthesis von Christian Vogelei durchgeführt und lieferte ähnliche Ergebnisse (Ergebnisse nicht aufgeführt). Die Fixierzeit während der aufsteigenden Ethanolreihe wird von 60 min auf 30 min gesenkt, da hier nicht weiter erläuterte Versuche aus der Masterthesis von Christian Vogelei zeigen, dass dies ohne Verluste bei der Hybridisierungseffizienz möglich ist. Eine Gegenüberstellung der Fixiermethoden mit H. uvarum und ein Vergleich mit S. cerevisiae sind in Abb. 3.6 und 3.7 dargestellt. In Abb. 3.6 erkennt man, dass sich die Hybridisierungseffizienzen bei den genannten drei Fixiermethoden kaum unterscheiden. Es werden deutlich über 80 % der eingesetzten Zellen nachgewiesen (siehe Abb. 3.6). Bei der Formaldehydfixierung können 89,2 % der Zellen mit der Euk-Sonde und 84,5 % der Zellen mit der HuvH12L-Sondenkombination als hybridisiert nachgewiesen werden. Mit der Fixierung in 70 % Formaldehyd liegt der Anteil bei 86,8 % (Euk-Sonde) und 83,6 % (HuvH12L-Sondenkombination). Lediglich die Fixierung mittels EtOH-Reihe lie-

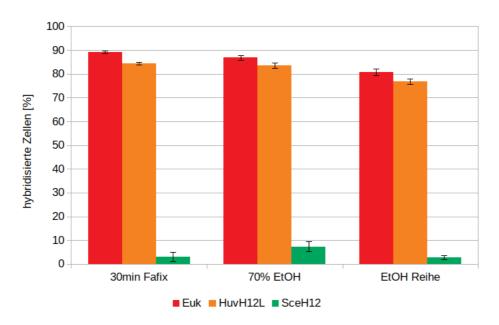


Abbildung 3.6.: Auswirkung der Fixiermethode auf die Hybridisierung von *H. uvarum*: Vergleich der Fixierungsmethoden in einer Reinkultur von *H. uvarum* bei Einsatz von Huv- und Sce-spezifischer Sondenkombination; n = 3

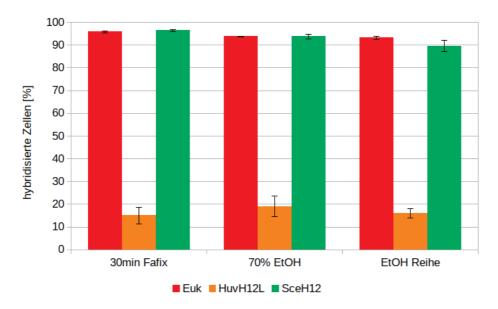


Abbildung 3.7.: Auswirkung der Fixiermethode auf die Hybridisierung von *S. cerevisiae*:

Vergleich der Fixierungsmethoden in einer Reinkultur von *S. cerevisiae* bei Einsatz von Huv- und Sce-spezifischer Sondenkombination; n = 3

fert geringfügig niedrigere Ergebnisse (80,7% mit Euk-Sonde und 76,9% mit HuvH12L-Sondenkombination). Durch unspezifische Wechselwirkungen und daraus folgend die Nachteile der Auswertung mittels Overton-Substraktion (siehe auch Kapitel 1.5.3 und Kapitel 4.4), kommt es zu einem geringen Anteil von falsch-positiven *S cerevisiae*-Zellen. Auf die Problematik dieser Kreuzreaktionen wird in Kapitel 3.4 und Kapitel 4.4 näher eingegangen. Auch bei *S. cerevisiae* werden mit allen drei genannten Fixiermethoden Hybridisierungseffizienzen von über 90% erreicht (siehe Abb. 3.7). Auch hier zeigen sich die besten Effizienzen bei einer Fixierung mit Formaldehyd. Es kommt zu einem geringen Nachweis von, in der Reinkultur nicht vorhandenen, *H. uvarum*. In den dazugehörigen Fluores-

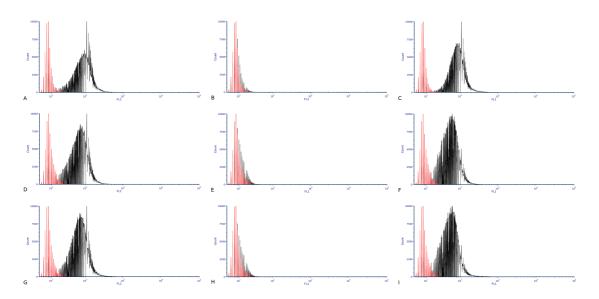


Abbildung 3.8.: Auswirkung der Fixiermethode auf die Hybridisierung von *S. cerevisiae* - Histogramme der FITC-Fluoreszenz:

A = S. cerevisiae fixiert mit 30 min FA-Fixierung, hybridisiert mit Euk;

B = S. cerevisiae fixiert mit 30 min FA-Fixierung, hybridisiert mit HuvH12L;

C = S. cerevisiae fixiert mit 30 min FA-Fixierung, hybridisiert mit SceH12;

D = S. cerevisiae fixiert mit 70 %EtOH-Fixierung, hybridisiert mit Euk;

E = S. cerevisiae fixiert mit 70 %EtOH-Fixierung, hybridisiert mit HuvH12L;

F = S. cerevisiae fixiert mit 70 %EtOH-Fixierung, hybridisiert mit SceH12;

G = S. cerevisiae fixiert mit EtOH-Reihen-Fixierung, hybridisiert mit Euk;

H = S. cerevisiae fixiert mit EtOH-Reihen-Fixierung, hybridisiert mit HuvH12L;

I = S. cerevisiae fixiert mit EtOH-Reihen-Fixierung, hybridisiert mit SceH12;

rot = nonEuk-Kontrolle, schwarz = Probe mit spezifischer Sondenkombination

zenzhistogrammen, erkennt man, dass im Fall dieser Kreuzreaktionen kein deutlich fluoreszenzintensiverer Peak als der der nonEuk-Kontrolle dargestellt wird

(siehe Abb. 3.8). Es ist ledglich eine leichte Schulterbildung bei den mit HuvH12L hybridisierten Proben zu erkennen (siehe Abb.3.8 B, E und H). Des Weiteren ist den Floureszenzhistogrammen in Abb. 3.8 zu entnehmen, dass der Median der Fluoreszenzpeaks der spezifisch gebundenen Sonden Euk und SceH12 bei den beiden Fixierungsvarianten mit Ethanol etwas niedriger liegt als bei der Formaldehydfixierung. Zur weiteren Differenzierung der Fixiervarianten sind in Abb. 3.9 die dazugehörigen SSC-FSC-Plots dargestellt. Bei den Ethanolfixierungen ist eine

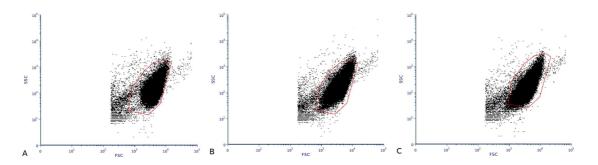


Abbildung 3.9.: Auswirkung der Fixiermethode auf die Hybridisierung von *S. cerevisiae* - SSC-FSC-Plots:

A = S. cerevisiae fixiert mit 30 min FA-Fixierung, hybridisiert mit SceH12;

B = S. cerevisiae fixiert mit 70 %EtOH-Fixierung, hybridisiert mit SceH12;

C = S. cerevisiae fixiert mit EtOH-Reihen-Fixierung, hybridisiert mit SceH12;

Zunahme an Zelltrümmern zu erkennen. Dies zeigt sich durch ein Verwässern der Zellpopulation in Bereiche niedrigerer Signalintensität. Durch eine Vergrößerung der Zellpopulation in Bereiche höherer Signalintensität zeigt sich das vermehrte Auftreten von Zellclustern bei den Ethanolfixierungen. Dies wurde durch weitere Versuche auch in der Praxis bestätigt. Stellenweise kommt es sogar zu mit bloßem Auge sichtbaren Zellklumpen. Dies erschwert eine quantitative Auswertung der Proben, da das Flusszytometer verstopfen kann. Die vorliegenden Histogramme von *S. cerevisiae* sind mit denen der *H. uvarum*-Fixiervergleiche vergleichbar, weswegen auf eine gesonderte Darstellung derselben verzichtet wurde. Im Hinblick auf eine quantitativ möglichst genaue Auswertung wird für weitere Etablierungsversuche eine dreißigminütige Formaldehydfixierung durchgeführt.

3.2. Erhöhung der Fluoreszenzintensität durch Hilfssonden

Zeigt eine ordnungsgemäss designte Sonde kein ausreichendes Fluoreszenzsignal bei einer FISH, liegen die Gründe meist in unzureichender Zellpermeabilisierung, zu geringem Ribosomengehalt oder daran, dass die Binderegion auf Grund einer höhergradigen rRNA-Struktur nicht erreichbar ist (Amann et al., 1995; Amann u. Fuchs, 2008). Zur Erhöhung der Fluoreszenzintensität bieten sich verschiedene Ansätze, beispielsweise Hilfssonden an (siehe Kapitel 1.4.5). Dadurch können Effekte der Wachstumsphasen abgemildert werden (siehe Kapitel 3.3). Mit einer erhöhten Fluoreszenzintensität spezifisch gefärbter Zellen fällt die Abgrenzung dieser von unspezifisch gefärbten Zellen beziehungsweise Partikeln leichter. So können die Anteile an den rechnerisch ermittelten hybridisierten Zellen erhöht werden. Damit ist auch eine genauere Ermittlung der Anteile spezifischer Hefezellen an der Kultur außerhalb des mittleren exponentiellen Wachstumbereiches möglich. Dies ist vor allem für die Beurteilung nativer Proben ein wichtiger Faktor.

3.2.1. Erstellung der Hilfssonden

Zur Erhöhung der Fluoreszenzintensität werden in dieser Arbeit sogenannte Hilfssonden verwendet. Die jeweiligen Sequenzen sind in Kapitel 2.4.4.3 zu finden. Diese unmarkierten Hilfssonden binden in direkter Nachbarschaft der spezifischen Hefesonden an die 26S-rRNA. Möglicherweise können sie aber auch unspezifische Bindungen eingehen. Sie haben den Vorteil, dass sie direkt in der Region, in der auch die spezifische Sonde bindet, die 26S-rRNA öffnen. So können sie eine Bindung der spezifischen Sonde erleichtern. Beispielhaft ist in Abb. 3.10 die Binderegion der spezifisch bindenden Huv-Sonde und der Hilfssonden 1 und 2 bei *H. uvarum* dargestellt. Für *H. uvarum* werden verschiedene Hilfssonden-Kombinationen getestet (siehe Tab. 2.8 auf Seite 56). Neben den direkt an die spezifische Sonde angrenzenden Hilfssonden 1 und 2 werden zusätzlich Hilfssonden getestet, die an die Hilfssonden 1 und 2 angrenzen (H3 und H4) und die der Binderegion der spezifischen Sonde, laut mittels RNAfold (http://rna.tbi.univie. ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi) ermittelten sekundären rRNA-Struktur, direkt gegenüber liegen (H7). Die Hilfssonden 5 und 6 grenzen jeweils direkt an die Hilfs-

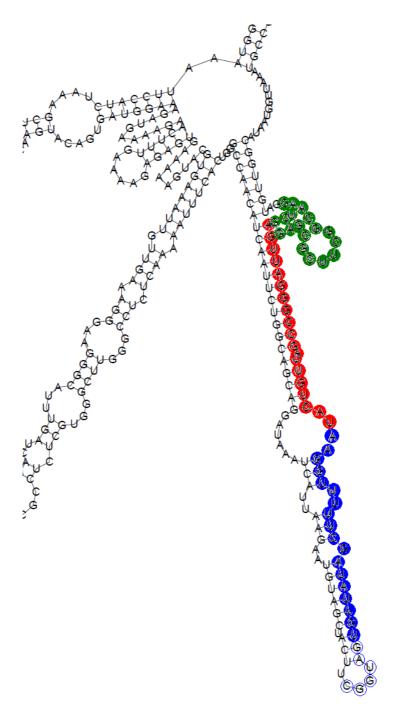


Abbildung 3.10.: Lage der Binderegionen der Sonden auf der 26SrRNA von *H. uvarum*:

Dargestellt ist ein Ausschnitt der sekundären 26SrRNA-Struktur (ermittelt mittels RNAfold) von *H. uvarum*. Rot bezeichnet die Bindestelle für die spezifische Huv-Sonde. Grün und Blau ausgefüllte Kreise stellen die Binderegionen für die Hilfssonden 1 und 2 dar; die blauen Kreise zeigen zusammen mit den ausgefüllten blauen Kreisen die Lage der Helfersonde H2L

sonden 3 beziehungsweise 4 an. Es werden jeweils Sonden getestet, die in ihrer Basenlänge der Länge der spezifischen Sonde entsprechen. Ist die Schmelztemperatur der Hilfssonde geringer, als die der spezifischen Sonde, wird die Basenabfolge der Hilfssonde in Dreierschritten verlängert, solange bis die Schmelztemperatur der Hilfssonde höher ist, als die der spezifischen Sonde (L). Die Vorgehensweise, dass die Schmelztemperatur der Hilfssonden höher auszufallen hat, als die Schmelztemperatur der spezifisch bindenden Sonden, findet sich auch in der Literatur bei Roeder et al. (2007).

Für S. cerevisiae, D. bruxellensis und P. anomala werden nur die jeweils an

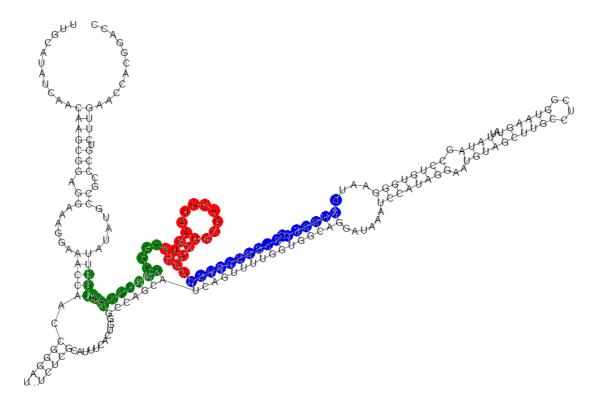


Abbildung 3.11.: Lage der Binderegionen der Sonden auf der 26SrRNA von *S. cerevisiae*:

Dargestellt ist ein Ausschnitt der sekundären 26SrRNA-Struktur (ermittelt mittels RNAfold) von *S. cerevisiae*. Rot bezeichnet die Bindestelle für die spezifische Sce-Sonde. Grün und Blau ausgefüllte Kreise stellen die Binderegionen für die Hilfssonden 1 und 2 dar.

die spezifische fluoreszenzmarkierte Sonde angrenzenden Hilfssonden getestet (siehe Tab. 2.9 auf Seite 57, Tab. 2.10 auf Seite 57 und Tab. 2.11 auf Seite 57). In Abb. 3.11 sind beispielhaft die Binderegionen der spezifisch bindenden Sce-Sonde und der dazu spezifischen Hilfssonden H1 und H2 dargestellt.

3.2.2. Hilfssondeneinsatz bei H. uvarum

Die Effekte der verschiedenen Hilfssonden und Hilfssondenkombinationen bei einer H. uvarum-Reinkultur auf die Stärke des Fluoreszenzsignals sind in Abb. 3.12 und Abb. 3.14 dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Fluoreszenzintensität bei den verschiedenen Hilfssondenkombinationen ist der Median der FITC-Fluoreszenz normalisiert dargestellt (siehe Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Der Median der FITC-Fluoreszenz einer allein mit der Huv-Sonde hybridisierten Probe entspricht hierbei einem Wert von 100. Ein Medianwert von 200 bedeutet also eine Verdopplung des Fluoreszenzsignals. Der Fluoreszenzmedian der Euk-Sonde wird auch an diese Normalisierung angepasst. Er dient als positive Versuchsdurchführungskontrolle. Es ist erkennbar, dass das Euk-Sonden-Signal stets bis zu anderthalbfach stärker ist als das Signal der spezifischen Huv-Sonde ohne Hilfssonden. Die Kombination aus der spezifischen Huv-Sonde und den Hilfssonden H1 und H2L zeigt die höchste Steigerung des Fluoreszenzsignals. Sie ist um mehr als das Doppelte gegenüber der spezifischen Sonde alleine erhöht. Weitere Versuche werden mit dieser Kombination aus spezifischer Huv-Sonde und Hilfssonden ausgeführt. Andere Sonden-Hilfssondenkombinationen verändern die Fluoreszenzintensität nicht oder verschlechtern sie sogar. Vergleicht man die Anteile hybridisierter Zellen (siehe Abb. 3.14 und Abb. 3.15), ist der Effekt der Fluoreszenzsteigerung durch die Hilfssondenkombinationen nicht ganz so deutlich zu erkennen, wie bei Betrachtung der normalisierten Mediane in Abb. 3.12 und Abb. 3.13. Auch hier zeigt die Hilfssondenkombination aus Huv-Sonde und H1 und H2L die stärkste Erhöhung des Anteils hybridisierter Zellen auf 90,8 %

3.2.3. Hilfssondeneinsatz bei S. cerevisiae

Bei *S. cerevisiae* wird der Effekt der Hilfssonden bei unterschiedlichen Formaldehydfixierungszeiten betrachtet (siehe Abb. 3.16), da im Rahmen der Versuche auffiel, dass eine Fixierzeit von 30 min in Formaldehyd für *S. cerevisiae* stellenweise nicht auszureichen scheint. Wie in Abb. 3.16 zu erkennen ist, kann die Fluoreszenzintensität mit der Hilfssondenkombination auf das 1,5- bis 4-fache erhöht werden. Eine Fixierung über 20 beziehungsweise 24 Stunden ermöglicht mit Euk-Sonde, Sce-Sonde und Sce-Hilfssonden-Kombination eine ausreichen-

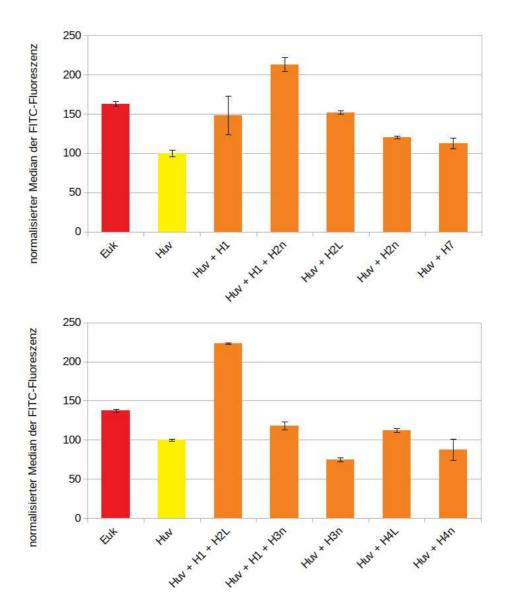


Abbildung 3.12.: Normalisierter Median der FITC-Fluoreszenz bei Verwendung der verschiedenen Hilfssonden bei *H. uvarum* (Teil 1): n=3

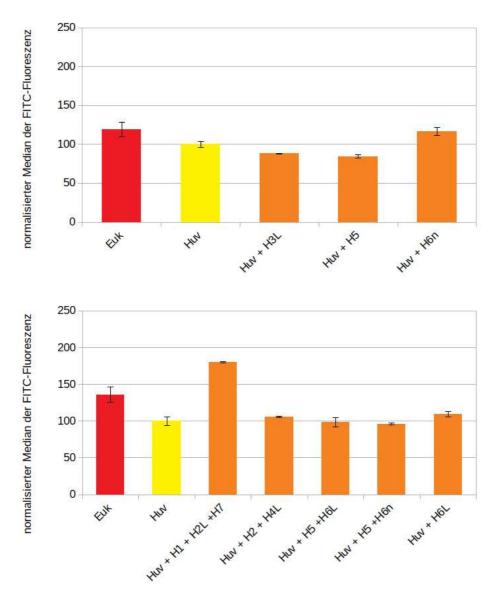


Abbildung 3.13.: Normalisierter Median der FITC-Fluoreszenz bei Verwendung der verschiedenen Hilfssonden bei *H. uvarum* (Teil 2): n=3

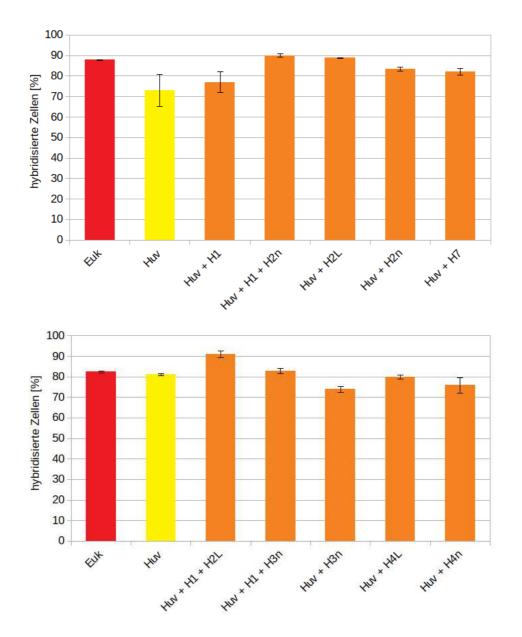


Abbildung 3.14.: Anzahl hybridisierter Zellen [%] bei Verwendung der verschiedenen Hilfssonden bei *H. uvarum* (Teil 1): n=3

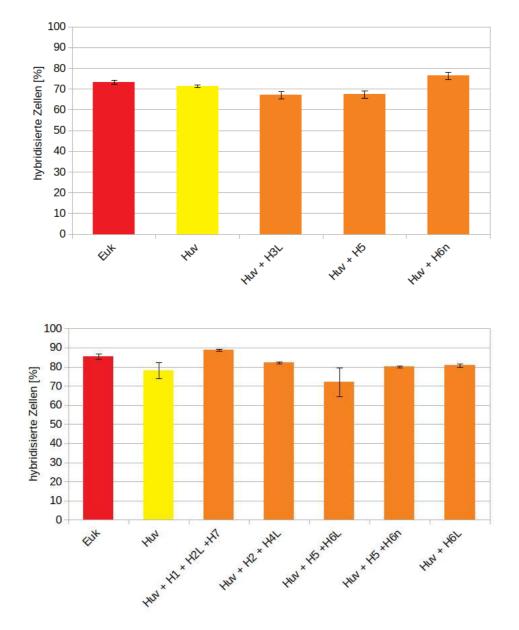


Abbildung 3.15.: Anzahl hybridisierter Zellen [%] bei Verwendung der verschiedenen Hilfssonden bei *H. uvarum* (Teil 2): n=3

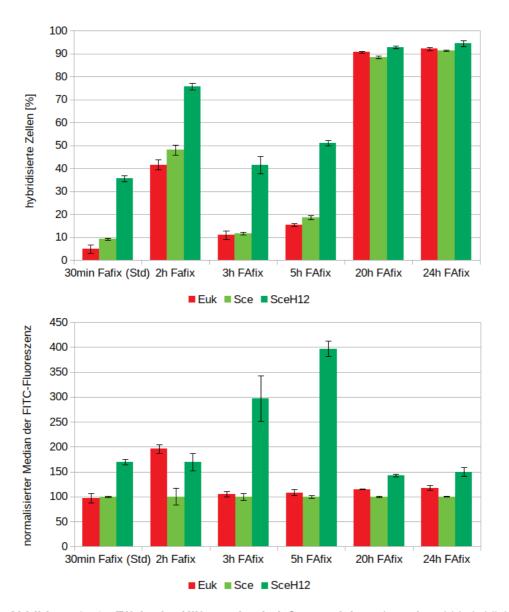


Abbildung 3.16.: Effekt der Hilfssonden bei *S. cerevisiae*: oben: Anzahl hybridisierter Zellen [%]; unten: normalisierter Median der FITC-Fluoreszenz

de, effektive Hybridisierung der Zellen mit einem Anteil von circa 90 % hybridisierten Zellen bei allen Varianten (siehe Abb. 3.16 oben). Bei niedrigeren Fixierzeiten ist eine deutliche Steigerung des Anteils an hybridisierten Zellen durch den Einsatz der spezifischen Hilfssonden zu erkennen. Diese Steigerung der Fluoreszenzintensität nach Hilfssondeneinsatz ist auch in einer Erhöhung des normalisierten Medians bei allen Fixierzeitvarianten zu beobachten (siehe Abb. 3.16 unten). In späteren Versuchen können auch bei 30 min Fixierdauer in Formaldehyd vergleichbare Werte zu den hier bei 20 und 24 h erzielten Werten erreicht werden (siehe beispielsweise Abb. 3.28, Abb. 3.40 und Kapitel 3.8).

3.2.4. Hilfssondeneinsatz bei P. anomala und D. bruxellensis

Pichia anomala und D. bruxellensis können mit allein der jeweils spezifischen Sonde wegen zu niedriger Fluoreszenzintensität nicht nachgewiesen werden. Für einen erfolgreichen FISH-Assay ist in diesem Fall die Erhöhung der Fluoreszenzintensität dringend erforderlich. Es werden, auf Grund der Ergebnisse der Hilfssondenversuche bei H. uvarum, jeweils nur die direkt an die spezifische Sondenbindungsregion angrenzend bindenden Hilfssonden 1 und 2 ausgetestet. Bei P. anomala wird unter Berücksichtigung der Schmelztemperatur der Sonden gleich die verlängerte Hilfssonde H1L ausgetestet, da bei dieser die Schmelztemperatur höher liegt als bei der spezifischen Sonde (siehe auch Kapitel 3.2.1). Bei beiden Hefespezies kann eine deutliche Erhöhung des Fluoreszenzsignals festgestellt werden (siehe Abb. 3.17 und 3.18), welches einen Nachweis von P. anomala und D. bruxellensis mittels Flow-FISH ermöglicht. Allerdings muss die Fixierdauer in Formaldehyd für diese Versuche auf 24 h erhöht werden. In weiteren Versuchen konnten mit Einsatz der Hilfssonden auch nach 30 min Fixierzeit in Formaldehyd ausreichende Hybridisierungseffizienzen erzielt werden (Versuche nicht dargestellt).

Bei *P. anomala* gelingt durch Verwendung der zusätzlichen Hilfssonden 1L und 2 eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität, welche eine Auswertung des Fluoreszenzsignals erst ermöglicht (siehe Abb. 3.17). So kann eine Hybridisierungseffizienz von 93,1 % erreicht werden. Auch die Euk-Sonde bindet bei *P. anomala* sehr effektiv und erreicht eine Hybridisierungseffizienz von 97,3 % der eingesetzten Hefezellen. An Hand des normalisierten Medians ist zu erkennen, dass der Einsatz der Hilfssondenkombination H1L und H2 zu einer 4,6-fachen Steige-

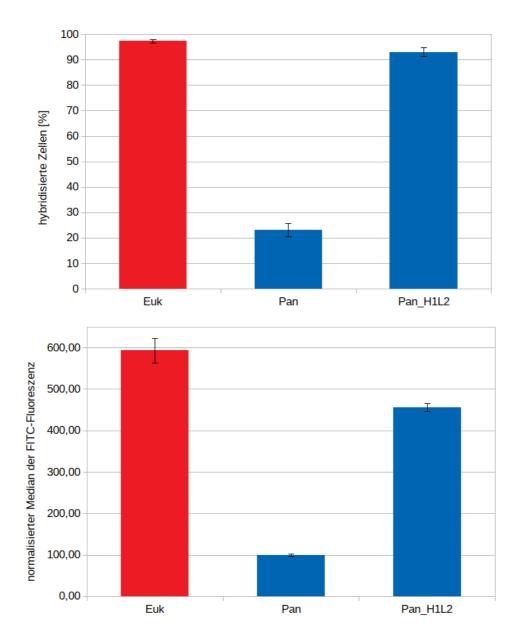


Abbildung 3.17.: Effekt der Hilfssonden bei *Pichia anomala*: oben: Anzahl hybridisierte Zellen [%]; unten: normalisierter Median der FITC-Fluoreszenz; n=3

rung der Fluoreszenzintensität führt (siehe Abb. 3.17 unten). Bei *D. bruxellensis* (AWRI 1499) werden mehrere Kombinationen an Sonden und jeweiligen Hilfssonden getestet (siehe Abb. 3.18). Die spezifischen Sonden wurden von Roeder et al. (2007) entwickelt. Die Hilfssonden wurden entsprechend der bei *H. uvarum* beschriebenen Vorgehensweise designt (siehe Kapitel 3.2.1). In Abb. 3.18 ist zu erkennen, dass die spezifische Sonde D. brux 1.1 alleine nur einen geringen Anteil an *D. bruxellensis*-Zellen nachweisen kann (22,6%). Auch die D. brux 1.2-Sonde alleine zeigt einen Anteil von 62,2% hyridisierten Zellen. Eine Kombination aus diesen beiden spezifischen Sonden D. brux 1.1 und D. brux 1.2 zeigt 78,4% der *D. bruxellensis*-Zellen als hybridisiert an. Durch Verwendung der passenden Hilfssonden D. brux 1.1 H1LH2L und D. brux 1.2 H1H2L kann der Anteil von als hybridisiert nachgewiesenen *D. bruxellensis*-Zellen auf 84,8% erhöht werden.

3.3. Einfluss der Wachstumsphase auf die Hybridisierungseffizienz

Bei Begutachtung der Literatur zur Thematik FISH zum Nachweis von Hefen fällt auf, dass meist Hefen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet werden (siehe zum Beispiel Wallner et al. (1993, 1995); Xufre et al. (2006)). In der exponentiellen Wachstumsphase zeigen Zellen ihre größte Vitalität und ihr stärkstes Teilungsvermögen. Auch ist der Ribosomengehalt in dieser Phase besonders hoch, was zu einer erhöhten Anzahl an Bindungsmöglichkeiten für die rRNA-Sonden führt. Eine Korrelation zwischen Ribosomengehalt und Zellvitalität beziehungsweise Wachstumsphase ist bekannt (DeLong et al., 1989; Kemp et al., 1993; Ruimy et al., 1994; Schaechter et al., 1958; van der Vliet et al., 1994) und führt auch zu Unterschieden in der Intensität der Hybridisierungssignale (DeLong et al., 1989; Poulsen et al., 1993; Wallner et al., 1993, 1995) (siehe auch Kapitel 1.4.4). In anderen Phasen des Zellwachtums ist die Zellvitalität und somit auch der Ribosomengehalt geringer.

Unter Berücksichtigung der Effekte des unterschiedlichen Ribosomengehaltes und im Hinblick auf folgende Versuche mit nativen Proben wird die Hybridisierbarkeit von *H. uvarum* und *S. cerevisiae* in den verschiedenen Wachstumsphasen zuerst ohne den Einsatz von Hilfssonden bewertet. Weitere Versuche gehen auf die durch Hilfssonden mögliche Fluoreszenzsteigerung ein (siehe Kapitel 3.3.3).

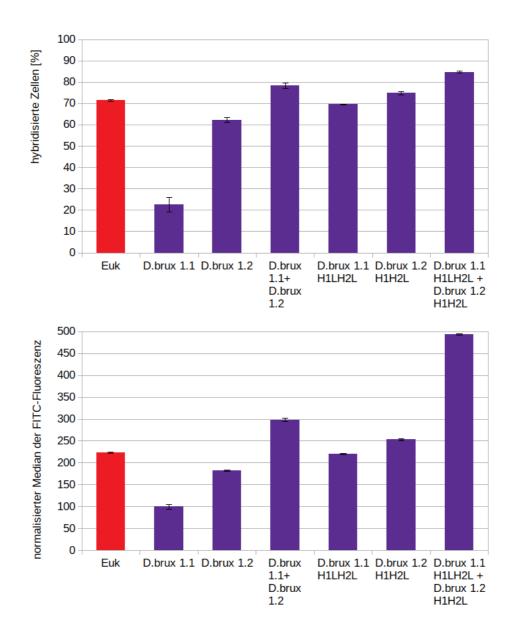


Abbildung 3.18.: Effekt der Hilfssonden bei *Dekkera bruxellensis* (AWRI 1499): oben: Anzahl hybridisierter Zellen [%]; unten: normalisierter Median der FITC-Fluoreszenz; n=3

3.3.1. Einfluss der Wachstumsphase auf die Hybridisierungseffizienz von *H. uvarum*

Zur Erstellung der Wachstumskurven werden Kulturen von *H. uvarum* in YPD-Medium und in pasteurisiertem sterilfiltriertem Chardonnaymost angelegt (siehe Abb. 3.19). Diese werden in den verschiedenen Wachstumsphasen (verzögerte (lag) (30, 60 und 120 min), exponentielle (log) (210, 330 und 450 min) und stationäre Wachstumsphase (1380, 1710 und 2880 min)) mittels Formaldehyd fixiert. Die Wachstumsphasen werden an Hand von graphischer Auftragung nach Zellzählung mittels Flusszytometer ermittelt. Der Kurvenfit erfolgt sowohl in Abb. 3.19 als auch in Abb. 3.21 mit der exponentiellen sigmoiden und logistischen Funktion $y = a*(1+b*exp(c*x))^{-1}$ angelehnt an das Wachstumsmodell von Verhulst (1838).

Die Zellen werden mit der für H. uvarum spezifischen Sonde (Huv) beziehungsweise der Eukaryontenspezifischen Sonde (Euk) hybridisiert und anschließend analysiert (siehe Abb. 3.20). Es zeigt sich, dass die Hybridisierungseffizienz, gemessen am prozentualen Anteil hybridisierter Zellen, sowohl in YPD-Medium als auch in Most, in der exponentiellen Wachstumsphase (log-Phase, 330 min) am höchsten ist (siehe Abb. 3.20). Die Euk-Sonde erreicht hier einen Anteil hybridisierter Zellen von 93,6 % in YPD beziehungsweise von 95,2 % in Most. Mit der für H. uvarum spezifischen Sonde (Huv) wird ein Anteil hybridisierter Zellen von 91% in YPD-Medium beziehungsweise von 89,4% in Most erreicht. Sowohl in der lag- (30 min) als auch in der stationären Phase (1080 min) werden geringere Anteile hybridisierter Zellen detektiert. In Chardonnaymost werden in der lag-Phase Nachweiseffizienzen von 49 % (Euk-Sonde) beziehungsweise 43,2 % (Huv-Sonde) erzielt, in YPD-Medium werden hier Effizienzen von 7,4% (Euk-Sonde) beziehungsweise 10,4% (Huv-Sonde) erreicht. In der stationären Phase werden in YPD-Medium Hybridisierungseffizienzen von 1,8% (Euk-Sonde) beziehungsweise 37,3 % (Huv-Sonde) erzielt. In Most liegen in der stationären Phase die Hybridisierungseffizienzen leicht höher, bei 27,3 % (Euk-Sonde) beziehungsweise 36,9 % (Huv-Sonde). Hinsichtlich der Anzucht in YPD-Medium und Traubenmost zeigen sich in der lag- und der stationären Phase signifikante Unterschiede, die sich möglicherweise auch auf ein unterschiedliches Wachstumsverhalten in den zwei Medien zurückführen lassen können. In Traubenmost sind die Anteile hybridisierter Zellen sowohl in der lag-Phase als auch in der stationären

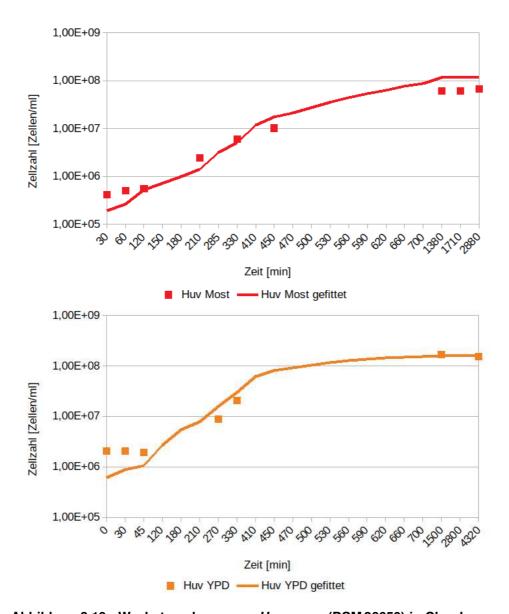


Abbildung 3.19.: Wachstumskurve von *H. uvarum* (DSM 26650) in Chardonnaymost (oben) und YPD-Medium (unten): n = 3; ermittelt an Hand von Zellzählung mit dem Flusszytometer [Zellen/ml] - Daten aus Masterthesis Christian Vogelei

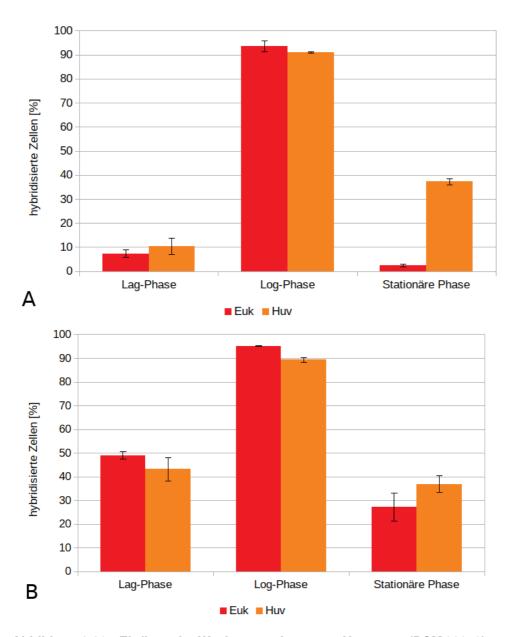


Abbildung 3.20.: Einfluss der Wachstumsphase von *H. uvarum* (DSM 26650) zum Zeitpunkt der Fixierung auf die Hybridisierungseffizienz: A in YPD-Medium; B in Chardonnaymost; lag = 30 min, log = 330 min, stationär = 1080 min; n = 3 - Daten aus Masterthesis Christian Vogelei

Phase deutlich höher als bei Wachstum in YPD-Medium.

Um das Kulturwachstum verschiedener H. uvarum-Stämme zu vergleichen, werden Wachstumskurven des H. uvarum DSM-Stammes und weiterer H. uvarum-Stämme (Ursprungsbezeichnungen siehe Tabelle 2.6) erstellt (siehe Abb. 3.21). Es ist zu erkennen, dass die Wachstumsverläufe bei allen untersuchten Stämmen einen ähnlichen Verlauf zeigen. Die exponentielle Wachstumsphase zeigt kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen, wie an den logarithmischen Regressionsgraden (siehe Abb. 3.21 unten) zu sehen ist. Es kann also, auch bei anderen H. uvarum-Stämmen als dem in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten DSM-Stamm, von einem ähnlichen Wachstumsverlauf ausgegangen werden. Laut den vorliegenden Ergebnissen (siehe Abb. 3.21) befindet sich die Kultur nach einer Wachstumszeit von 30 min bei einer OD₆₀₀ von circa 0,07 - 0,08 in der lag-Phase. Nach circa 120 min endet die lag-Phase bei einer OD₆₀₀ von circa 0,12. Danach folgt die exponentielle Wachstumsphase der Kultur. Nach 330 min ist die mittlere exponentielle Wachstumsphase bei einer *OD*₆₀₀ von 0,9-1,1 erreicht. Das exponentielle Wachstum dauert in etwa bis zu einer *OD*₆₀₀ von 8 an und geht dann in die stationäre Wachstumsphase über. Da beim Vergleich der Wachstumskurven unterschiedlicher H. uvarum-Stämme der Fokus auf der Vergleichbarkeit des Wachstums in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase lag, sind keine Messwerte vom Übergang der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase vorhanden. Bei OD₆₀₀ 9-10 nach 1440 min ist die Kultur in der späten stationären Wachstumsphase angekommen.

Um die Hybridisierungseffizienzen im Verlauf der exponentiellen Wachstumsphase genauer zu bestimmen, werden in YPD-Medium kultivierte *H. uvarum*-Zellen (DSM) nach 30 min (lag-Phase), 180 min (frühe log-Phase), 330 min (mittlere log-Phase), 420 min (späte log-Phase) und 1440 min (stationäre Phase) mittels Formaldehyd fixiert, anschließend mit Euk-Sonde beziehungsweise Huv-Sonde hybridisiert und flusszytometrisch analysiert (siehe Abb 3.22). Die Wachstumsphasen werden an Hand der vorher ermittelten Wachstumskurven abgeschätzt (siehe Abb. 3.21) und durch OD_{600} -Messungen der Kultur vor der jeweiligen Fixierung bestätigt (siehe Kapitel 2.4.2.1). Die flusszytometrische Zellzählung der Fixierungen bestätigt die Messpunkte der Wachstumsphasen zusätzlich. Im exponentiellen Wachstumsbereich der *H. uvarum*-Kultur (180 min, 330 min und 420 min) werden die höchsten Hybridisierungseffizienzen erreicht (siehe Abb. 3.22). In der frühen logarithmischen Wachstumsphase nach 180 min Kulturwachstum zeigen

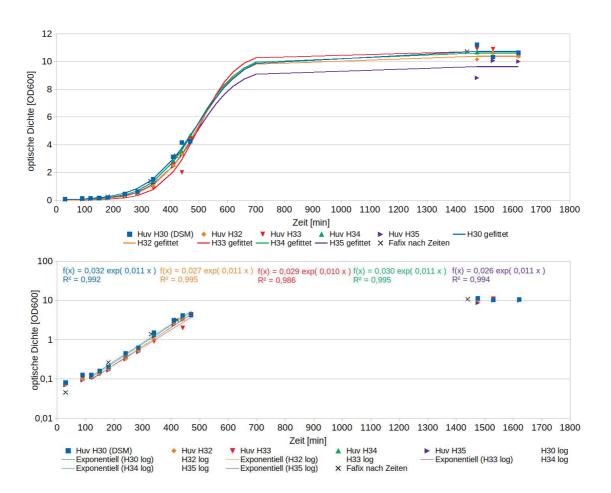


Abbildung 3.21.: Wachstumskurven verschiedener H. uvarum-Stämme in YPD-Flüssigkultur: ermittelt mittels OD_{600} -Messungen; Bezeichnungen siehe Tabelle 2.6; Die Kurve "FA-Fix nach Zeiten" zeigt die Zeitpunkte, an denen Formaldehydfixierungen durchgeführt wurden (siehe Abb. 3.22). Die untere Graphik zeigt die logarithmische Darstellung der Wachstumskurven zur besseren Sichtbarkeit der exponentiellen Wachstumsphasen. Für Zellen in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase wurden die Zellen nach 330 min Wachstumszeit (entspricht etwa $OD_{600}=1$) fixiert. Ist nichts anderes erwähnt, wurden die Versuche mit Zellen dieser Wachstumsphase durchgeführt.

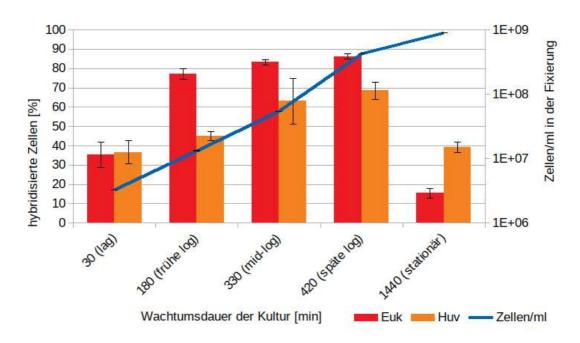


Abbildung 3.22.: Einfluss der Wachstumsphase von *H. uvarum* (DSM 26650) zum Zeitpunkt der Fixierung auf die Hybridisierungseffizienz in YPD-Medium: n=3

sich 77,3% (Euk-Sonde) beziehungsweise 45% (Huv-Sonde) hybridisierte Zellen. In der mittleren exponentiellen Wachstumsphase bei 330 min Wachstumszeit werden 83,3% hybridisierte Zellen mit der Euk-Sonde gemessen und 63,2% hybridisierte Zellen mit der Huv-Sonde. Nach 420 Minuten Kulturwachstum und somit der späten exponentiellen Wachstumsphase der Zellen erreicht der Anteil hybridisierter Zellen 86,2% mit der Euk-Sonde und 68,5% mit der Huv-Sonde. Im Bereich des noch verzögerten Kulturwachstums (lag-Phase) werden 35,5% (Euk-Sonde) beziehungsweise 36,7% (Huv-Sonde) hybridisierte Zellen gemessen. Nach 1440 min und somit nach Erreichen der stationären Phase der Kultur werden 15,4% (Euk-Sonde) beziehungsweise 39,2% (Huv-Sonde) hybridisierte Zellen gemessen.

Wenn nicht anders erwähnt, erfolgen die Versuche dieser Arbeit mit Zellen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase. Bei *H. uvarum* entspricht dies einer Wachstumszeit in Kultur von ca. 330 min beziehungsweise einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0.9 - 1.1.

3.3.2. Wachstumsverhalten von S. cerevisiae

Auf Grundlage der mit *H uvarum*-Kulturen gewonnenen Erkenntnisse wird auch eine Wachstumskurve von S. cerevisiae (DSM) erstellt (siehe Abb. 3.23). Auch hier befindet sich die mittlere exponentielle Wachstumsphase bei einer optischen Dichte (*OD*₆₀₀) von ungefähr 1. Eine *S. cerevisiae*-Kultur benötigt allerdings länger als *H. uvarum*, um diese Wachstumsphase zu erreichen, erfahrungsgemäss 1300 min. Zur Zellfixierung werden Übernachtkulturen mit Fixierung nach *OD*₆₀₀-Messung am nächsten Morgen angelegt. Es zeigt sich in Folgeversuchen, dass auch S. cerevisiae sich am besten bei einer OD₆₀₀ von 0,9-1,1 hybridisieren lässt. Auch P. anomala und D. bruxellensis zeigen ein vergleichbares Wachstumsverhalten in Bezug auf die optische Dichte. Gezielte Versuche zur Hybridisierbarkeit dieser Hefespezies zu unterschiedlichen Wachstumszeitpunkten wurden auf Grund der gegebenen Übertragbarkeit zu den Versuchen mit H. uvarum nicht durchgeführt. Auf Grund dieser Beobachtungen werden die in dieser Arbeit durchgeführten Etablierungen auch bei den anderen untersuchten Hefespezies in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase bei einer *OD*₆₀₀ von 0,9 - 1,1 durchgeführt.

3.3.3. Effekt der Hilfssonden auf den Nachweis der Hefen in verschiedenen Wachstumsphasen

In den folgenden Versuchen zu Abbildungen 3.24, 3.25 und 3.26 wird die Hybridisierungseffizienz von *H. uvarum, P. anomala* und *D. bruxellensis* im Verlauf des Kulturwachstums unter Verwendung der Hilfssonden (siehe Kapitel 3.2) in YPD-Medium untersucht.

In Abb. 3.24 ist der Effekt der Hilfssonden im Verlauf der verschiedenen Wachstumsphasen einer *H. uvarum*-Kultur dargestellt. Weitere Informationen zu dem Wachstumsverlauf von *H. uvarum*-Kulturen finden sich in Kapitel 3.3.1. Die höchste Fluoreszenzintensität und somit der höchste Anteil an hybridisierten Zellen ist mit und ohne Hilfssondeneinsatz in der mid-log-Phase (330 min, 0,9 - 1,1) der Kultur zu erkennen. Hier können ohne den Einsatz von Hilfssonden 81,3 % der Huv-Zellen als hybridisiert dargestellt werden. Mit Hilfssonden kann dieser Wert auf 90 % gesteigert werden. In der frühen (180 min) und späten (420 min) log-Phase werden durch den Einsatz der Hilfssonden 18,5 % (180 min) beziehungsweise

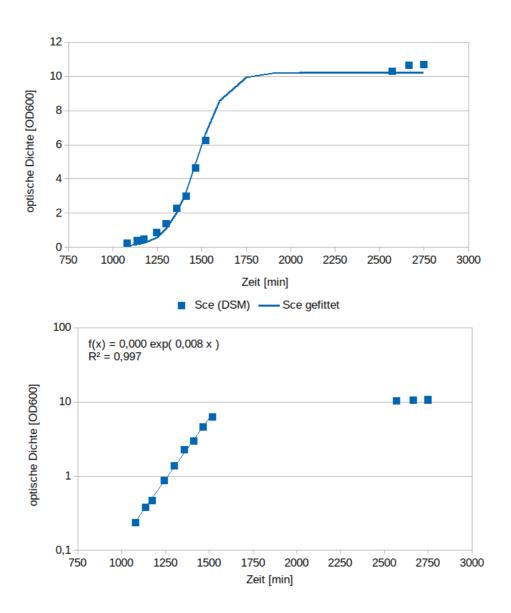


Abbildung 3.23.: Wachstumskurven von *S. cerevisiae* (DSM 70416) in YPD-Flüssigkultur: ermittelt mittels OD_{600} -Messungen. Die untere Graphik zeigt die logarithmische Darstellung der Wachstumskurve zur besseren Sichtbarkeit der exponentiellen Wachstumsphase.

23% (420 min) mehr Zellen als hybridisiert dargestellt, als nur mit der spezifischen Sonde alleine. Auch in der stationären Wachstumsphase der Kultur nach 24 h Wachstumszeit ist ein Effekt der Hilfssonden gegenüber der spezifischen Sonde alleine zu erkennen. Hier wird ebenfalls der Anteil der als hybridisiert erkannten Zellen um 24,7 % erhöht. Nach sieben Tagen des Kulturwachstums ist diese Steigerung nicht ganz so deutlich, aber noch sichtbar. Eine Auswertung von Mischungen von Hefespezies beziehungsweise von nativen Proben sollte durch die Nutzung von Hilfssonden auch in stationären Wachstumsphasen der Hefezellen möglich sein. Während der lag-Phase der Kultur (30 min) ist eine Steigerung des Anteils als hybridisiert sichtbarer Zellen durch die Hilfssonden um 28,7 % möglich. Hier lässt sich erst durch die Hilfssonden eine geringfügige Hybridisierung erkennen was einen Nachweis von H. uvarum-Zellen in der lag-Phase in einer Reinkultur möglich macht. An Hand der normalisierten Medianwerte ist ersichtlich, dass die Fluoreszenzintensität mit Einsatz der Hilfssondenkombination um das 1,5- bis 2,5-fache gesteigert werden kann (siehe Abb. 3.24 unten). Der Vergleich von S. cerevisiae mit Hilfssonden während dem Wachstumsverlauf der Kultur ist aus Zeitgründen nicht erfolgt.

In Abb. 3.25 ist zu erkennen, dass bei *P. anomala* über die komplette exponentielle Wachstumsphase der Kultur hinweg ein Nachweis der Hefen durch den Einsatz der Hilfssonden möglich ist. Die Fixierdauer in Formaldehyd beträgt auch in diesem Versuch 24 h. Hier können über 87,5 % der gesamten Zellen als hybridisiert dargestellt werden. In der lag-Phase und der stationären Phase können noch über 76,5 % der Zellen als hybridisierbar nachgewiesen werden.

In Abb. 3.26 ist der Effekt der Hilfssonden im Verlauf des Kulturwachstums bei *D. bruxellensis* dargestellt. Auch hier ist der Prozentsatz der als hybridisiert darstellbaren Zellen nach Verwendung der Hilfssonden im Vergleich zu der Euk-Sonde aufgezeigt. Als Sonden-Hilfssondenkombination werden hier gleichzeitig die beiden Dbrux-Sonden 1.1 und 1.2 mit ihren jeweiligen Hilfssonden H1LH2L beziehungsweise H1H2L eingesetzt. Dank dieser Sondenkombination ist während des kompletten Wachstumsverlaufs der *D. bruxellensis*-Kultur ein Nachweis von über 85,2%, bis zu 94,9% der Zellen möglich. Die Fixierdauer in diesem Versuch beträgt 24 h. Ohne die Nutzung der Hilfssonden ist bei *P. anomala* und *D. bruxellensis* kein Nachweis hybridisierter Zellen möglich. Auch bei einer verlängerten Formaldehyd-Fixierzeit von 24 h kann ohne Hilfssonden kein Nachweis dieser Spezies erbracht werden. Aus diesem Grund wird auf eine Gegenüberstel-

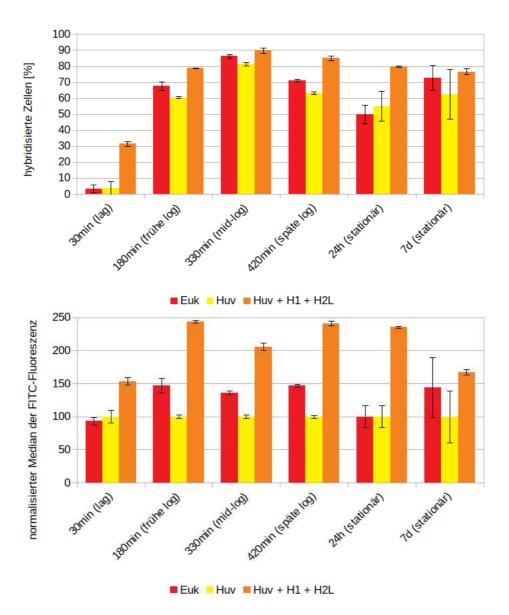


Abbildung 3.24.: Effekt der Hilfssonden im Verlauf des Kulturwachstums in YPD-Medium bei *H. uvarum*: oben: Anzahl hybridisierter Zellen [%]; unten: normalisierter Median; n=3

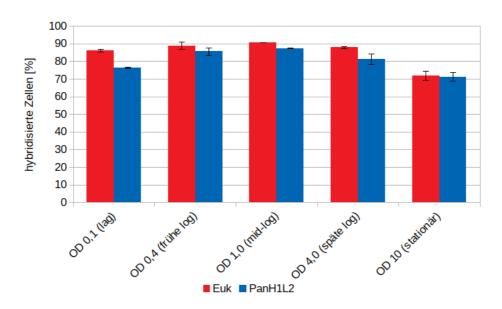


Abbildung 3.25.: Effekt der Hilfssonden im Verlauf des Kulturwachstums bei $\emph{P. anomala}$: n=3

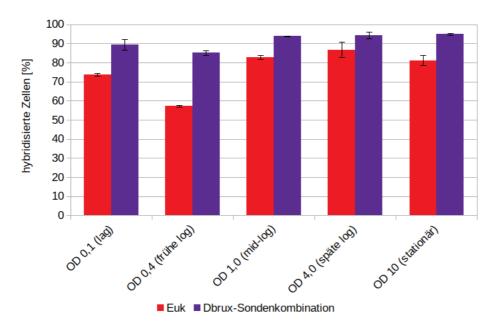


Abbildung 3.26.: Effekt der Hilfssonden im Verlauf des Kulturwachstums bei *D. bruxellensis*: n=3

lung von mit und ohne Hilfssonden im Wachstumsverlauf dieser beiden Spezies verzichtet.

3.4. Fremdsonden / Kreuzreaktivität

Um die Spezifität der Sonden zu belegen, werden Versuche mit *H. uvarum* und *S. cerevisiae* und sämtlichen untersuchten hefespezifischen Sonden durchgeführt. Hierbei wird eine Reinkultur der Hefespezies, außer mit der jeweiligen spezifischen Sondenkombination, auch mit sämtlichen anderen vorhandenen unspezifischen Sondenkombinationen hybridisiert (Abb. 3.27 und Abb. 3.28).

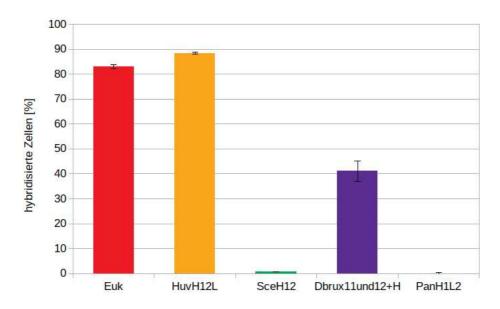


Abbildung 3.27.: H. uvarum hybridisiert mit spezifischen und unspezifischen Sonden: n=3

Eine Reinkultur von *H. uvarum* zeigt hierbei kein Signal an hybridisierten Zellen mit der *P. anomala*-Sondenkombination PanH1L2 und einen geringen Anteil an hybridisierten Zellen von 0,7 % mit der für *S. cerevisiae* spezifischen Sondenkombination SceH12. Mit der spezifischen Sondenkombination für *D. bruxellensis* D. brux 1.1 H1LH2L mit D. brux 1.2 H1H2L zeigt *H. uvarum* eine Kreuzreaktion von 41,1 % hybridisierten Zellen (siehe Abb. 3.27). Die Ergebnisse dieses Versuches sind mit denen ohne Einsatz von Hilfssonden vergleichbar (siehe Abb. 3.1). Betrachtet man das FL1-Fluoreszenzhistogramm der Negativkontrolle, erkennt man einen klar definierten Peak (siehe Abb. 3.29 jeweils die roten Kurven). Die

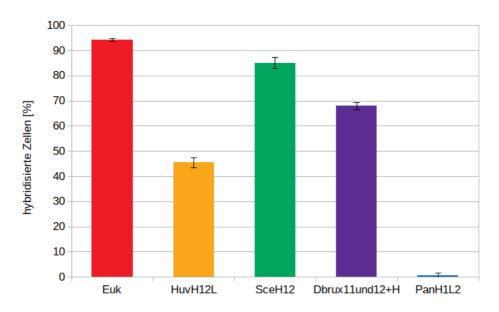


Abbildung 3.28.: *S. cerevisiae* hybridisiert mit spezifischen und unspezifischen Sonden: n=3;

für *H. uvarum* unspezifische *S. cerevisiae*-Sonde und *P. anomala*-Sonde zeigt ein identisches Fluoreszenzhistogramm (siehe Abb. 3.29 C und E), wohingegen das Fluoreszenzhistogramm der spezifischen *H. uvarum*-Sonde und der Eukaryontensonde Euk einen deutlich von der Negativkontrolle abgesetzten Peak mit höherer Fluoreszenzintensität anzeigt (siehe Abb. 3.29 A und B). Das Fluoreszenzhistogramm der *D. bruxellensis*-Sondenkombination zeigt eine Schulter mit leicht höherer Fluoreszenz als die nonEuk-Kontrolle (siehe Abb. 3.29 D)., was sich auch in der errechneten Kreuzreaktion der Sondenkombination widerspiegelt (siehe Abb. 3.27).

S. cerevisiae in Reinkultur zeigt ein minimales Signal an hybridisierten Zellen von 0,7% mit der für P. anomala spezifischen Sondenkombination PanH1L2 (siehe Abb. 3.28). Mit der Sondenkombination D. brux 1.1 H1LH2L mit D. brux 1.2 H1H2L, welche spezifisch für D. bruxellensis ist, zeigt S. cerevisiae eine Kreuzreaktion mit einem Anteil von 67,9% hybridisierten Zellen. Mit der spezifischen Sondenkombination für H. uvarum zeigen die S. cerevisiae-Zellen einen Anteil hybridisierter Zellen von 45,3% (siehe Abb. 3.28). Auch bei S. cerevisiae zeigt die non-Euk-Kontrolle einen klar definierten Peak in allen Proben (siehe Abb. 3.30 jeweils die roten Kurven). Das Fluoreszenzhistogramm der spezifischen Sonde SceH12 und der Eukaryontensonde Euk zeigt einen deutlich zur Negativkontrolle abgesetzten Peak mit höherer Fluoreszenzintensität (siehe Abb. 3.30 A und C). Die

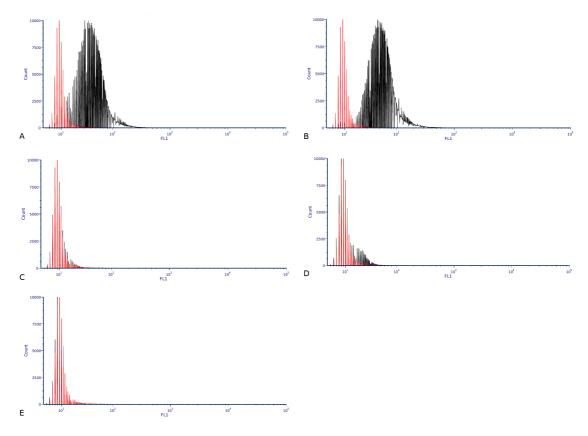


Abbildung 3.29.: *H. uvarum* hybridisiert mit spezifischen und unspezifischen Sonden: Histogramme der FL1-Fluoreszenz;

A = H. uvarum hybridisiert mit Euk;

B = H. uvarum hybridisiert mit HuvH12L;

C = H. uvarum hybridisiert mit SceH12;

D = H. uvarum hybridisiert mit Dbrux1.1 und Dbrux1.2 jeweils mit Hilfssonden;

E = H. uvarum hybridisiert mit PanH1L2;

rot = non-Euk-Kontrolle; schwarz = artspezifische Sondenkombination; n = 3

P. anomala-Sonde weist ein zur nonEuk-Kontrolle nahezu identisches Fluoreszenzhistogramm auf (siehe Abb. 3.30 E). Bei der *H. uvarum*-Sondenkombination zeigt sich eine Schulter mit höherer Fluoreszenz als die nonEuk-Kontrolle (siehe Abb. 3.30 B), bei der *D. bruxellensis*-Sondenkombination ist dies ein deutlicher Peak (siehe Abb. 3.30 D). Diese Beobachtungen spiegeln sich auch in den errechneten Kreuzreaktionen wider (siehe Abb. 3.28). Auf die Widersprüchlichkeiten zu anderen Versuchen, bei denen diese Kreuzreaktivitäten nicht auffallen, wie in den Mischungsversuchen (siehe Kapitel 3.6) und in den Praxisproben (siehe Kapitel 3.8) wird in der Diskussion (siehe Kapitel 4.4) eingegangen.

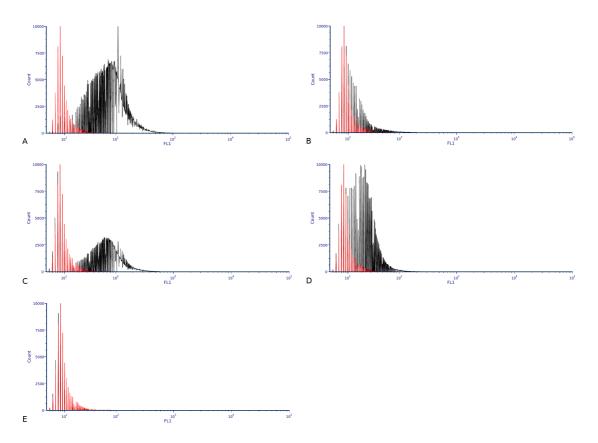


Abbildung 3.30.: S. cerevisiae hybridisiert mit spezifischen und unspezifischen Sonden:

Histogramme der FL1-Fluoreszenz;

A = S. cerevisiae hybridisiert mit Euk;

B = S. cerevisiae hybridisiert mit HuvH12L;

C = S. cerevisiae hybridisiert mit SceH12;

D = S. cerevisiae hybridisiert mit Dbrux1.1 und Dbrux1.2 jeweils mit Hilfssonden;

E=S. cerevisiae hybridisiert mit PanH1L2;

rot = non-Euk-Kontrolle; schwarz = artspezifische Sondenkombination; n = 3

3.5. Mindestzellzahl für einen erfolgreichen FISH-Assay

Vor allem in frühen, noch ruhenden Wachstumsphasen der Kultur (lag-Phase) beziehungsweise, wenn in einer Realprobe die Fermentation noch nicht gestartet ist, können in der Fixierung für den Flow-FISH Assay nicht genug Zellen vorhanden sein, um die standardmässig verwendete Zellzahl von 2*10⁶ Zellen je Ansatzgefäss zu erreichen. Eine Lösungsmöglichkeit ist die Verwendung von mehr Probenmaterial für die Fixierung, möglicherweise auch durch Aufkonzentrierung der Probe. Durch den Einsatz von mehr Probenmaterial erhöht man jedoch auch die Anzahl an Fremdpartikeln, beispielsweise Trub, welche eine flusszytometrische Beurteilung der geringen Hefepopulation erschweren.

Standardmässig wird mit 2*10⁶ Zellen je Ansatzgefäss gearbeitet. Je FISH-Assay werden so bei einer Dreifachbestimmung je spezifische Sonde 6*10⁶ Zellen benötigt. Zusätzlich benötigt man für die Hintergrund- beziehungsweise Negativkontrolle im Doppelansatz 4*10⁶ Zellen insgesamt. Nicht immer kann die für die Fixierung verwendete Hefekultur beziehungsweise Fermentationsprobe diese Anzahl an Zellen liefern. Aus diesen Gründen ist es notwendig, vor dem Einsatz des Assays in Mischungen oder gar in Praxisproben die für eine erfolgreiche Hybridisierung notwendige Mindestzellzahl zu ermitteln.

3.5.1. Mindestzellzahl *H. uvarum*

Hierfür werden aus einer Formaldehydfixierung einer *H. uvarum*-Reinkultur in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600}=1$) serielle Verdünnungen hergestellt. Die untersuchten Verdünnungsschritte betragen 100 % ($2*10^6$ Zellen), 10 % ($2*10^5$), 5 % (10^5), 2,5 % ($5*10^4$), 1 % ($2*10^4$) und 0,1 % ($2*10^3$) der normalerweise je Ansatz verwendeten Zellzahl von $2*10^6$ Zellen je Ansatzgefäss (Abb. 3.31). Die Zellen werden mit der für $2*10^6$ Zellen üblichen Menge an Sonden hybridisiert. Bis zu einer Zellanzahl von 2,5 % der üblich eingesetzten Zellen ($5*10^4$) können keine deutlichen Unterschiede zu dem vollständigen Zellansatz festgestellt werden (siehe Abb. 3.31). Bei 1 % der Zellen sinkt die Hybridisierungsrate auf 70,2 %. Bei 2000 Zellen liegt der Anteil bei 22 % hybridisierten Zellen.

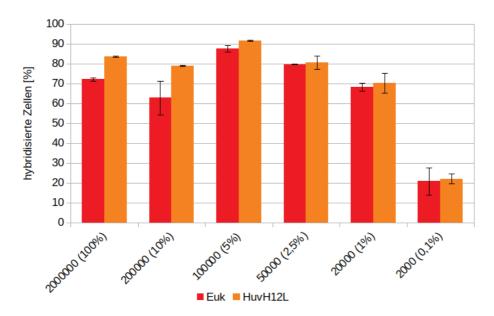


Abbildung 3.31.: Hybridisierte *H. uvarum*-Zellen in verschiedenen Verdünnungen ausgehend von der üblicherweise verwendeten Zellzahl von 2*10⁶ Zellen pro Ansatzgefäss: n = 3

3.5.2. Mindestzellzahl S. cerevisiae

Zur Ermittlung einer Mindestzellzahl für eine erfolgreiche Hybridisierung bei *S. cerevisiae* werden von einer Reinkultur in YPD-Medium in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600}=1$) serielle Verdünnungen hergestellt und in Formaldehyd für 20 h fixiert. Die untersuchten Verdünnungsschritte betragen 100 % (2*10⁶ Zellen), 10 % (2*10⁵), 2,5 % (5*10⁴) und 1 % (2*10⁴) der normalerweise je Ansatz verwendeten Zellzahl von 2*10⁶ Zellen je Ansatzgefäss (Abb. 3.32). Während bei 100 % der *S. cerevisiae*-Zellen ein Anteil von 94,6 % an hybridisierten Zellen erreicht wird, werden bei niedrigeren Zellzahlen nur 65,6 % (10 % (2*10⁵)) beziehungsweise 61,8 % (2,5 % (5*10⁴)) hybridisierte Zellen nachgewiesen. Bei 1 % beziehungsweise 20.000 Zellen in der Fixierung können 45,4 % als hybridisiert nachgewiesen werden.

3.6. FISH in Mischungen / Wiederfindung

Da in nativen Proben neben *S. cerevisiae* auch andere Hefespezies vorliegen, wird die Wiederfindung von *H. uvarum* und *S. cerevisiae* in definierten Mischun-

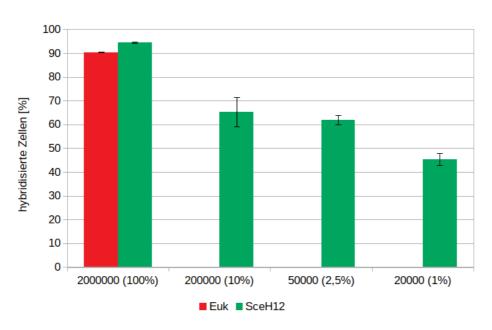


Abbildung 3.32.: Hybridisierte *S. cerevisiae*-Zellen in verschiedenen Verdünnungen ausgehend von der üblicherweise verwendeten Zellzahl von 2∗10⁶ Zellen pro Ansatzgefäss: n = 3

gen beurteilt. Ausgehend von einer Gesamtzellzahl je Ansatzgefäss von 2*10⁶ Zellen werden Mischungen aus S. cerevisiae und H. uvarum aus Reinkulturfixierungen aus der mittleren exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 1$) der Kulturen in bestimmten Prozentverhältnissen hergestellt. Anschließend erfolgt eine Hybridisierung nach dem etabliertem Protokoll (siehe Kapitel 2.4.4.4) mit der spezifischen Sonde für H. uvarum inklusive Hilfssonden und der Eukaryontensonde (siehe Abb. 3.33). Bei einer reinen H. uvarum-Kultur können hier 79,2 % der H. uvarum-Zellen nachgewiesen werden. Sind in der Kultur 75 % H. uvarum vorhanden, liegt die Nachweisbarkeit bei 63,1 %. Bei einem H. uvarum-Anteil von 50% an der Hefekultur werden 60,6% H. uvarum-Zellen in den gesamten Zellen nachgewiesen. Liegen in der Mischung 25 % H. uvarum vor, werden auch 23,7% H. uvarum-Zellen als hybridisiert nachgewiesen. Sind in der Mischung 10 % H. uvarum-Zellen vorhanden, beträgt der Anteil als hybridisiert nachgewiesener Zellen 25,7 %. In einer reinen S. cerevisiae-Kultur liegt der nachgewiesene H. uvarum-Anteil bei 0,4% (siehe Abb. 3.33). Es zeigt sich ein linearer Verlauf zwischen dem Anteil gemessener und vorhandener H. uvarum-Zellen, welcher mit abnehmender Konzentration an H. uvarum stets etwas mehr Zellen anzeigt, als vorhanden sind (siehe Abb. 3.34). In der Probe, welche nur S. cerevisiae enthält, kann keine Kreuzreaktivität mit der H. uvarum-Sondenkombination detektiert werden, was allerdings auch auf die unübliche starke Fluoreszenz der nonEuk-Kontrolle in diesem Probendurchlauf zurückzuführen sein könnte (siehe Abb. 3.35 F). In den dazu gehörigen Histogrammen der FITC-Fluoreszenz zeigt sich mit abnehmender H. uvarum-Konzentration auch eine abnehmende Fluoreszenzintensität korrelierend mit der Abnahme an mit der Huv-Hilfssonden-Kombination hybridisierter Zellen (siehe Abb. 3.35). Generell zeigt die nonEuk-Kontrolle bei dieser Versuchsreihe ein stärker als üblich fluoreszierendes Signal, was hauptsächlich bei der Probenvariante mit 0% H. uvarum und 100 % S. cerevisiae die Anzahl hybridisierter Zellen beeinflusst haben könnte (siehe Abb. 3.35 F). Die in Abb. 3.35 F erkennbare Schulter im Probenhistogramm spricht für ähnliche Kreuzreaktionen, wie sie auch in Versuch 3.28 auftreten. Es ist erkennbar, dass eine reelle Bindung der Huv-Hilfssonden-Kombination ein Signal mit höherer Fluoreszenzintensität erzeugt (siehe Abb. 3.35 A-E). Mit abnehmender H. uvarum-Konzentration bildet sich diese störende Schulter niedriger Fluoreszenz immer stärker aus. Auch bei 10 % und 25 % H. uvarum-Konzentration lässt sie sich bereits deutlich erkennen (siehe Abb. 3.35 D und E).

Zur Verifizierung der oben beschriebenen Ergebnisse wird ein weiterer FISH-Assay mit nur 20.000 Zellen pro Ansatzgefäss durchgeführt (siehe Abb. 3.36). Es handelt sich um Mischungen aus *H. uvarum* und *S. cerevisiae*, die mit Huv-Sonde inklusive Hilfsonden hybridisiert werden. In einer reinen *H. uvarum*-Kultur werden 68% der *H. uvarum*-Zellen nachgewiesen. Bei einem *H. uvarum*-Anteil von 75% beträgt der nachgewiesene Anteil an *H. uvarum*-Zellen an den gesamten Zellen 50%. In einer Kultur, in der zur Hälfte *H. uvarum* vorliegt, werden 42% *H. uvarum*-Zellen ingesamt nachgewiesen. Bei einem *H. uvarum*-Anteil von 25% in der Hefekultur werden 27,2% *H. uvarum* von der Gesamtzellzahl nachgewiesen, bei 10% *H. uvarum*-Anteil in der Hefekultur werden 13,5% nachgewiesen (siehe Abb. 3.36). Es zeigt sich ein linearer Verlauf bei Auftragung von gemessenen gegen vorhandene *H. uvarum*-Zellen (siehe Abb. 3.37). Es ist ein Nachweis von 10% *H. uvarum*-Zellen im Ansatz möglich. Dies entspricht 2.000 Zellen je Ansatz.

Weitere Versuche enthalten, zusätzlich zu *H. uvarum* und *S. cerevisiae*, *P. anomala* (siehe Abb. 3.38). Die Zellen stammen aus Reinkulturen in YPD-Medium und werden jeweils für 30 min in Formaldehyd fixiert. Das Mischungsverhältnis der fixierten Zellen beträgt 50 % *H. uvarum* und 50 % *P. anomala* beziehungsweise 33 % *H. uvarum*, 33 % *S. cerevisiae* und 33 % *P. anomala* bei einer Gesamtzell-

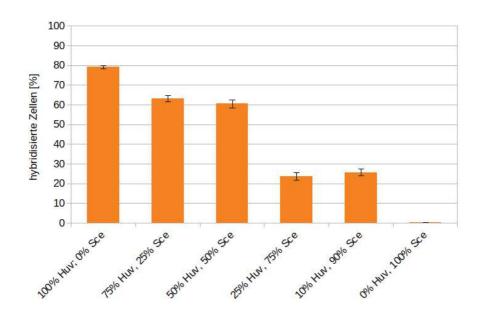


Abbildung 3.33.: Hybridisierte Zellen in verschiedenen Mischungen aus *H. uvarum* und *S. cerevisiae* bei Verwendung von 2*10⁶ Zellen je Ansatzgefäss und der Sondenkombination HuvH1H2L: n = 3

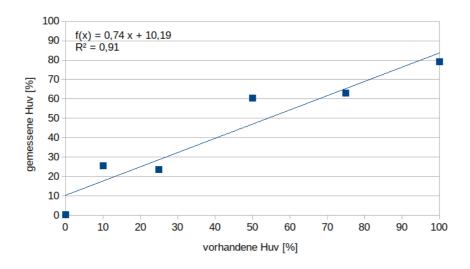


Abbildung 3.34.: Lineare Auftragung gemessener zum Anteil vorhandener Huv-Zellen in Mischungen aus *H. uvarum* und *S. cerevisiae* bei Verwendung von 2*10⁶ Zellen je Ansatzgefäss und der Sondenkombination HuvH1H2L: n = 3

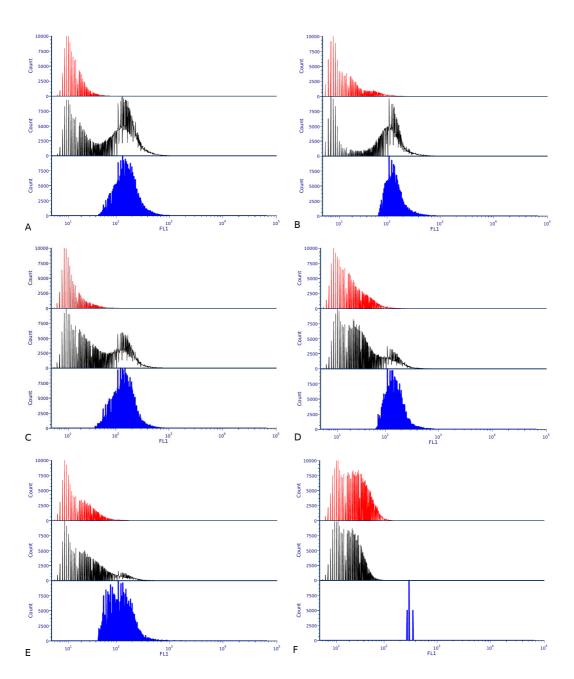


Abbildung 3.35.: Histogramme der FITC-Fuoreszenz mit Overton-Substraktion in verschiedenen Mischungen aus *H. uvarum* und *S. cerevisiae* bei Verwendung von 2*10⁶ Zellen je Ansatzgefäss und der Sondenkombination HuvH1H2L:

A = 100 % H. uvarum, 0 % S. cerevisiae;

B=75 % H. uvarum, 25 % S. cerevisiae;

C = 50 % H. uvarum, 50 % S. cerevisiae;

D = 25 % H. uvarum, 75 % S. cerevisiae;

E = 10 % H. uvarum, 90 % S. cerevisiae;

F=0 % H. uvarum, 100 % S. cerevisiae;

rot = nonEuk-Kontrolle; schwarz = Probe; blau = Histogramm Overton-

Substraktion

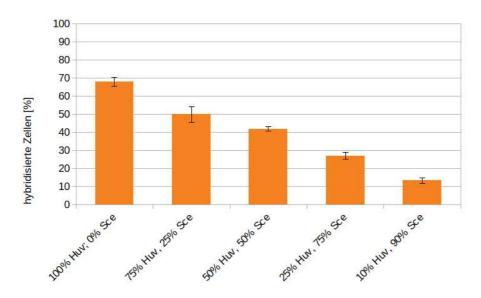


Abbildung 3.36.: Hybridisierte Zellen in verschiedenen Mischungen aus *H. uvarum* und *S. cerevisiae* bei Verwendung von 2*10⁴ Zellen je Ansatzgefäss und der Sondenkombination HuvH1H2L: n = 3

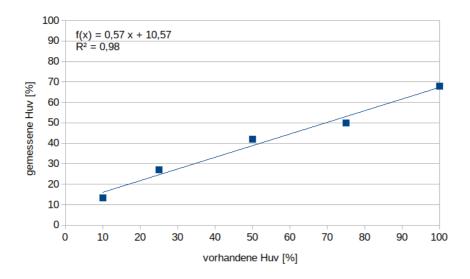


Abbildung 3.37.: Lineare Auftragung gemessener zum Anteil vorhandener Huv-Zellen in verschiedenen Mischungen aus *H. uvarum* und *S. cerevisiae* bei Verwendung von 2*10⁴ Zellen je Ansatzgefäss und der Sondenkombination HuvH1H2L: n = 3

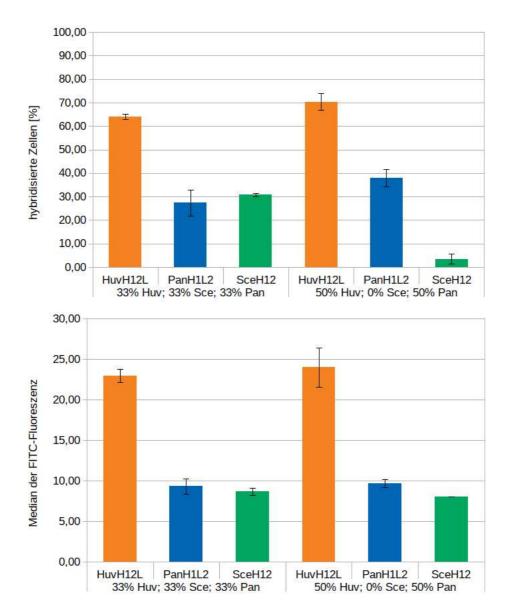


Abbildung 3.38.: Hybridisierte Zellen in verschiedenen Mischungen aus *H. uvarum, S. cerevisiae* und *P. anomala*: oben: hybridisierte Zellen [%], unten: Median der FITC-Fluoreszenz; n = 3

zahl von 2∗106 Zellen je Ansatzgefäß.

Bei einem Anteil von 50 % H. uvarum werden 70,4 % hybridisierte Zellen in den gesamten Zellen des Ansatzes mit der Huv-Hilfssonden-Kombination nachgewiesen. Mit der P. anomala-Sonde beträgt der Anteil nachgewiesener hybridisierter Zellen im Ansatz 38 % bei 50 % P. anomala-Zellen in der Mischung (siehe Abb. 3.38). Die jeweiligen Mediane der FITC-Fluoreszenz dieses Versuches liegen bei 24 für HuvH12L und 9,7 bei PanH1L2. Bei der SceH12-Sondenkombination wird ein Median der FITC-Fluoreszenz von 8 erreicht. Erfahrungsgemäß entspricht ein Medianwert von 8 einem Nullwert ohne Zellen, was sich auch in der hier gemessenen Anzahl hybridisierter Zellen mit der SceH12-Sondenkombination widerspiegelt, da hiervon bei diesem Versuchsaufbau keine vorhanden waren. Im weiteren Versuch werden jeweils 33 % H. uvarum, S. cerevisiae und P. anomala gemischt und mit den entsprechenden spezifischen Sonden analysiert. Mit der H. uvarum-Sondenkombination werden so 64% hybridisierte Zellen im gesamten Ansatz bei 33 % enthaltenen Zellen (siehe Abb. 3.38 oben) mit einem FITC-Fluoreszenzmedian von 23 nachgewiesen (siehe Abb. 3.38 unten). Von den 33 % enthaltenen P. anomala-Zellen können 27,5 % als hybridisierte Zellen in dem gesamten Ansatz erfasst werden. Der Median der FITC-Fluoreszenz beträgt mit der PanH1L2-Sondenkombination 9,3. Mit der SceH12-Sondenkombination werden 30,8% der gesamten Zellen als hybridisiert erfasst, wenn in dem Ansatz 33% S. cerevisiae enthalten sind. Der Median der FITC-Fluoreszenz liegt hier bei 8,7. Die in diesem Versuch gemessenen Werte an hybridisierten Zellen entsprechen in etwa der Anzahl der vorhandenen Zellen jeder Spezies. Bei H. uvarum werden etwa doppelt soviele Zellen nachgewiesen, wie tatsächlich vorhanden sind. Trotz der niedrigen Medianwerte bei P. anomala und S. cerevisiae stimmt auch hier der Anteil an hybridisierten Zellen mit dem Anteil der tatsächlich vorhandenen Zellen in etwa überein.

3.7. FISH mit verschiedenen Hefestämmen

Da der FISH-Assay bis zu diesem Zeitpunkt nur mit Stämmen aus einer etablierten Stammsammlung (DSMZ beziehungsweise AWRI) etabliert wurde, werden im weiteren Projektverlauf auch die jeweiligen Sondenkombinationen mit kommerziellen Stämmen und Isolaten aus der Stammsammlung des DLR Rheinpfalz

getestet (Abb. 3.39 und Abb. 3.40).

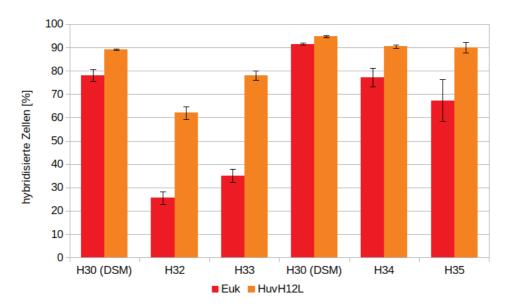


Abbildung 3.39.: Verschiedene Stämme von *H. uvarum* und ihre Hybridisierbarkeit mittels FISH: n=3

Die Hybridisierbarkeit von H. uvarum-Stämmen wird mit verschiedenen vorliegenden H. uvarum-Stämmen aus der internen Stammsammlung getestet und mit der Hybridisierbarkeit des DSM-Stammes (DSM 26650), welcher für die hier vorliegenden Versuche als Standardstamm von H. uvarum genutzt wird, verglichen (siehe Abb. 3.39). Die Hybridisierung erfolgt bei der Huv-Sonde mit der Hilfssondenkombination H1 und H2L. DSM 26650 zeigt hierbei bis zu 94,7 % hybridisierte Zellen mit Huv-Sonde inklusive der Hilfssonden H1 und H2L beziehungsweise bis zu 91,5 % mit Euk-Sonde. Die beiden H. uvarum-Stämme H34 und H35 erreichen ähnlich hohe Anzahlen an hybridisierten Zellen. Hingegen zeigen sowohl Stamm H32 als auch Stamm H33 eine deutlich schlechtere Hybridisierbarkeit. Bei H32 können nur 25,6 % der Zellen mit der Euk-Sonde hybridisiert werden und lediglich 62% der Zellen mit HuvH12L. H. uvarum-Stamm H33 zeigt leicht bessere Werte von 35 % mit der Euk-Sonde und 78,1 % mit der Huv-Sonde und den beiden Hilfssonden H1 und H2L. Auch bei Versuchswiederholung konnten keine höheren Hybridisierungseffizienzen bei diesen beiden Stämmen erreicht werden. H34 zeigt 77,2 % (Euk-Sonde) beziehungsweise 90,5 % (Huv-Sonde) als hybridisierte Zellen im Versuch. Bei H35 werden Werte von 67,4% (Euk-Sonde) beziehungsweise 89,9 % (Huv-Sonde) erreicht.

Im weiteren Verlauf wurde die Hybridisierbarkeit verschiedener S. cerevisiae-

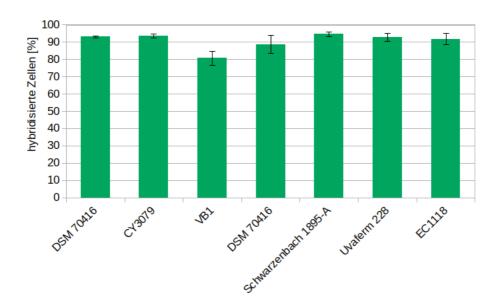


Abbildung 3.40.: Verschiedene Stämme von *S. cerevisiae* und ihre Hybridisierbarkeit mittels FISH: n=3

Stämme getestet. Die Fixierdauer in Formaldehyd beträgt hier, wie auch bei *H. uvarum*, 30 Minuten. Verwendet werden hierfür, neben dem für die hier vorliegenden Versuche verwendeten Standardstamm der DSM (DSM 70416), diverse Stämme aus gefriergetrockneten Starterkulturen (Lalvin CY3079™, Fermicru[®] VB1, Uvaferm 228 und Lalvin EC1118) und ein Stamm aus der Stammsammlung des DLR Rheinpfalz (Schwarzenbach 1895-A) (siehe Abb. 3.40). Die Hybridisierung erfolgt bei der Sce-Sonde inklusive der spezifischen Hilfssondenkombination H1 und H2. VB1 zeigt einen Anteil an hybridysierten Zellen von 80,7 %. Die weiteren Stämme, inklusive des DSM-Stammes, lassen sich bis zu einem Anteil von 91,8 bis 94,6 % hybridisieren.

3.8. Praxisproben

Während des Herbstes des letzten Projektversuchsjahres 2015 konnten Proben aus Spontanfermentationen aus 20 Liter-Gebinden gewonnen werden. Es handelt sich hierbei um Riesling unterschiedlicher Pfälzer Weingüter (siehe Abb. 3.41 bis 3.45), die im Rahmen der Dissertation von Kimmo Sirén fermentiert wurden. Des Weiteren wurden Proben aus mit kommerziellen Hefen gestarteten Fermentationen des Staatsweingutes Rheinland-Pfalz gesammelt (siehe Abb. 3.47 und

Abb. 3.48). Zusätzlich wurden für diese Arbeit Proben aus Spontanfermentationen von der Hochschule Geisenheim von Roxana Tudorie zur Verfügung gestellt (siehe Abb. 3.49 und Abb. 3.50). Die Geisenheimer Proben wurden, im Gegensatz zu den anderen Proben, welche wie üblich für 30 min mit Formaldehyd fixiert wurden, durch Zugabe von 70%-igem Ethanol fixiert.

In den Graphiken der verfolgten Spontanfermentationen ist jeweils, zusätzlich zu dem Anteil der hybridisierten Zellen mit der Euk-, HuvH12L-, SceH12- und PanH12-Sonde beziehungsweise Sondenkombination, der Alkoholgehalt (Alkohol [g/I]) dargestellt, um den Verlauf der Fermentation nachvollziehen zu können. Die Proben von der Hochschule Geisenheim wurden zusätzlich auch mit der Sondenkombination Dbrux11H1L2L und Dbrux12H12L hybridisiert.

In der ersten Variante der Riesling-Spontanfermentationen ist die Hauptphase der Fermentation nach etwa acht Tagen erreicht, wie sich aus dem Anstieg des Alkoholgehaltes erkennen lässt (siehe Abb. 3.41). Zu Beginn der Fermentation nimmt der Anteil an hybridisierten *S. cerevisiae*-Zellen stetig zu, um dann nach Ende der Hauptfermentationsphase wieder abzufallen. Der Anteil an hybridisierten *H. uvarum*-Zellen nimmt mit Beginn der Fermentation stetig ab und verbleibt auf einem Niveau unterhalb der Nachweisgrenze. Der Anteil an mit der Euk-Sonde hybridisierten Zellen verläuft auf einem Niveau um 60 % und fällt gegen Ende der Hauptfermentationsphase ab. Die zweite Variante der Riesling-Spontanfermentationen

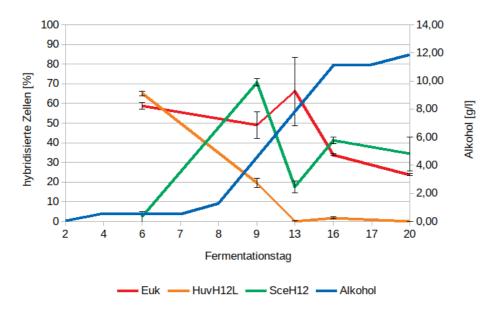


Abbildung 3.41.: Proben aus Spontangärungen 1. Variante: n=3

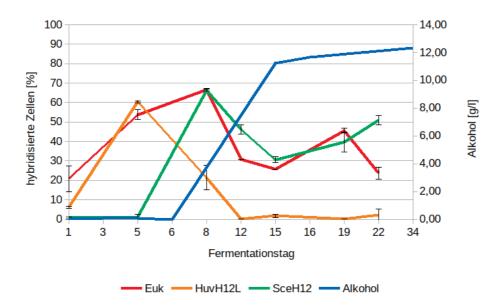


Abbildung 3.42.: Proben aus Spontangärungen 2. Variante: n=3

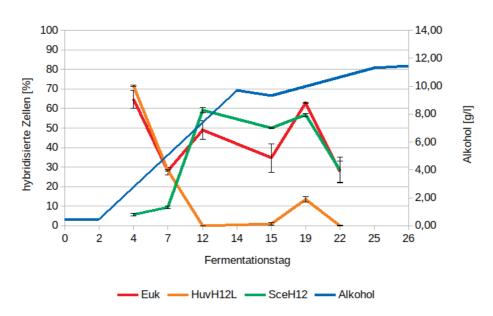


Abbildung 3.43.: Proben aus Spontangärungen 3 Variante: n=3

3.8 Praxisproben Ergebnisse

zeigt einen Anstieg des Alkoholgehaltes und somit den Beginn der Hauptfermentationsphase zwischen Tag 6 und Tag 8 (siehe Abb. 3.42). Der Gehalt an hybridisierten S. cerevisiae-Zellen nimmt zwischen dem fünften und achten Fermentationstag zu und danach wieder ab, um gegen Ende nochmal leicht anzusteigen. H. uvarum hat das gemessene Maximum an hybridisierten Zellen an Tag 5 erreicht. Der Anteil an H. uvarum nimmt danach im Lauf der weiteren Fermentation kontinuierlich ab. Die mit der Euk-Sonde hybridisierten Zellanteile folgen dem Verlauf der hybridisierten S. cerevisiae und H. uvarum-Zellen, in dem sie ähnliche Anteile hybridisierter Zellen anzeigen. Die dritte Variante der Riesling-Spontanfermentationen zeigt einen Beginn der Hauptfermentationsphase zwischen Tag 2 und Tag 14 (siehe Abb. 3.43). Ab Tag 7 steigt der Anteil hybridisierter S. cerevisiae-Zellen stark an, verbleibt ab Tag 12 auf einem Niveau um 60 %, um gegen Fermentationsende um Tag 19 herum, wieder abzufallen. Mit Anstieg der S. cerevisiae-Zellen nimmt der Anteil hybridisierter H. uvarum-Zellen stetig ab. Zum Start der Messungen liegen an Tag 4 über 70 % an H. uvarum in der Probe vor. Auch in dieser Variante folgt der Anteil der mit der Euk-Sonde hybridisierten Zellen dem Verlauf der Anteile von H. uvarum und S. cerevisiae. In der vierten

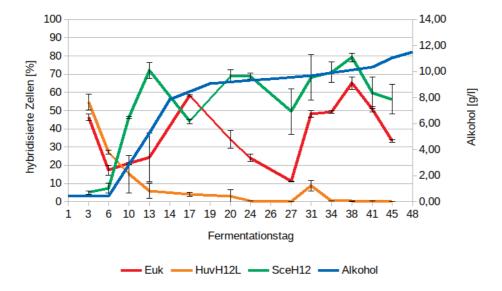


Abbildung 3.44.: Proben aus Spontangärungen 4. Variante: n=3

Variante der Riesling-Spontanfermentationen liegt die Hauptphase der Fermentation und somit der steilste Anstieg des Alkoholgehaltes zwischen dem sechsten und 14. Fermentationstag (siehe Abb. 3.44). Auch hier steigt, wie bei den anderen Varianten auch, der Gehalt an *S. cerevisiae*-Zellen ab Tag 6 und damit dem

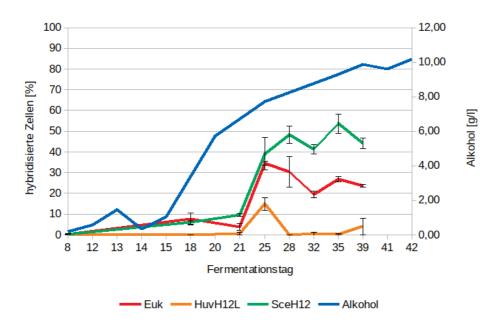


Abbildung 3.45.: Proben aus Spontangärungen 5. Variante: n=3

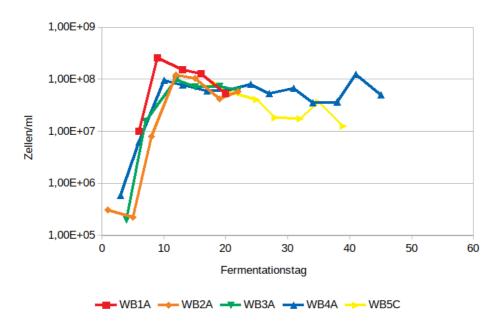


Abbildung 3.46.: Proben aus Spontangärungen Zellen / ml in der Gärung: Zellanzahl ermittelt aus fixierter Probe mittels Flusszytometer; n=3

Beginn der Hauptfermentationsphase stark an, um dann ab Tag 14 auf einem nahezu gleich verlaufenden Niveau von ca. 60 % hybridisierten Zellen zu verbleiben. Der anfänglich hohe Gehalt von 54,6 % an hybridisierten *H. uvarum-*Zellen nimmt vor Beginn der Hauptfermentationsphase ab. Der Gehalt an mit der Euk-Sonde hybridisierten Zellen folgt in etwa dem Gehalt von *H. uvarum* und *S. cerevisiae* in der Probe. Die fünfte Variante der Riesling-Spontanfermentationen zeigt ab Tag 15 einen deutlichen Antieg des Alkoholgehaltes (siehe Abb. 3.45). Der Gehalt an hybridisierten Eukaryonten- und *S. cerevisiae*-Zellen nimmt ab Tag 25 zu. *H. uvarum* zeigt lediglich an Tag 25 einen leichten Anstieg im Anteil hybridisierter Zellen.

Von den oben vorgestellten fünf Varianten der Riesling-Spontanfermentationen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten flusszytometrisch der Anteil der Zellen pro ml in der Fermentation ermittelt (siehe Abb. 3.46). Es ist zu erkennen, dass der Anstieg der Zellzahl bei allen Varianten ähnlich verläuft. Nach einem Start mit etwa 2*10⁵ Zellen/ml steigen die Zellzahlen mit Fermentationsbeginn kontinuierlich auf circa 10⁸ Zellen/ml an. Das Maximum der Zellzunahme ist in etwa an Tag 9 erreicht. Bei Variante 5 wurde, auf Grund des stockenden Fermentationsstartes, erst mit Zunahme des Alkoholgehaltes an Tag 18 mit der Zellzählung begonnen. Nach dem Maximum der Zellzunahme, die in etwa mit dem jeweiligen Beginn des Anstiegs des Alkoholgehaltes korreliert, verbleibt der Zellgehalt auf einem ähnlichen Niveau und nimmt erst gegen Ende der Fermentation wieder leicht ab. Die beiden untersuchten Fermentationen aus dem Staatsweingut mit Johannitergut Neustadt a. d. Weinstraße wurden mit einer kommerziellen Trockenreinzuchthefe (*S. cerevisiae*) beimpft und über eine Woche beobachtet (siehe Abb. 3.47 und Abb. 3.48).

Bei dem untersuchten Riesling aus dem Staatsweingut, werden im Most nur geringfügig hybridisierte Eukaryontenzellen nachgewiesen (10,4%) (siehe Abb. 3.47). Die anderen verwendeten Sonden (HuvH12L, SceH12 und PanH1L2) zeigen in Most Signale nahe Null. Dies spricht für das Vorhandensein anderer Hefespezies, für welche keine Sonde eingesetzt wurde. An Tag 4 sind deutlich mit der Euk-Sonde hybridisierte Zellen nachweisbar (75,3%). Der Anteil hybridisierter *H. uvarum*-Zellen liegt bei 25,8%. Mit der Sce-Sondenkombinationen hybridisierte Zellen können 83,6% nachgewiesen werden. Mit der *P. anomala*-Sondenkombination hybridisierte Zellen zeigen an Tag 4 und Tag 6 kein Signal. An Tag 7 hat der Anteil an *H. uvarum*-Zellen auf 1,8% abgenommen. Mit der Euk- be-

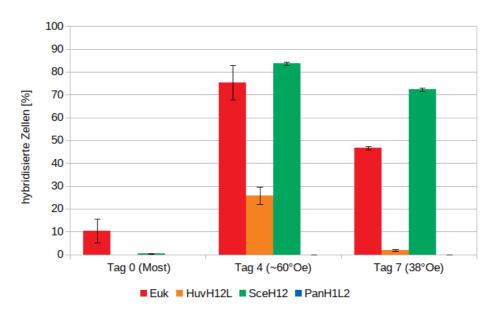


Abbildung 3.47.: Proben aus mit *S. cerevisiae* angeimpften Fermentationen aus dem Staatsweingut mit Johannitergut Neustadt a. d. Weinstraße; Tank 16 Riesling: n=3

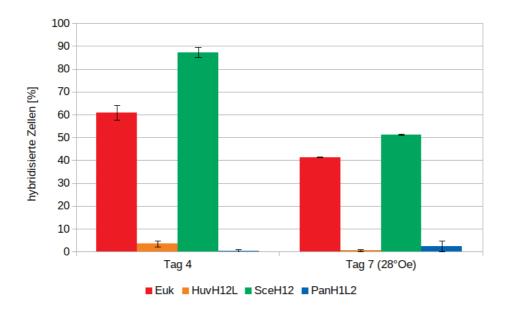


Abbildung 3.48.: Proben aus mit *S. cerevisiae* angeimpften Fermentationen aus dem Staatsweingut mit Johannitergut Neustadt a. d. Weinstraße; Tank 71 Silvaner: n=3

ziehungsweise mit der Sce-Sondenkombination werden an Tag 7 46,6 % beziehungsweise 76,6 % hybridisierte Zellen nachgewiesen. Die Fermentation des Silvanermostes aus dem Staatsweingut zeigt am vierten Fermentationstag nach Inokulation 61 % hybridisierte Zellen mit der Euk-Sonde und 87,3 % hybridisierte Zellen mit der für *S. cerevisiae* spezifischen Sondenkombination (siehe Abb. 3.48). Mit der *H. uvarum* spezifischen Sondenkombination zeigen sich 3,4 % hybridisierte Zellen an Tag 4 und 0,6 % hybridisierte Zellen an Tag 7. Mit der *P. anomala*-Sondenkombination hybridisierte Zellen zeigen an Tag 4 (0,4 %) und Tag 7 (2,4 %) ein ähnlich geringes Signal. An Tag 7 liegt der Anteil an mit der Euk-Sonde hybridisierten Zellen bei 41,4 % und der Anteil an mit der *S. cerevisiae* spezifischen Sondenkombination hybridisierten Zellen bei 51,3 %.

Die beiden Fermentationen aus Geisenheim wurden in 70%-igem Ethanol fixiert und nach der üblichen Vorgehensweise mit den vorhandenen Sondenkombinationen hybridisiert. Die erste Fermentation (siehe Abb. 3.49) zeigt lediglich an Tag 8 einen Anteil hybridisierter Zellen mit der Euk-Sonde (55,4%) und der Sce-Sondenkombination (61,1%). Die zweite Fermentation aus Geisenheim (siehe Abb. 3.50) zeigt in Most und am sechsten Fermentationstag mit allen Sonden einen geringen Anteil hybridisierter Zellen. An Tag 8 steigt der Anteil hybridisierter Zellen mit der Sce-Sondenkombination auf 56,9% an. An Tag 15 ist der Anteil hybridisierter Zellen mit der Sce-Sondenkombination auf 36,3% gesunken und mit der Euk-Sonde auf 93,9% gestiegen. Der Anteil hybridisierter Zellen mit der Dbrux-Sondenkombination zeigt an Tag 15 ebenfalls ein angestiegenes Signal auf 65,8%.

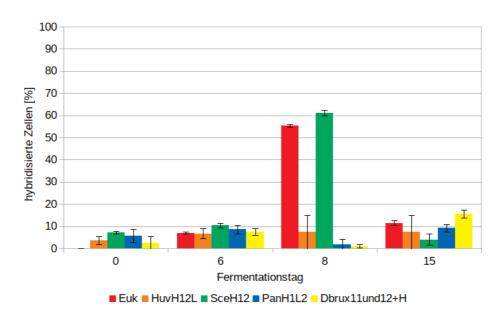


Abbildung 3.49.: Proben aus 1. Spontanfermentation aus Geisenheim nach Fixierung in 70%-igem Ethanol: n=3

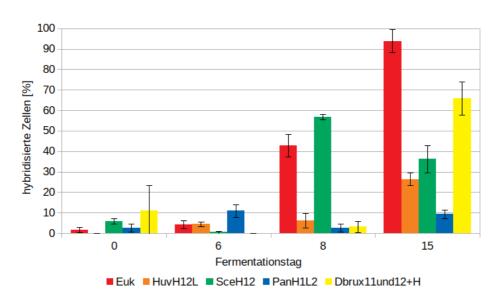


Abbildung 3.50.: Proben aus 2. Spontanfermentation aus Geisenheim nach Fixierung in 70%-igem Ethanol: n=3

4. Diskussion

4.1. Optimierung der Hybridisierungsbedingungen

Die Bedingungen zur Durchführung eines Flow-FISH Assays wurden erfolgreich optimiert. Die hier vorgestellten Methodenoptimierungen führen zu ausreichenden Hybridisierungseffizienzen in der logarithmischen Wachstumsphase der Hefezellen.

4.1.1. Negativkontrolle

Mit der in Kapitel 3.1.1 vorgestellten Methode, die nonEuk-Sonde als Negativkontrolle zu nutzen, können unspezifische Bindungen reduziert beziehungsweise ausgeschlossen werden. Nutzt man stattdessen als Negativkontrolle ungefärbte Hefezellen, kommt es zur Bildung scheinbarer Kreuzreaktionen mit für die analysierte Hefe unspezifischen Sonden. Dies konnte durch Vorversuche belegt werden (Vogelei, 2014). Auch in der Literatur wird diese Methode im Rahmen eines flusszytometrischen Nachweises von Schadhefen mittels FISH angewendet (Andorra et al., 2011; Serpaggi et al., 2010; Wang et al., 2014). Diese Vorgehensweise ist kritisch zu betrachten: Mit einer Negativkontrolle dieser Art bleiben unspezische Bindungen des Farbstoffes an der Zellwand der Hefen, unspezifische Reaktionen der Sonden und ähnliche Nebenreaktionen unberücksichtigt. Im Laufe der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Etablierungsversuche zeigt sich, dass eine Negativkontrolle in Form ungefärbter Zellen nicht zur Berechnung der Hybridisierungseffizienz herangezogen werden kann. Andere Varianten einer Negativkontrolle aus der Literatur sind in Kapitel 1.5.4 erläutert. Beim Nachweis von Bakterien mittels FISH gehört der Einsatz einer nicht-komplementären Sonde zur gängigen Praxis, um unspezifische Probenbindungen und Autofluoreszenz auszuschließen (Hugenholtz et al., 2002; Wallner et al., 1993). Um unspezifische Bindungen aus der Auswertung hinsichtlich der Hybridisierungseffizienz auszunehmen, wird die Idee von Kosse et al. (1997) aufgegriffen. In dieser Arbeit wird eine zu der Eukaryonten (Euk516)-Sonde komplementäre FITC-markierte Sonde verwendet (nonEuk). Die Grundidee dieser Form von Negativkontrolle stammt von Wallner et al. (1993). Diese verwenden die Komplementärseguenz zu Eub338 (universell bindende S-rRNA Sonde bei Bakterien) nonEub als Negativkontrolle beim Nachweis aquatischer Bakterien. Durch eine Negativkontrolle, wie sie Kosse et al. (1997) vorschlagen, können scheinbare Kreuzreaktionen mit unspezifischen Sonden, wie sie bei Nutzung von ungefärbten Zellen der untersuchten Hefespezies auftreten, deutlich reduziert werden. Auch unspezifische Reaktionen mit der Zellwand, Wechselwirkungen des Fluoreszenzfarbstoffes mit den Hefezellen und andere unspezifische Reaktionen der Sonde mit der Testsuspension, beziehungsweise darin enthaltenen Fremdorganismen oder anderen in der Probe vorliegenden Partikeln, können so ausgeschlossen werden. Die nonEuk-Sonde sollte keine spezifischen Bindungen mit den zu bestimmenden Hefearten eingehen können. So kann bei spezifisch markierten Proben das durch unspezifische Bindungen enstehende Hintergrundrauschen herausgerechnet werden und so die Hybridisierungseffizienz deutlich erhöht werden. Entsprechende Datenbankabgleiche und manuelle Aligments bestätigen die Unspezifität der nonEuk-Sonde gegenüber den untersuchten Hefespezies.

4.1.2. Optimierung von Temperatur, Sondenkonzentration, Inkubationsdauer der Hybridisierung und der SDS-Konzentration des Hybridisierungspuffers

Die Untersuchung der unterschiedlich langen Hybridisierungszeiten zeigt deutlich, dass eine Dauer von 60 min beziehungsweise 180 min nicht genügt, um ausreichende Hybridisierungseffizienzen zu erzielen, unabhängig von der Variierung der Temperatur- oder Sondenkonzentrationsparameter. Dennoch erkennt man bei 60 und 180 min Hybridisierungszeit mit zunehmender Sondenkonzentration auch eine Zunahme der Hybridisierungseffizienz (siehe Abb. 3.2). Dies ist auf ein verstärktes Rauschsignal durch unspezifische Bindungen und eine leichte Erhöhung der spezifischen Bindungen, welche auf Grund der vermehrt vorliegenden Sonden möglich sind, zurück zu führen. Eine ausreichende Hybri-

disierungseffizienz wird erst bei einer Hybridisierungsdauer von 960 min erzielt. Somit ist für eine erfolgreiche Hybridisierung eine Inkubationszeit von mindestens 960 min anzusetzen. Hier zeigen sich die höchsten Hybridisierungseffizienzen bei einer Sondenkonzentration von 3 pmol/µl (siehe Abb. 3.2). Eine Sondenkonzentration von 1,5 pmol/µl scheint für eine vollständige Hybridisierung aller Sondenbindungsstellen aller Hefezellen nicht auszureichen. Hier werden bei 41 °C und längster getesteter Hybridisierungszeit geringere Hybridisierungseffizienzen als mit den anderen beiden höheren Sondenkonzentrationen erreicht. Höhere Hybridisierungstemperaturen führen zu einer besseren Hybridisierung mit niedriger Sondenkonzentration. Allerdings kommt es durch Erhöhung der Hybridisierungstemperatur auch vermehrt zu unspezifischen Bindungen der Sonden, was auch, wie an den Fluoreszenzhistogrammen (nicht dargestellt) erkennbar, das Signal-Rausch-Verhältnis verschlechtert (siehe auch Vogelei, 2014). Eine Sondenkonzentration von 6 pmol/µl zeigt durchweg ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis. Dies spricht für eine Erhöhung unspezifischer Bindungen und eine etwas niedrigere Hybridisierungseffizienz, als sie mit einer Sondenkonzentration von 1,5 pmol/µl erreicht wird (siehe Abb. 3.2). Schon Wallner et al. (1993) zeigen, dass eine zu hohe Sondenkonzentration den Anteil unspezischer Färbungen erhöht.

In den Ergebnissen ist zu erkennen, dass eine höhere Sondenkonzentration und erhöhte Hybridisierungstemperatur die Reaktion des Assays anfänglich beschleunigt. Mit steigender Hybridisierungstemperatur nimmt der Anteil spezifisch hybridisierter Zellen jedoch ab, was mit der erschwerten spezifischen Bindung der Sonden bei höheren Hybridisierungstemperaturen erklärt werden kann. Die Hybridisierungstemperatur und Sondenkonzentration beeinflussen somit die Effektivität des Flow-FISH-Assays maßgeblich.

Die idealen Hybridisierungsbedingungen für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten erfolgreich ermittelt werden (siehe Kapitel 3.1.2). Die Standardhybridisierungsbedingungen für die weiteren Etablierungsversuche wurden auf eine Dauer von 16 h (960 min) bei 41 °C mit einer Sondenkonzentration von 3 pmol/µl festgesetzt. Bei dieser Temperatur und dieser Sondenkonzentration kann die höchste Hybridisierungseffizienz erreicht werden, ohne dass das Signal-Rausch-Verhältnis zu schlecht wird.

Der in dieser Arbeit optimierte Flow-FISH Assay kann in minimal 20 h inklusive Probenentnahme Ergebnisse liefern. Realistisch benötigt der Laborablauf circa 22 h ab Probenentnahme, bei Analyse mehrerer Proben zur vollen Ausnutzung der Laborgerätekapazität. Am meisten Zeit nimmt die Hybridisierung in Anspruch. Versuche die Hybridisierungszeit zu verkürzen zeigen, dass dies zu einer deutlichen Verschlechterung der Hybridisierungseffizienz führt (siehe Kapitel 3.1.2). Mit der Methode strikt nach dem Protokoll von Andorra et al. (2011), mit drei Stunden Hybridisierungszeit, kann für eine quantitative Auswertung keine ausreichende Hybridisierungseffizienz erreicht werden. Eine, wie auch von Andorra et al. dargestellte, rein qualitative Auswertung ist jedoch möglich. Eine Verlängerung der Hybridisierungsdauer von drei auf mindestens sechzehn Stunden führt zu einer Verbesserung der Effizienz und ermöglicht eine erfolgreiche Durchführung des Flow-FISH-Assays (siehe Kapitel 3.1.2). Für eine zeiteffizientere Nutzung des Flow-FISH- Assays ist zu untersuchen, ob Hilfssondenkombinationen auch ausreichende Werte mit einer kurzen Hybridisierungsdauer von 3-5h liefern. Die hier vorliegenden Versuche wurden noch ohne den Einsatz von Hilfssonden durchgeführt. Auch Yilmaz et al. (2006) zeigen, dass die Probenhelligkeit deutlich zunimmt, wenn man die Hybridisierungsdauer von 3 Stunden auf 96 Stunden erhöht. Diese Fluoreszenzzunahme ist möglicherweise auf die denaturierende Wirkung des SDS im Hybridisierungspuffer zurückzuführen (Behrens et al., 2003a; Yilmaz et al., 2006). Eine höhere Probenfluoreszenz kann eventuell auch durch eine Erhöhung der SDS-Konzentration im Hybridisierungspuffer erreicht werden (Branco et al., 2019), was eine niedrigere Hybridisierungszeit möglich machen würde. Da in dieser Arbeit mit der von Andorra et al. (2011) verwendeten SDS-Konzentration ausreichende Ergebnisse erzielt wurden, wurde diese Konzentration beibehalten (siehe Kapitel 3.1.3). Eine Erhöhung der Hybridisierungsdauer, beziehungsweise andere Protokolloptimierungen, sind nur solange notwendig, bis ein zufriedenstellendes Fluoreszenzsignal erreicht wird (Yilmaz et al., 2006). Eventuell kann die Hybridisierungsdauer auf unter 16 h gekürzt werden. Es wäre möglich, dass eine Sättigung der Bindestellen schon früher als in sechzehn Stunden erreicht werden kann. Da bei dem etablierten Testsystem eine Integration in den Laboralltag gewünscht ist, erschien eine Testung von Hybridisierungszeiten zwischen fünf und 16 h nicht praktikabel. Es wäre sinnvoll, diese Zeitspanne in Folgeversuchen zu untersuchen. Wallner et al. (1993) gelang es bereits nach fünf Stunden Hybridisierungszeit beim Nachweis von Escherichia coli mittels Flow-FISH Höchstwerte zu erreichen. Die in dieser Arbeit untersuchten 1 h, 3 h, 4 h und 5 h reichen mit dem vorliegenden Versuchsaufbau nicht für eine ausreichende Hybridisierung aus. Mit Probenanlieferung sehr früh am Morgen, besteht eventuell die Möglichkeit, die Hybridisierungsdauer so zu verkürzen, dass ein Ergebnis der Analyse am selben Arbeitstag vorliegen kann. Hierfür müssen allerdings vorher weitere Versuche zur Verkürzung der Hybridisierungsdauer auf über 5 h - 8 h durchgeführt werden (siehe dazu auch Kapitel 3.2).

4.1.3. Optimierung der Fixiermethode

An Hand der erzielten Hybridisierungseffizienzen bei den verschiedenen Fixiermethoden (siehe Kapitel 3.1.4) unterscheiden sich die untersuchten Fixiermethoden nur unwesentlich (siehe Abb. 3.6 und Abb. 3.7). Allerdings zeigen die Proben in den Auswerteplots Unterschiede, die durchaus relevant für die Genauigkeit der Analyse sind.

4.1.3.1. Formaldehydfixierung

Die Fixierung mit Formaldehyd (siehe Kapitel 2.4.3.1) stellt sich im Laufe der Etablierung als die zuverlässigste Methode zur Zellfixierung dar, so dass diese für alle weiteren Etablierungsversuche Verwendung findet. Die Problematik der notwendigen Laborausstattung zur adäquaten Handhabung von Formaldehyd und dessen Entsorgungsproblematik werden zu Gunsten der besten Zellfixierungsergebnisse in Kauf genommen. Eine längere Formaldehydfixierdauer korreliert mit dem verstärkten Vorhandensein von Zelltrümmern. Dies geht mit der Elimination von Zellen einher, was eine quantitative Analyse der Probe negativ beeinflusst. Eine Fixierdauer von 30 min hat sich als ausreichend zur Fixierung für die meisten Hefestämme erwiesen. Die Problematik verstärkter Zelltrümmer ist bei dieser Fixierungsdauer zu vernachlässigen, da ihre Anzahl immer noch deutlich geringer ist, als mittels auf Ethanol basierenden Fixierungen (siehe Abb. 3.9). Teilweise reicht eine dreißigminütige Fixierung nicht aus. Hier wird, nach Testung weiterer Fixierungszeiten, eine Fixierzeit von 24 h gewählt. Serpaggi et al. (2010) fixieren grundsätzlich für 24 h in 4%-iger Formaldehydlösung. Diese lange Fixierzeit scheint stellenweise für Stämme von S. cerevisiae, D. bruxellensis und P. anomala notwendig zu sein. Unter welchen Bedingungen eine verlängerte Fixierdauer für S. cerevisiae, D. bruxellensis und P. anomala notwendig ist,

sollte in weiteren Versuchen eruiert werden. In dieser Arbeit konnten sowohl dreißigminütige als auch 24 h Formaldehydfixierungen dieser Hefearten erfolgreich hybridisiert werden. Es ist kein Muster erkennbar, was eine Erklärung für das Phänomen, dass manchmal eine dreißigminütige Formaldehydfixierdauer nicht ausreicht, liefern könnte. Ein Grund für die unterschiedlich notwendigen Fixierzeiten könnte in speziesspezifischen Unterschieden der Zellwanddicke liegen. Zu beachten ist auch, dass eine verlängerte Formaldehydfixierdauer zu einer verstärkten Quervernetzung der Zellstrukturen führt. Es kann somit zu sterischen Hinderungen der Sondenbindung kommen (Moeller et al., 1977). Eine möglichst kurze Fixierdauer in Formaldehyd sollte einer längeren somit stets vorgezogen werden.

4.1.3.2. Ethanolfixierungen

Die Fixierung mit Formaldehyd hat den Nachteil, dass die Handhabung und Entsorgung von diesem problematisch sein kann. Aus diesem Grund sollten andere praxisnähere Fixiermöglichkeiten etabliert werden. Auch in der Literatur findet eine alleinige Fixierung mit Ethanol Anwendung (Amann et al., 1990a; Branco et al., 2019). In unserer Arbeitsgruppe wurden Erfahrungen mit Ethanolfixierungen für Reservestofffärbungen gesammelt (Sommer, 2020, eigene Versuche). Bei Reservestofffärbungen wird die Zellwandmembran beispielsweise durch eine Fixierung mit 70%-igem Ethanol ausreichend permeabilisiert, um ein Eindringen der Farbstoffe zu ermöglichen. Die geringe Länge der verwendeten FISH-Sonden lässt den Schluss zu, dass auch hier eine zur Diffusion der Sonden ins Zellinnere ausreichende Permeabilisierung der Zellwände gewährleistet sein könnte.

Die Fixierung der Hefezellen mit 70%-igem Ethanol (siehe Kapitel 2.4.3.2) und die weiter entwickelte Fixierungsmethode über eine aufsteigende Ethanolreihe (Gomez u. Forsburg, 2004) (siehe Kapitel 2.4.3.3) zeigen eine hohe Hybridisierungseffizienz. Die Fixierung über eine aufsteigende Ethanolreihe ist deutlich zeitaufwendiger als eine Formaldehydfixierung. Da Ethanol intrazelluläre Strukturen nicht quervernetzt, sondern zu Dehydration und Präzipitation von Nukleinsäuren und Proteinen führt, wird die Gefahr der Ausbildung von Protein-RNA-Komplexen reduziert. Ein vermehrtes Auftreten solcher Komplexe senkt die Zugänglichkeit der ribosomalen Zielsequenzen für die FISH-Sonde und somit auch die Testeffektivität (Gomez u. Forsburg, 2004). Allerdings führt die Fixierung mit Ethanol

zu einer verstärkten Clusterbildung der Hefezellen. Dies führt dazu, dass die Zusammensetzung der Hefepopulation möglicherweise nicht zuverlässig detektiert werden kann, da Zellklumpen die flusszytometrische Analyse negativ beeinflussen. Für eine schnelle Zellfixierung in der Praxis ist für eine Ethanolfixierung lediglich eine Zentrifuge notwendig. Das macht diese Fixiermethode für einen produktiven Einsatz des Flow-FISH-Assays attraktiv. Unter Berücksichtigung, dass die Ergebnisse möglicherweise von einer Zellverklumpung beeinflusst werden, kann diese Fixiermethode verwendet werden. Besser wäre es jedoch, Fermentationsproben so schnell wie möglich nach der Probennahme in ein Analyselabor zur Formaldehydfixierung zu liefern.

4.2. Erhöhung der Fluoreszenzintensität durch Hilfssonden

Hilfssonden erweisen sich als nützliches und notwendiges Hilfsmittel, um die Fluoreszenzintensität der hybridisierten Hefezellen zu steigern (siehe Kapitel 3.2). Die direkt an die spezifische Sonde angrenzenden Hilfssonden 1 und 2 erweisen sich in allen untersuchten Spezies (H. uvarum, S. cerevisiae, P. anomala und D. bruxellensis) als am effektivsten in der Steigerung der Fluoreszenz. Das Fluoreszenzsignal konnte verdoppelt (3.2.2 und 3.2.3) bis nahezu verfünffacht werden (3.2.4), was sich an der Steigerung des Medians der FITC-Fluoreszenz erkennen lässt. So stabilisiert sich auch die Hybridisierungseffizienz über ein breiteres Wachstumsspektrum. Erst mit Verwendung der Hilfssonden ist es möglich, das Fluoreszenzsignal der spezifischen Hefesonden soweit zu erhöhen, dass ein Nachweis über die komplette exponentielle Wachstumsphase durchführbar ist (siehe Kapitel 3.3.3). Stellenweise ist noch ein zuverlässiger Nachweis stationärer Zellen realisierbar. Hilfssonden ermöglichen somit, den Flow-FISH Assay in praxisbezogenen Fermentationen zu nutzen, um Schadhefen nachzuweisen. Bei einem frühzeitigen Nachweis, vor Beginn einer Fermentationsstörung oder des Auftretens von Fehltönen, befinden sich häufig nur wenige Zellen der Schadhefespezies in der Fermentation. Diese befinden sich nicht zwingend in der exponentiellen Wachstumsphase und können mittels Hilfssonden nachgewiesen werden.

Der Nachweis von Hanseniaspora uvarum mittels Flow-FISH ist mit denen in

dieser Arbeit dargestellten Optimierungen als effektiv und zuverlässig zu betrachten. Die vorgestellte Hilfssondenkombination ermöglicht einen Nachweis über nahezu den kompletten Wachstumsverlauf der Kultur und ist in künstlichem YPD-Medium und unter nativen Fermentationsbedingungen in Traubenmost möglich (siehe Kapitel 3.3 und Abb. 3.24). Stammabhängigkeiten können vorkommen, scheinen aber für die Nachweiseffizienz keine relevante Rolle zu spielen (siehe Abb. 3.39).

Auch der Nachweis von *Sacharomyces cerevisiae* ist mit der optimierten Methodik des Flow-FISH-Assays und der Hilfssondenkombination zuverlässig in künstlichem YPD-Medium und im nativen Fermentationsumfeld möglich. Stellenweise gibt es Probleme mit der Fixierbarkeit der Proben in Formaldehyd, zu deren Lösung die Fixierdauer verlängert werden muss. Stammabhängigkeiten scheinen auch bei *S. cerevisiae* vernachlässigbar zu sein (siehe Abb. 3.40).

Der Nachweis von Dekkera bruxellensis wird erst durch die in dieser Arbeit vorgestellte Hilfssondenkombination mit flusszytometrischem Nachweis möglich (siehe Kapitel 3.2.4) und kann über den gesamten Verlauf des Kulturwachstums erfolgen (siehe Abb. 3.26). Je nach dem vorherrschenden phänotypischen Erscheinungsbild der Hefezellen kann es sein, dass der Stamm nicht mit der hier vorgestellten flusszytometrischen Methode analysiert werden kann. Mikroskopisch stellen Pseudohyphen keinen Hinderungsgrund für eine Auswertung da, erschweren allerdings die Beurteilung der tatsächlichen Zellanzahl. Liegen die Zellen eines Stammes mehrheitlich als Pseudomycel vor, ist eine flusszytometrische Auswertung nicht möglich (siehe auch Kapitel 4.7). Dies könnte die Beurteilung unbekannter Proben stark erschweren. Im nativem Umfeld einer Weinfermentation sollte *D. bruxellensis* allerdings zu einem großen Teil als Einzelzellen vorliegen. Auch *Pichia anomala* kann mit der hier vorgestellten Methode mittels Hilfssonden effektiv in nahezu allen Kulturwachstumsphasen nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.2.4 und Abb. 3.25). Ohne Hilfssondeneinsatz gelang kein Nachweis dieser Spezies. Obwohl Pichia anomala üblicherweise in Most vorkommt (Xufre et al., 2006), gelang kein Nachweis dieser Hefespezies in den untersuchten Fermentationsproben aus der Praxis beziehungsweise ein potentieller Nachweis bewegt sich in einem sehr niedrigem Rahmen, so dass dieser nicht klar positiv ausfällt (siehe Abb. 3.47, Abb. 3.48, Abb. 3.49 und Abb. 3.50). Xufre et al. berichten ebenfalls von diesem Phänomen. Allerdings verwenden Xufre et al. keine zusätzlichen Hilfssonden, wie in der hier vorliegenden Arbeit (siehe Kapitel 3.2.4). Da Xufre et al. lediglich mikroskopisch auswerten, können diese zwar eine sichtbare Fluoreszenz bei der von ihnen entwickelten Sonde nachweisen, die Hefespezies quantitativ im Fermentationsverlauf allerdings nicht. In dieser Arbeit gelang mittels Hilfssonden der Nachweis von *P. anomala* in allen relevanten Wachstumsbereichen in Laborfermentationen mit Reinkulturen (siehe Abb. 3.25). Ein Nachweis sollte somit auch in nativen Fermentationsproben möglich sein.

4.3. Einfluss der Wachstumsphase auf die Hybridisierungseffizienz

Die durchgeführten Versuche (siehe Kapitel 3.3) bestätigen genau wie die Literatur (Amann et al., 1990a; Andorra et al., 2011; van der Vliet et al., 1994), dass die Hybridisierbarkeit der Hefezellen in den unterschiedlichen Wachstumsphasen variabel ist (siehe 3.3). Die höchsten Hybridisierungseffizienzen werden im exponentiellen Wachstumsbereich der Zellkultur erreicht (siehe Abb. 3.22). Dies bestätigt die Annahme, dass Hefezellen DNA bevorzugt in der anfänglichen bis mittleren logarithmischen Wachstumsphase aufnehmen (Hayama et al., 2002; Kawai et al., 2010).

In der lag-Phase und im stationären Wachstumsbereich der Kultur liegen nur wenige Ribosomen vor (Amann et al., 1995), was sich in der niedrigen Hybridisierungseffizienz widerspiegelt. Vor allem gegen Ende der stationären Phase kann es auf Grund der geringen Ribosomenanzahl zu einem schwachen Fluoreszenzsignal kommen, welches als unspezifische Bindung fehlinterpretiert werden könnte (Wallner et al., 1993). Zusätzlich werden ältere ausgereifte Ribosomen bei Nährstoffverknappung von S. cerevisiae durch selektive Autophagie (von Kraft et al. (2008) auch Ribophagie genannt) abgebaut (Kraft et al., 2008). Nährstoffverknappung ist auch in normal verlaufenden Fermentationen gegen Fermentationsende üblich. Auch verhindert gerade zu Beginn der stationären Phase die Zellwand der Hefen eine Zelllyse (Martinez et al., 2004), so dass auch metabolisch inaktive und nicht mehr lebensfähige Zellen bei der Anzahl der hybridisierten Zellen mitgeführt werden. Der Effekt mangelnder Ribosomenanzahl lässt sich durch die Verwendung von Hilfssonden verringern. Die Verwendung von Hilfssonden führt zu einer deutlichen Steigerung der Fluoreszenzintesität und somit auch zu einer besseren Auswertbarkeit in einem breiteren Wachstumsbereich (siehe auch Kapitel 4.2).

Mittels der stets als Permeabilitäts- und Positivkontrolle mitgeführten Euk-Sonden-Probe können Rückschlüsse auf den mit der Wachstumsphase korrelierten Ribosomengehalt und die physiologische Aktivität der jeweiligen Zellen gezogen werden (DeLong et al., 1989; Wallner et al., 1993, 1995). Die Euk-Sonde sollte stets alle Hefezellen in der Probe markieren können. In einer Reinkultur, aber auch in einer reinen Hefezellmischung, liegt der Anteil der mit der Euk-Sonde hybridisierten Zellen im Idealfall nahe des Maximums der markierbaren Zellen. Da die Euk-Sonde an die 18S-rRNA bindet, die spezifischen Sonden aber an die 26SrRNA, kann es zu Unterschieden in der Hybridisierungseffizienz der unspezifischen Euk-Sonde und der spezifischen Sonden kommen. Dies ist beispielsweise in YPD-Medium in der stationären Wachstumsphase der Hefekultur der Fall (siehe Kapitel 3.3). Ein Faktor könnte hier die unterschiedliche Zugänglichkeit der Bindungsregion an der jeweiligen ribosomalen Unterheit sein. Die Bindungsregion der H. uvarum-Sonde liegt in einer Stammregion der 26S-rRNA (siehe Abb. 3.10). Laut des Strukturmodells der 18S-rRNA von S. cerevisiae nach Gutell (1993) bindet die Euk-Sonde entlang einer Haarnadelschleife, was die Hybridisierung erschweren kann. Allerdings bindet auch die Sce-Sonde in einer Haarnadelschleife (siehe Abb. 3.11) und erzielt gute Hybridisierungseffizienzen. Möglicherweise ist die Lage der Sce-Sonde aber eine Erklärung für die stellenweise nötigen hohen Fixierzeiten, welche allerdings nicht konstant auftreten und somit auch auf eine andere Ursache zurückzuführen sein könnten. Die mit der Euk-Sonde erzielten Anteile hybridisierter Zellen sind stets mit Vorsicht zu betrachten, da sie durch die genannten Effekte verringert sein könnten. Zu einer effektiven Nutzung im Praxisbetrieb ist es eventuell sinnvoll, andere, an alle Eukaryonten bindende, Sondensequenzen zu evaluieren, die eine konstantere Hybridisierungseffizienz zeigen. Für die hier vorliegende Arbeit war die vorhandene Euk-Sonde Euk516 (Amann et al., 1990a) ausreichend. Um Effekte durch verringerte Ribosomenanzahl auszuschließen, werden für die Etablierungsversuche nur Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet, sofern nichts anderes erwähnt ist (siehe auch Kapitel 1.4.4 und 2.4.2.1). Effekte deutlich besser hybridisierter Zellen in Traubenmost im Gegensatz zu YPD-Medium (siehe Abb. 3.20) lassen auf einen Effekt der Zusammensetzung des Mostes auf eine bessere metabolische Aktivität der Hefen und somit eine höhere Hybridisierungseffektivität gerade in frühen und späten Wachstumsphasen der Zellen schließen. Dies würde einen

Nachweis von Fermentationsproben aus der Praxis wesentlich erleichtern.

4.4. Fremdsonden / Kreuzreaktivität

In den Versuchen zur Kreuzreaktivität (siehe Kapitel 3.4) der spezifischen Sonden zeigen die Sce- und Pan-Hilfssonden-Kombinationen recht spezifische Ergebnisse ohne auffällige Kreuzreaktionen gegenüber *H. uvarum* und *S. cerevisiae*. Mit der Huv-Hilfssonden-Kombination und der Dbrux-Hilfssonden-Kombination kommt es teilweise zu mehr oder weniger ausgeprägten Kreuzreaktionen gegenüber *S. cerevisiae* und *H. uvarum*. In den Praxisproben zeigen beide Sondenkombinationen keine erkennbaren Kreuzreaktionen.

Die Auswertung der Messergebnisse der Flow-FISH-Analysen erfolgt mittels Overton-Subtraktion (Overton, 1988) (siehe Kapitel 1.5.3). Overton-Substraktion ermöglicht die Berücksichtigung auch gering hybridisierter Zellen, die bei einer Auswertung mittels Setzen eines Markers als Grenzwert als nicht hybridisiert zählen würden. Ein Nachteil der Overton-Substraktion ist, dass es zu scheinbaren Kreuzreaktionen mit spezifischen Sonden anderer Hefearten kommt, wenn man nur die Prozentanzahl hybridisierter Zellen betrachtet. Dies sieht man zum Beispiel bei den Versuchen zur Optimierung der Fixiermethode (Abb. 3.6, Abb. 3.7 in Kapitel 3.1.4) und bei den Versuchen zur Kreuzreaktivität (Kapitel 3.4) bei Einsatz der Huv- beziehungsweise Dbrux-Hilfssonden-Kombination.

Setzt man auf die Auswertung mittels Marker, nimmt man ungenauere Ergebnisse in Kauf, sobald sich die Hefezellen außerhalb der mittleren exponentiellen Wachstumsphase befinden und somit die Fluoreszenzintensität und damit auch der Median sinkt. In diesen Wachstumsbereichen ist keine scharfe Trennung zwischen dem nonEuk-Kontroll-Histogramm und dem der spezifischen Sonde vorhanden. Auch bei unspezifischer Sondenbindung tritt diese Problematik zu Tage. Ein Marker sollte stets in den Grenzbereich zwischen non-Euk-Kontroll-Histogramm und Sonden-Histogramm gesetzt werden. Ist keine scharfe Trennung beider Histogramme vorhanden, spart die Methode des Markersetzens durch die senkrechte Form des Markers einen Teil der auch als gefärbt und somit als hybridisiert anzusehenden Zellen aus, da nicht die komplette Überlappung der beiden Histogramme berücksichtigt werden kann (siehe auch Kapitel 1.5.3). Des Weiteren wird hier das Ergebnis um einiges stärker vom Ribosomengehalt der Probe beein-

flusst, was sich auf den Median der Fluoreszenzintensität auswirkt (siehe auch Kapitel 1.4.4). Außerhalb der exponentiellen Wachstumsphase führt eine Auswertung über Markersetzen somit zu einer Unterschätzung oder Überschätzung der Anzahl der tatsächlich hybridisierten Zellen, je nachdem wo der Marker gesetzt wurde. Durch die dadurch gegebene Subjektivität und Willkürlichkeit dieser Auswertemethode wird diese als ungeeignet für eine Flow-FISH-Analyse bewertet. Eine Auswertung durch Setzen eines Markers ist beispielsweise bei Serpaggi et al. (2010) beschrieben.

Bei Proben in der exponentiellen Wachstumsphase der Hefezellen mit spezifischer Sondenbindung erscheint der Anteil an hybridisierten Zellen mittels Overton-Substraktion niedriger als durch das reine Setzen eines Markers. Dies ist auf etwaige geringe Überschneidungen des nonEuk-Kontroll-Histogramms mit dem der spezifischen Sonde zurückzuführen. Mittels Markersetzen würden diese in der Überschneidung detektierten Zellen den hybridisierten Zellen hinzugerechnet. Mit Hilfe der Overton-Substraktion werden somit deutlich mehr unspezifische Bindungen aus dem Anteil als hybridisiert detektierter Zellen ausgeschlossen. Mittels der Overton-Substraktion kann der komplette Bereich des exponentiellen Wachstums der Hefezellen abgedeckt und objektiv ausgewertet werden. Im Gegensatz zur Auswertung durch Setzen eines Markers ist auch eine Auswertung in stationären Wachstumsphasen möglich. Für praxisnahe Fermentationen stellt eine Möglichkeit der Analyse von Hefezellen in der stationären Wachstumsphase eine zwingende Notwendigkeit dar. Daher wird die Problematik der scheinbaren Kreuzreaktionen (siehe Kapitel 3.4) in Kauf genommen und mittels Overton-Substraktion ausgewertet. Sollten Unklarheiten auftreten, liefert eine Betrachtung des Fluoreszenzmedians der dazugehörigen Fluoreszenzhistogramme zusätzlich Erkenntnisse bezüglich der tatsächlichen Hybridisierung der Zellen.

Bei den Versuchen zur Kreuzreaktivität der Sonden (siehe Kapitel 3.4) sieht man, dass mit deutlichen Kreuzreaktionen der Sondenkombination für *D. bruxellensis* mit anderen Hefen zu rechnen ist (siehe Abb. 3.27 und Abb. 3.28). In dem Fall der für *D. bruxellensis* spezifischen Sondenkombination liegen doppelt soviele fluoreszierende Sonden vor, wie bei den anderen spezifischen Sondenkombinationen. Dies erhöht auch die Möglichkeit des Auftretens von unspezifischen Bindungen um das Doppelte. In den dazugehörigen Fluoreszenzhistogrammen ist ein deutlich niedrigerer Medianwert als bei spezifisch bindenden Sonden zu erkennen (siehe Abb. 3.29 D und Abb. 3.30 D). In den Praxisproben (siehe Abb. 3.49

Diskussion

und Abb. 3.50) sind keine Kreuzreaktionen zu erkennen. Diese sollten, würde die Therorie der doppelten Sondenintensität zutreffen, an Tag 8 der beiden Fermentationen bei Nachweis von *S. cerevisiae* sichtbar sein. Ein Grund für das Ausbleiben von Kreuzreaktionen könnte hier ein Binden der Sonden an Probenbestandteile, beispielsweise an Zellaggregate oder an die Mediummatrix, sein, sofern keine Hefen vorliegen, an welche die Dbrux-Sonde spezifisch binden kann. Zu beachten ist hier auch die Art der Fixierung, welche bei den Praxisproben aus Abb. 3.49 und Abb. 3.50 in 70%-igem Ethanol durchgeführt wurde, im Gegensatz zu der sonst üblichen 30-minütigen Formaldehyd-Fixierung. Diese unklaren Befunde bezüglich Kreuzreaktionen der Dbrux-Hilfssonden-Kombination sollten in weiteren Versuchen unter definierten Bedingungen untersucht werden.

Auch die Huv-Hilfssonden-Kombination zeigt teilweise unspezifische Bindungen an S. cerevisiae (siehe Versuche zur Kreuzreaktivität Abb. 3.28 und Versuche zur Optimierung der Fixiermethode Abb. 3.7 und Abb. 3.8). Es können teilweise sehr hohe Prozentwerte an Hybridisierungseffizienz mit der Huv-Hilfssonden-Kombination detektiert werden, obwohl keine Detektion stattfinden sollte, da die spezifisch bindende Hefeart *H. uvarum* in der Probe nicht vorliegt (siehe Abb. 3.28). Dass es sich nicht um eine spezifische Bindung handelt, ist an Hand der Medianwerte der Fluoreszenz erkennbar (siehe Abb. 3.30). Im Falle dieser scheinbaren Kreuzreaktion liegt der Median der Messwerte nur unwesentlich höher als bei der Negativkontrolle (siehe Abb. 3.30 B). Eine spezifische Bindung an die Hefezellen ist bei Zellen in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase auch an einem deutlich erhöhten Medianwert zu erkennen (siehe beispielsweise Abb. 3.30 A oder C). In anderen metabolisch nicht stark aktiven Wachstumsphasen kann durch den dort verringerten Anteil an ribosomaler RNA und somit Mangel an Bindungsmöglichkeiten für die Sonden auch der Fluoreszenzmedian niedriger liegen. Dies gestaltet eine Beurteilung der Spezifität der Sondenbindung etwas schwieriger und könnte zu Problemen bei der Beurteilung von Praxisproben führen.

Betrachtet man alle Versuche, bei denen scheinbare Kreuzreaktionen von *S. cerevisiae* mit der Huv-Hilfssonden-Kombination in der Darstellung hybridisierter Zellen im Diagramm auffallen (siehe Versuche zur Optimierung der Fixiermethode in Abb. 3.7 und Versuche zur Kreuzreaktivität in Abb. 3.28) und vergleicht diese mit Versuchen, bei denen keine Kreuzreaktionen zu erkennen sind (siehe Mischungsversuche in Abb. 3.33 und den Praxisproben aus Kapitel 3.8), kommen

verschiedene Erklärungen für das Auftreten von scheinbaren Kreuzreaktionen in Frage.

Zur Beurteilung der Kreuzreaktionen sollte zuerst eine Bewertung der jeweiligen Fluoreszenzhistogramme erfolgen. Bei den Versuchen zur Optimierung der Fixiermethode mit S. cerevisiae (siehe Abb. 3.7) zeigt sich lediglich eine geringe Kreuzreaktion von S. cerevisiae mit der Huv-Hilfssonden-Kombination. Dies spiegelt sich auch in den dazugehörigen Fluoreszenzhistogrammen wider (siehe Abb. 3.8 B, E und H). Die Histogramme der mit der für S. cerevisiae unspezifischen Huv-Hilfssonden-Kombination hybridisierten S. cerevisiae-Zellen zeigen jeweils nur einen geringen Unterschied zu den Histogrammen der dazugehörigen nonEuk-Kontrolle (Abb. 3.8 B, E und H). Hierbei handelt es sich um einen Fall, in dem mit einer Markerauswertung bessere Ergebnisse erzielt werden würden, da diese Zellen mit ähnlichen Fluoreszenzintensitäten wie die der Negativkontrolle ausschließt (siehe auch Kapitel 1.5.3). Dabei würde es allerdings zu einer Unterschätzung des Anteils der tatsächlich hybridisierten Zellen kommen, wie weiter oben in diesem Abschnitt beschrieben wird. Die zu den in Abb. 3.7 gehörenden dargestellten Histogramme sind mit denen der Praxisproben vergleichbar. In den Praxisproben (siehe Kapitel 3.8) treten jedoch keine erkennbaren Kreuzreaktionen auf. Dies erkennt man deutlich an den Tagen, an denen S. cerevisiae-Zellen detektiert wurden und der Anteil an detektierten H. uvarum-Zellen nahe Null lag. Würde S. cerevisiae von der Huv-Hilfssonden-Kombination gebunden werden, würde der Anteil an scheinbar detektierten H. uvarum-Zellen hier deutlich höher ausfallen. Auch bei den Praxisproben unterscheiden sich die Fluoreszenzhistogramme der Huv-Hilfssonden-Kombination an den Tagen, an denen kaum beziehungsweise kein H. uvarum-Anteil detektiert wurde, kaum von den Fluoreszenzhistogrammen der nonEuk-Kontrolle. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei den in Abb. 3.7 zu erkennenden scheinbaren Kreuzreaktionen der Huv-Hilfssonden-Kombination mit S. cerevisiae um ein Artefakt aus Kombination der Overton-Auswertung und eventuellen Fehlern in der Versuchsdurchführung, die zu einer etwas geringeren nonEuk-Kontrollen-Fluoreszenz beziehungsweise einer etwas stärkeren Huv-Hilfssonden-Kombinations-Fluoreszenz führten, handelt. Auf die Möglichkeit einer verunreinigten beziehungsweise geschädigten Huv-Sonde wird im Folgenden noch genauer eingegangen. Ein geringfügig erhöhtes Signal, wie es bei den Versuchen mit sehr geringen Kreuzreaktionen festgestellt wurde (siehe beispielsweise Abb. 3.7 und Kapitel 3.8), und damit

Diskussion

ein geringfügig erhöhter Medianwert, kommt möglicherweise auch durch die Unterschiede in der Basenstruktur der nonEuk-Sonde und der jeweiligen spezifischen Sonde zu Stande. Diese führen zu einer anderen unspezifischen Anbindung an die Zellstruktur, so dass es sich eigentlich um ein Negativsignal handelt. Dieser Wert sollte sich allerdings im unteren einstelligen Prozentbereich bewegen. Gut ist dies beispielsweise an der Bindung von *H. uvarum-*Zellen an der Pan-Hilfssonden-Kombination und an der Sce-Hilfssonden-Kombination zu erkennen (siehe Abb. 3.27 und Abb. 3.29). Dieser Effekt ist so gering, dass er außer Acht gelassen werden kann. Auch bei der Huv-Hilfssonden-Kombination könnte es zu Wechselwirkungen mit der Mostmatrix kommen. Würde diese alle Sonden abfangen, für die keine spezifischen Bindungspartner vorliegen, würde dies das Nichtvorhandensein der Kreuzreaktionen bei den Praxisproben erklären. Zur Verifizierung sollten auch hier weitere Versuche unter definierten Bedingungen durchgeführt werden.

Bei den Versuchen zur Kreuzreaktivität aus Abb. 3.28 ist, im Gegensatz zu den beiden eben beschriebenen Fällen (Abb. 3.7 und Kapitel 3.8), eine leichte Schulter bei der Huv-Hilfssondenkombinations-Fluoreszenz mit S. cerevisiae-Zellen im Fluoreszenzhistogramm erkennbar (siehe Abb. 3.30 B). Mittels Overton-Substraktion werden hier sehr hohe Anteile an hybridisierten Zellen errechnet. Mittels Markerauswertung stellt sich die Situation etwas unsicherer dar. Es ist sowohl möglich, während der Auswertung des Versuches einen Marker in die Lücke zwischen spezifisch hybridisierter Probe und Negativkontrolle zu setzen als auch den Marker direkt an das Ende des nonEuk-Fluoreszenzhistogrammpeaks zu platzieren. Im erstem Fall würde der Anteil an hybridisierten Zellen, welche als Kreuzreaktion bewertet werden würden, im Vergleich zur Auswertung mittels Overton-Substraktion sogar zunehmen. Im zweiten Fall nähme der Anteil mutmasslicher Kreuzreaktionen ab. Allerdings würden so auch die Anteile spezifisch hybridisierter Zellen abnehmen und diese dann deutlich niedriger als mittels Overton-Substraktion liegen. Auf die ausführliche Problematik der Auswertung mittels Marker setzen wurde bereits weiter oben eingegangen. Vermutlich können die in dem Versuch zur Kreuzreaktivität (Kapitel 3.4) auftretenden leichten Fluoreszenzintensitätserhöhungen auf Probleme bei der Versuchsdurchführung, zum Beispiel eine verunreinigte oder zu alte Huv-Sondencharge zurückgeführt werden. Für diesen Versuch wurde nachgewiesenermassen eine andere Huv-Sondencharge als für die Praxisproben (Kapitel 3.8) verwendet. Diese würde das Fehlen von Kreuzreaktionen bei den Praxisproben erklären. Ob auch für die Versuche zur Optimierung der Fixiermethoden zu Abb. 3.7 schon die neue Huv-Sondencharge verwendet wurde, lässt sich nicht mehr nachvollziehen, die Möglichkeit ist aber gegeben. Dies würde ein Auftreten der Kreuzreaktionen der Huv-Hilfssonden-Kombination mit *S. cerevisiae* in Abb. 3.28 erklären. Zur Verifizierung der Problematik sollten die Versuche zur Kreuzreaktivität mit neu angebrochenen Sonden wiederholt werden.

Eventuell kann man die beschriebene Problematik durch jeweils an die spezifische Sonde angepasste Negativsonden umgehen, wie Manz et al. (1992) vorschlagen. Ebenso könnten geringe Mismatches der Sonden, welche zu falschpositiven Bindungen führen könnten, durch in silico Sondendesign ausgeschlossen werden (Yilmaz et al., 2011). Unterscheiden sich die Sonden in nur wenigen Basenpaaren, da die Zielregion stark konserviert und somit nahezu identisch ist, besteht auch die Möglichkeit, konkurrierende Sonden einzusetzen (Wallner et al., 1995). Hierbei wird die ähnliche unmarkierte Sonde gemeinsam mit der markierten Zielsonde hybridisiert. Wallner et al. (1995) gelang es so, unspezifische Signale deutlich zu verringern. Gleichzeitig hatten Wallner et al. ohne den Einsatz der Konkurrenzsonden auch ein Problem mit falsch-positiven Werten. Laut Hugenholtz et al. (2002) kann es in einigen Arten von Habitatproben zu signifikanten Problemen mit unspezifischer Probenbindung kommen. Auch Branco et al. (2019) berichten von Kreuzreaktionen der von ihnen verwendeten D.brux.5.1-Sonde (Roeder et al., 2007) mit Nichtzielzellen. Sie umgehen dieses Problem durch Zugabe von 25 % Formamid im Hybridisierungspuffer (siehe auch Kapitel 4.5). Außerdem ist bei dieser Formamidkonzentration die NaCl-Konzentration im Waschpuffer verringert und zusätzlich 5 mM EDTA enthalten. Beides könnte zusätzlich zu Formamid einen Effekt auf das Auftreten von Kreuzreaktionen haben. Allerdings sinkt durch Formamidzugabe auch die Hybridisierungseffizienz vor allem bei D. bruxellensis mit der Euk-Sonde deutlich (Branco et al., 2019). Formamid wird üblicherweise bei DNA-FISH-Analysen verwendet, da es die Schmelztemperatur der DNA senkt und somit eine Trennung der Doppelstränge erleichtert. Bei RNA-FISH-Analysen ist es möglich, dass Formamid hilft, die Sekundärstruktur der rRNA zu trennen und somit genau wie die in dieser Arbeit entwickelten Hilfssonden, die Bindungsfähigkeit der spezifischen Sonden erhöht (Pernthaler et al., 2001). Eine Vergleichbarkeit der hier vorgestellten Versuche und der Versuche von Branco et al. (2019) ist nur begrenzt möglich, da auch einige andere Versuchsparameter deutlich anders sind. Beispielsweise ist die SDS-Konzentration im Hybridisierungspuffer um ein Zehnfaches höher, die Sondenkonzentration ist deutlich niedriger, bei ihren Versuchen ohne Formamidzugabe verwenden Branco et al. den Hybridisierungspuffer mit SDS als Waschpuffer, die Zellfixierung erfolgt in reinem Ethanol und die Sonden sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff im roten Spektrumsbereich markiert. Des Weiteren scheinen die Fluoreszenzmedianwerte von Branco et al. (2019) bei positiven Proben eher gering zu sein, was auch an der geringen Anzahl der fluoreszenten Zellen auffällt, so dass sie mit Overton-Substraktion als nicht bindend gewertet werden könnten. In weiterer vorliegender Literatur zum Nachweis von Hefespezies mittels Flow-FISH wird die Problematik von unspezifischen Reaktionen oder Reaktionen mit Fremdsonden umgangen beziehungsweise nicht erwähnt.

4.5. Mindestzellzahl für einen erfolgreichen FISH-Assay

Wie die in Kapitel 3.5.1 dargestellten Ergebnisse zeigen, funktioniert der FISH-Assay auch dann, wenn die fixierte Probe nicht genug Hefezellen liefern kann. Schon bei einer Mindestzellzahl von circa 20.000 *H. uvarum*-Zellen in der Messprobe funktioniert er zuverlässig. *S. cerevisiae* kann bis zu einer Zellzahl von 50.000 Zellen in der Probe verlässlich nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.5.2). Mit abnehmender Zellanzahl ist auch eine abnehmende Tendenz der Hybridisierungseffizienz zu erkennen.

Für die Ursprungsfermentation bedeuten diese Ergebnisse, dass eine geringe Zellanzahl keinen Hinderungsgrund für eine erfolgreiche Hybridisierung darstellt (siehe Kapitel 3.6, Abb. 3.36). Mit der hier entwickelten Methode kann man bis zu 10^3 Zellen/ml in der Ursprungsfermentation nachweisen, wenn man die im Methodenteil vorgeschlagenen 32 ml Probe entnimmt. Konzentriert man die Probe auf, ist auch der Nachweis von weniger Zellen/ml in der Ursprungsfermentation möglich, solange der Trub nicht anfängt, die flusszytometrische Analyse zu stören. Mit dem Nachweis von 10^3 Zellen/ml in der Ursprungsfermentation bewegt sich die hier entwickelte Methode in einem Bereich, den auch andere Flow-FISH-Methoden in der Literatur erzielen (Branco et al., 2019; Serpaggi et al., 2010). Des Weiteren handelt es sich hierbei um den Nachweisbereich, den auch

eine PCR-DGGE erreichen kann (siehe 1.3.3.1). Mittels gPCR können Werte von 100 koloniebildenden Einheiten/ml erzielt werden (siehe 1.3.3.2 und OIV, 2011). Laut Blaettel (2012) kommt man mit qPCR bei Werten von 10³ Zellen/ml an das untere Detektionslimit. Auch wenn die Literaturangaben zur Sensivität der qPCR sich somit widersprüchlich darstellen, bewegen sie sich in einer ähnlichen Größenordnung wie die in dieser Arbeit für Flow-FISH ermittelte Sensitivität. Durch Aufkonzentrieren von Proben mit wenig Trub könnte auch die hier entwickelte Flow-FISH-Methode eventuell eine Sensitivitätssteigerung erfahren. Branco et al. (2020) vermelden, eine neue DNA-FISH-Sonde entwickelt zu haben, welche auch bei niedrigen Zellkonzentrationen eine Detektion von D. bruxellensis ermöglicht. Allerdings verwenden Branco et al. Formamid im Hybridisierungspuffer mit einer Konzentration von mindestens 5% und eine höhere SDS-Konzentration als in dieser Arbeit von 0,1 % SDS [v/v] (Branco et al., 2019). Mit der in dieser Arbeit vorgestellten Methode ist es möglich, nur geringfügig höhere Zellzahlen als Branco et al. (2020) postulieren, nachzuweisen. Eventuell ist auch bei der hier entwickelten Versuchskonstellation eine Erhöhung der SDS-Konzentration im Hybridisierungspuffer möglich (siehe Kapitel 3.1.3). Es gilt zu beachten, dass 10³ Zellen/ml auch für Most eine geringe Zellzahl ist. In der Literatur werden Gesamtkeimzahlen auf Trauben von 10² bis 10⁶ KBE/g beschrieben (Prakitchaiwattana et al., 2004). Diese dürften durch Vermehrung zügig ein detektierbares Konzentrationsniveau erreichen. Brettanomyces führt ab einer Zellzahl von 10³ Zellen/ml in Wein zu sensorischen Auffälligkeiten (Chatonnet et al., 1995) (siehe Kapitel 1.2.3.2). Auch hier sollte die in dieser Arbeit weiter entwickelte Flow-FISH-Methode Hilfestellung bieten können, um eine Schädigung des Weines zu vermeiden.

4.6. FISH in Mischungen / Wiederfindung

In Mischungen aus *S. cerevisiae* und *H. uvarum* zeigt sich bei Assay-üblicher und auch bei verringerter Zellzahl ein linearer Verlauf zwischen dem Anteil gemessener und vorhandener *H. uvarum*-Zellen (siehe Kapitel 3.6). Mit abnehmender Konzentration von *H. uvarum* werden stets etwas mehr Zellen als hybridisiert angezeigt als tatsächlich vorhanden sind (siehe Abb. 3.33 und Abb. 3.34). Auch wenn nur 20.000 Zellen insgesamt je analysierter Probe vorhanden sind, ist ein

linearer Nachweis von *H. uvarum* bis zu 10 % *H. uvarum*-Zellen im Ansatz möglich (siehe Abb. 3.36 und Abb. 3.37). Dies entspricht 2.000 Zellen je analysierter Probe. Damit nähert man sich einem Bereich, der auch in praxisbezogenen inokulierten Fermentationen und auch in Spontanfermentationen vorkommen kann. Eine Übertragbarkeit auf praxisbezogene Proben ist somit gegeben. Auch wenn weitere Hefespezies, beispielsweise *P. anomala*, in der Probe vorhanden sind, können die enthaltenen Anteile an Hefen durch den flusszytometrischen Nachweis bestätigt werden.

Bei den Versuchen zu Abb. 3.35 erkennt man die Wichtigkeit einer zuverlässigen Negativkontrolle. Scheinbar treten bei diesem Versuch keine Kreuzreaktionen von *S. cerevisiae* mit der Huv-Hilfssonden-Kombination auf (siehe Abb. 3.33). Betrachtet man die dazugehörigen Fluoreszenzhistogramme, stellt sich die Situation etwas komplexer dar (siehe Abb. 3.35). Man erkennt deutlich den mit abnehmender H. uvarum-Konzentration abnehmenden Peak an hybridisierten Zellen im höheren Fluoreszenzintensitätsbereich. Die non-Euk-Kontrolle weist in allen Mischungsverhältnissen eine deutliche Schulter auf, welche im Vergleich zu anderen Versuchen (siehe zum Beispiel Abb. 3.29 und Abb. 3.30) stark ausgeprägt ist. Auch diese nimmt mit zunehmendem Anteil an S. cerevisiae in der Probe zu. Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein Artefakt aus einem Fehler in der Versuchsdurchführung. In weiteren Versuchen mit geringerer Zellzahl (siehe Kapitel 3.36) konnte ein solches Phänomen nicht beobachtet werden. Dort war die non-Euk-Kontrollen-Fluoreszenz durchweg unauffällig und entsprach dem schmalen Peak in anderen Versuchen (Fluoreszenzhistogramme nicht dargestellt). Solange ein Peak der Fluoreszenzintensität im höheren Medianbereich erkennbar ist, sollte das Aussehen der non-Euk-Kontrolle für die Auswertung wenig relevant sein. Auch sieht der Peak der Negativkontrolle dem der Probe im niedrigeren Fluoreszenzbereich sehr ähnlich. Es lässt sich nicht sicher ausschlie-Ben, dass die S. cerevisiae-Kultur mit einer anderen Spezies verunreinigt war, die eine Reaktion mit der non-Euk-Sonde und der Huv-Hilfssonden-Kombination zeigt. Im Verlauf dieser Arbeit konnte auch festgestellt werden, dass schlechte non-Euk-Kontroll-Fluoreszenzhistogramme mit der Charge der verwendeten non-Euk-Sonde zusammenhängen könnten. Auch eine Versuchswiederholung brachte ähnliche Ergebnisse. Im Zusammenhang mit dem Mischungsversuch mit einer Zellzahl von 20.000 Zellen pro Ansatzgefäss, trat dieses Phänomen nicht auf.

4.7. FISH mit verschiedenen Hefestämmen

Wie die Versuche in Kapitel 3.7 zeigen, können auch andere H. uvarum-Stämme als der zur Etablierung verwendete DSM-Stamm 26650 mittels Flow-FISH und der spezifischen Huv-Sondenkombination nachgewiesen werden (Abb. 3.39). Auch bei S. cerevisiae ist mit der verwendeten spezifischen Sce-Sondenkombination ein Nachweis diverser Stämme möglich (Abb. 3.40). Bei manchen Stämmen scheinen die spezifischen Sonden nicht ganz so gut zu binden, wie bei anderen. Gerade bei H. uvarum ist dies auffällig (siehe Abb. 3.39). Möglicherweise ist dies darauf zurück zu führen, dass die spezifischen Sonden auf die Sequenz von Stammsammlungsstämmen designt wurden. Im Fall H. uvarum bei Xufre et al. (2006) handelte es sich um einen Stammsammlungsstamm (PYCC 4193) und diverse Wildisolate. Die in dieser Arbeit entwickelten Hilfsonden sind an den H. uvarum-DSM-Stamm (DSM 26650) angepasst. Eventuell liegen gerade in den Sondenbindungsregionen der Hefestämme stammspezifische Unterschiede vor, die die Bindungseffektivität der Sonden beeinflussen. Da es sich bei der Sondenbindungsregion um einen konservierten Bereich der RNA handelt, ist dies jedoch nicht sehr wahrscheinlich. Eine größere Rolle spielt vermutlich die Aktualität und Genauigkeit der Datenbank, auf welcher das Design der Sondensequenzen basiert. Auch laut Amann et al. (2001) trägt diese maßgeblich zur Effektivität der Sondenbindung bei. Des Weiteren gibt es zwischen verschiedenen Hefestämmen derselben Spezies Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung, zum Beispiel beim Anteil an rRNA und DNA, was zu unterschiedlichen Hybridisierungseffizienzen führen kann (Mikkola u. Kurland, 1992; Wallner et al., 1995).

Wo man bei *S. cerevisiae*-Stämmen keine signifikante und bei den verschiedenen Stämmen von *H. uvarum* eine geringe Stammabhängigkeit der Hybridisierungseffektivität sieht, scheint diese bei *D. bruxellensis* dominanter zu sein. Die Nachweisbarkeit von *D. bruxellensis* ist stamm- und zellformabhängig (siehe auch Kapitel 1.2.3.2). Beispielsweise liegen die Zellen des *D. bruxellensis*-Stamm DSM 70001 vorrangig als Pseudomycelium vor und sind somit flusszytometrisch nicht auszuwerten. Ein weiterer *D. bruxellensis*-Stamm AWRI 1499, welcher hauptsächlich Einzelzellen in Kultur zeigt, eignet sich hingegen sehr gut zum flusszytometrischen Nachweis und dient in dieser Arbeit als Etablierungsstamm (siehe 3.2.4). Auch Branco et al. (2019) zeigen eine um mehr als die Hälfte verringerte Hybridisierbarkeit zwischen zwei *D. bruxellensis*-Stämmen aus Stammsammlun-

gen, deren Hintergründe unbekannt sind. Eine Bedingung für eine einwandfreie flusszytometrische Nachweisbarkeit ist stets das Vorliegen der Probe in Einzelzellen. Es wird als notwendig erachtet zur weiteren Evaluierung der hier vorgestellten Sonden-Hilfssondenkombination noch weitere, auch wild vorkommende, *D. bruxellensis*-Stämme zu untersuchen.

Es ist dringend zu empfehlen bei unbekannten Mischungen vor der Durchführung einer FISH, die Autofluoreszenz der zu analysierenden Probe zu untersuchen (Moter u. Goebel, 2000). Je nach enthaltener Hefe- beziehungsweise Bakterienarten können diese eine störende Autofluoreszenz aufweisen (Moter u. Goebel, 2000). Branco et al. (2019) untersuchten zwölf in Weinfermentationen häufig vorkommende Hefespezies auf Autofluoreszenz und konnten diese lediglich für *Z. bailii* mit Cy3- und FITC-Filtern belegen. Des Weiteren ist eine Autofluoreszenz im grünen Wellenlängenbereich durch das Medium belegt (Branco et al., 2019). Vor allem roter Wein beziehungsweise Most aus roten Trauben zeigt deutliche Autofluoreszenz (Branco et al., 2019). Auch im Bezug auf eventuelle Autofluoreszenz der Proben zeigt sich so die Erfordernis einer ständig mit zu untersuchenden Negativkontrolle, mit der diese Effekte eliminiert werden können.

4.8. Praxisproben

Wie die Praxisversuche in Kapitel 3.8 zeigen, ist generell ein Nachweis der untersuchten Hefespezies auch während einer Fermentation möglich. Die Ergebnisse entsprechen dem aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstand wie die Hefeverteilung während einer Fermentation verläuft (Fleet et al., 1984; Ganga u. Martinez, 2004; Schuetz u. Gafner, 1993a). Das heißt, mit dem Anstieg des Alkoholgehaltes und somit dem Beginn der Fermentation, steigt auch der Anteil an *S. cerevisiae-Zellen. H. uvarum* kommt in Most und zu Fermentationsstart in großen Anteilen vor. Mit weiterer Zunahme an *S. cerevisiae-Zellen* und steigender Alkoholkonzentration stellt *H. uvarum* seine Fermentationstätigkeit ein und vermehrt sich nicht mehr so stark (siehe Kapitel 1.1.1.1 und 1.2.3.1). Dieser Effekt konnte sowohl bei Spontanfermentationen (Abb. 3.41, 3.42, 3.43, 3.44 und 3.45) als auch bei Inokulierungen mit Reinzuchthefen (Abb. 3.47 und 3.48) beobachtet werden. Es kann nach wie vor nicht ausgeschlossen werden, dass trotz niedriger Anteile an hybridisierten *H. uvarum-*Zellen, diese nach wie vor in geringen Anteilen in der

Fermentation vorhanden sind und es bei Unterschwefelung des Weines in der Flasche zu erneuter Vermehrung kommen kann (Dittrich u. Grossmann, 2010). Die Fixierungen mit Formaldehyd (Abb. 3.41, 3.42, 3.43, 3.44, 3.45, 3.47 und 3.48) liefern deutlich bessere Ergebnisse als die Fixierungen mit 70%-igem Ethanol (Abb. 3.49 und 3.50). Man erkennt deutlich, dass die schnellere und einfachere Ethanolfixierung zu Lasten der Zellanzahl und Probenqualität geht. Etwaige Verklumpungen erschweren das Auswerten und das Erzielen eines reelen Ergebnisses (siehe auch Kapitel 4.1.3). Eine Formaldehydfixierung ist darum auch bei nativen Fermentationen der Ethanolfixierung vorzuziehen.

Im Fall von Abb. 3.45 und Abb. 3.50 handelt es sich um verzögerte Fermentationen. Gründe hierfür sind spekulativ. Abb. 3.45 zeigt einen Alkoholanstieg, bevor ein Anstieg der S. cerevisiae-Zellen erkennbar ist. Auch die Euk-Sonde verzeichnet zu diesem Zeitpunkt noch keinen Anstieg, was eine andere, nicht durch die hier genutzten Sonden detektierte, Hefespezies nahezu ausschließt. Auf Grund der geringen Zellzahl zu diesem Zeitpunkt können hier aber auch Messfehler nicht ausgeschlossen werden. Die Fermentation in Abb. 3.50 zeigt gegen Ende der Probennahme einen deutlichen Anstieg der D. bruxellensis-Zellen und der Euk-Sonde. Eine Kontamination mit D. bruxellensis ist hier wahrscheinlich. Die Fermentationen aus Geisenheim konnten lediglich circa 14 Tage verfolgt werden, so dass dieser Wert nicht verifiziert werden kann. Generell ist die Bindungseffektivität der D. bruxellensis-Sonden-Hilfssondenkombination und der P. anomala-Hilfssondenkombination bei den hier untersuchten nativen Proben mit Vorsicht zu betrachten, da nur eine Fixierung über 30 min mit Formaldehyd beziehungsweise eine Ethanolfixierung stattfand. Die aus dieser Arbeit vorliegenden Etablierungsversuche beschreiben den Nachweis von D. bruxellensis oder P. anomala nach einer 24 h Formaldehydfixierung (siehe Kapitel 3.2.4). Bei 30 min dauernder Formaldehydfixierung konnte anfangs auch mit Hilfssonden keine ausreichenden Hybridisierungseffizienzen erzielt werden. In weiteren, in dieser Arbeit nicht dargestellten, Versuchen konnten mit den Hilfssonden auch nach 30 min Fixierungzeit in Formaldehyd zufriedenstellende Hybridisierungseffizienzen erreicht werden. Mit Ethanolfixierung und den Hefen D. bruxellensis und P. anomala wurde keine vorhergehende Etablierung durchgeführt.

Die Methode der Fluoreszenz in situ Hybridisierung mittels Flusszytometrie ist, wie an Hand der Praxisproben gezeigt werden konnte, auch in der Praxis anwendbar (siehe Kapitel 3.8). Ein Nachweis der gärenden Hefepopulation ist so-

wohl in spontanen, sowie in mit kommerziellen Hefestarterkulturen inokulierten Fermentationen möglich.

Die Fixierung mittels Formaldehyd wird auch für Praxisproben als die effektivere Fixierungsmethode betrachtet (siehe Kapitel 3.1.4 und 3.8). Ist ein Probentransport über einen längeren Zeitraum notwendig, bietet es sich dennoch an, eine Ethanolfixierung am Ort der Probenentnahme durchzuführen.

5. Schlussbetrachtung und Ausblick

Mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode ist es möglich, drei Schadhefen (Hanseniaspora uvarum, Dekkera bruxellensis, Pichia anomala) und die Hauptgärhefe Saccharomyces cerevisiae zum Zeitpunkt ihrer fermentativen Aktivität, und somit bei Beteiligung an der Fermentation, nachzuweisen. Auch ein Nachweis geringer Zellzahlen bis in einen Bereich von 10³ Zellen/ml ist möglich, so dass auch beginnende Kontaminationen mit Schadhefen nachgewiesen werden können. So kann ein Eingriff in den Fermentationsprozess rechtzeitig vor einer Schädigung des Endproduktes erfolgen. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Methode nach wie vor abhängig von der Wachstumsphase der Hefezellen ist, kann der flusszytometrische FISH-Assay als etabliert betrachtet werden. Mit der vorgestellten angepassten Methode unter Verwendung der Hilfssonden (siehe Kapitel 3.2) und der zur Auswertung verwendeten Overton-Substraktion (Overton, 1988) (siehe Kapitel 1.5.3) ist es möglich, eine gute quantitative und qualitative Auswertung bis in die stationäre Wachstumsphase hinein zu liefern. Die hier untersuchten rRNA-Sonden (Roeder et al., 2007; Xufre et al., 2006) zeigen eine hohe Spezifität, um die entsprechenden Hefespezies nachzuweisen. Gleichzeitig konnten aber auch die Grenzen der universellen Euk516-Sonde (Amann et al., 1990a) aufgezeigt werden (siehe Kapitel 4.3). Im Laufe dieser Arbeit konnte die Zeitdauer der Formaldehydfixierung deutlich gesenkt werden und eine gesundheitlich unbedenklichere und ohne großes Laborequipment durchzuführende Fixiermethode mit Ethanol etabliert werden. Auch die Übertragbarkeit des Flow-FISH-Assays aus Laborkultivierungsbedingungen auf reale Praxisfermentationen konnte erzielt werden. Eine Nutzung des Flow-FISH-Assays zum Nachweis von verschiedenen Hefespezies auch in nativen Fermentationen ist während nahezu der kompletten Fermentationsphase von Most zum Endprodukt Wein möglich.

Da in dieser Arbeit nur die Nachweisbarkeit von Hefen mittels Flow-FISH in weißem Traubenmost und Weißweinfermentationen untersucht wurde, wäre es interessant, auch die Nachweisbarkeit in rotem Traubenmost beziehungsweise in Rotweinfermentationen zu untersuchen. Rotwein weist eine starke Autofluoreszenz auf (Branco et al., 2019). Möglicherweise wären für eine erfolgreiche Übertragung andere Fluoreszenzfarbstoffe notwendig. Roeder et al. (2007) und Roeder (2007) weisen *Dekkera*-Spezies in Rotwein nach, allerdings nur subjektiv mittels Fluoreszenzmikroskopie. Branco et al. (2019) weisen auch *D. bruxellensis* mittels Flusszytometrie in Rotwein nach. Sie verwenden einen anderen rot-emittierenden Fluoreszenzfarbstoff.

Zur Optimierung der Methode sollte die Ursache für die Notwendigkeit einer Verlängerung der Formaldehydfixierzeiten bei einigen Spezies evaluiert werden. Es ist nicht auszuschließen, dass hier Fehler in der Versuchdurchführung oder Verunreinigungen der Hefekulturen vorlagen. Auch zur Ursache der potentiellen Kreuzreaktionen sollten weitere Versuche zur Haltbarkeit der spezifischen Sonden durchgeführt werden.

Es existieren verschiedene Ansätze in der Literatur, die Methode des flusszytometrischen Nachweises von Hefespezies in Wein weiter zu optimieren.

Fuchs et al. (2000b) kombinieren die flusszytometrische Analyse der Hefespezies mit anschließendem Zellen sortieren mittels FACS. Mit einer darauffolgenden weiteren FISH der sortierten Zellen und einer DGGE (siehe Kapitel 1.3.3.1) kann rasch die taxonomische Zusammensetzung von in diesem Fall marinem Phytoplankton ermittelt werden. Mit diesem Ansatz könnte beispielsweise die Entwicklung der Zusammensetzung der Hefespezies während der Fermentation genaustens analysiert werden. Auch könnte man so mögliche weitere Kandidaten für weitere noch zu entwickelnde spezifische Sonden finden. Dafür wäre allerdings ein Flusszytometer mit Sortiereinheit (FACS) notwendig.

Blasco et al. (2003) und Pfannebecker (2008) haben passende 16S-rRNA-Sonden für verschiedene in Wein vorkommende Bakterienspezies entwickelt und mittels FISH fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Eine Übertragbarkeit auf flusszytometrische Detektion von Bakterien eröffnet weitere Möglichkeiten zur Nutzung dieser Methodik. Könnte man Milchsäurebakterien wie beispielsweise *Oenococcus oeni* nachweisen, ließe sich unbeabsichtigter Biologischer Säureabbau (BSA) während der Fermentation verhindern beziehungsweise erwünschter BSA besser kontrollieren.

Um die Effizienz der Flow-FISH-Methode zu erhöhen, könnte man beispielsweise unterschiedlich markierte Sonden parallel in einer Analyseprobe verwenden. So könnten mehrere Spezies in einer Probe gleichzeitig nachgewiesen werden, was die Analysedauer deutlich senken würde. Es gibt unter anderem Studien dazu, die mehrere Bakterienspezies gleichzeitig in einer marinen Schlammprobe nachweisen (Amann, 1995; Amann et al., 1995, 1996; Wagner et al., 1993). Hierfür sind allerdings unterschiedliche Fluoreszenzmarkierungen für die flusszytometrische Detektion notwendig. Dafür müssen vorhergehende Untersuchungen zur Effektivität der Sonden mit unterschiedlichen Fluorophoren und eventuellen Wechelwirkungen derselben durchgeführt werden. Aus der Literatur liegen FISH-Studien mit Einfachverwendung von unterschiedlichen Fluorochromen vor (siehe Kapitel 1.4.3).

Ein weiterer interessanter Ansatz ist die Kombination von Lebend-Tot-Färbung mit Flow-FISH, wie sie Branco et al. (2012) beim Nachweis von *S. cerevisiae* und *Hanseniaspora guilliermondii* vorstellen. Diese Kombination bietet die Möglichkeit, die Lebensfähigkeit der untersuchten Hefespezies zu beurteilen. So kann die Gefährlichkeit einer Kontamination und die Notwendigkeit eines Eingriffes in die Fermentation beurteilt werden. Die alleinige Durchführung einer flusszytometrischen Lebendtotfärbung aus unfixiertem Probenmaterial ist etabliert (Hutter, 1992; Sommer, 2020; eigene Versuche).

Der in dieser Arbeit weiter optimierte Flow-FISH-Assay bietet eine vielversprechende Möglichkeit, schnell und effizient verschiedene Hefespezies auch während der Fermentation quantitativ und qualitativ nachzuweisen.

Literaturverzeichnis

- [Adt et al. 2010] ADT, Isabelle; KOHLER, Achim; GOGNIES, Sabine; BUDIN, Julien; SANDT, Christophe; BELARBI, Abdelkader; MANFAIT, Michel; SOCKALINGUM, Ganesh D.: FTIR spectroscopic discrimination of Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces bayanus strains. *Canadian Journal of Microbiology* 56 (2010), Nr. 9, S. 793–801
- [Agenbach 1977] AGENBACH, W. A.: A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity. *Proceedings of South African Society for Enology and Viticulture* (1977), S. 66–87
- [Aguilera et al. 2006] AGUILERA, F.; PEINADO, R. A.; MILLAN, C.; ORTEGA, J. M.; MAURICIO, J. C.: Relationship between ethanol tolerance, H+-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology* 110 (2006), Nr. 1, S. 34–42
- [Alexandre u. Charpentier 1998] ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C.: Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20 (1998), Nr. 1, S. 20–27
- [Amann et al. 1996] AMANN, R.; SNAIDR, J.; WAGNER, M.; LUDWIG, W.; SCHLEI-FER, K. H.: In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *Journal of Bacteriology* 178 (1996), Nr. 12, S. 3496–500
- [Amann 1995] AMANN, R. I.: Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. *Molecular Ecology* 4 (1995), Nr. 5, S. 543–554
- [Amann et al. 1990a] AMANN, R. I.; BINDER, B. ..; OLSON, R. J.; CHISHOLM, S. W.; DEVEREUX, R.; STAHL, D. A.: Combination of 16S rRNA-targeted oli-

- gonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (1990), Nr. 6, S. 1919–1925
- [Amann et al. 1990b] AMANN, R. I.; KRUMHOLZ, L.; STAHL, D. A.: Fluorescentoligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* 172 (1990), Nr. 2, S. 762–770
- [Amann et al. 1995] AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H.: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59 (1995), Nr. 1, S. 143–69
- [Amann u. Fuchs 2008] AMANN, Rudolf; FUCHS, Bernhard M.: Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat Rev Micro* 6 (2008), Nr. 5, S. 339–348
- [Amann et al. 2001] AMANN, Rudolf; FUCHS, Bernhard M.; BEHRENS, Sebastian: The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology* 12 (2001), Nr. 3, S. 231–236
- [Andorra et al. 2011] ANDORRA, I.; MONTEIRO, M.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; ALBERGARIA, H.; MAS, A.: Analysis and direct quantification of Saccharomyces cerevisiae and Hanseniaspora guilliermondii populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridization, flow cytometry and quantitative PCR. *Food Microbiol* 28 (2011), Nr. 8, S. 1483–91
- [Aust 2007] Australian Wine Industry Technical Conference Inc. (Veranst.): *Avoiding microbiological wine spoilage*. Australian Wine Industry Technical Conference, 2007
- [Baleiras Couto et al. 2005] BALEIRAS COUTO, M. M.; REIZINHO, R. G.; DUARTE, F. L.: Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-Saccharomyces yeasts present during red wine fermentations. International Journal of Food Microbiology 102 (2005), Nr. 1, S. 49–56
- [BDBiosciences 2018] BDBIOSCIENCES: *BD Spectrum Viewer*. 2018. abgerufen am 03.08.2018
- [Behrens et al. 2004] Behrens, Sebastian; Fuchs, Bernhard M.; Amann, Rudolf: The Effect of Nucleobase-Specific Fluorescence Quenching on In

- Situ Hybridization with rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. *Systematic and Applied Microbiology* 27 (2004), Nr. 5, S. 565 572
- [Behrens et al. 2003a] BEHRENS, Sebastian; FUCHS, Bernhard M.; MUELLER, Florian; AMANN, Rudolf: Is the In Situ Accessibility of the 16S rRNA of Escherichia coli for Cy3-Labeled Oligonucleotide Probes Predicted by a Three-Dimensional Structure Model of the 30S Ribosomal Subunit? Applied and Environmental Microbiology 69 (2003), Nr. 8, S. 4935–4941
- [Behrens et al. 2003b] BEHRENS, Sebastian; RUEHLAND, Caroline; INACIO, Joao; HUBER, Harald; FONSECA, A.; SPENCER-MARTINS, I.; FUCHS, Bernhard M.; AMANN, Rudolf: In Situ Accessibility of Small-Subunit rRNA of Members of the Domains Bacteria, Archaea, and Eucarya to Cy3-Labeled Oligonucleotide Probes. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2003), Nr. 3, S. 1748–1758
- [Bhatta et al. 2006] Bhatta, Hemant; Goldys, Ewa M.; Learmonth, Robert P.: Use of fluorescence spectroscopy to differentiate yeast and bacterial cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71 (2006), Nr. 1, S. 121–126
- [Bisson u. Butzke 2000] BISSON, L. F.; BUTZKE, C. E.: Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* 51 (2000), Nr. 2, S. 168–177
- [Bisson u. Joseph 2009] BISSON, Linda F.; JOSEPH, C. M. L.; KOENIG, H. (Hrsg.); UNDEN, G. (Hrsg.); FROEHLICH, J. (Hrsg.): *Chapter 3 Yeasts; in: Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer Berlin Heidelberg, 2009. 47–60 S.
- [Blaettel 2012] BLAETTEL, Verena: *Identifizierung, Quantifizierung und Hemmung von ausgewaehlten Hefen im Wein*, Johannes Gutenberg Universitaet Mainz, Diss., 2012
- [Blasco et al. 2003] BLASCO, Lucia; FERRER, Sergi; PARDO, Isabel: Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for in situ identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 225 (2003), Nr. 1, S. 115–123
- [Blateyron u. Sablayrolles 2001] BLATEYRON, Lucile; SABLAYROLLES, Jean M.:

- Stuck and slow fermentations in enology: statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91 (2001), Nr. 2, S. 184–189
- [Boulton et al. 1996] BOULTON, R.; SINGLETON, V.; BISSON, L.; KUNKEE, R.: Principles and practices of winemaking. Chapman & Hall, New York, 1996
- [Branco et al. 2019] Branco, Patricia; Candelas, Antonio; Caldela, Ana T.; Gonzalez-Perez, Marina: An important step forward for the future development of an easy and fast procedure for identifying the most dangerous wine spoilage yeast, Dekkera bruxellensis, in wine environment. *Microbial Biotechnology* 12 (2019), Nr. 6, S. 1237–1248
- [Branco et al. 2020] Branco, Patricia; Candelas, Antonio; Caldela, Ana T.; Gonzalez-Perez, Marina: A simple procedure for detecting Dekkera bruxellensis in wine environment by RNA-FISH using a novel probe. International Journal of Food Microbiology 314 (2020), S. 108415
- [Branco et al. 2012] Branco, Patricia; Monteiro, Margarida; Moura, Patricia; Albergaria, Helena: Survival rate of wine-related yeasts during alcoholic fermentation assessed by direct live/dead staining combined with fluorescence in situ hybridization. *International Journal of Food Microbiology* 158 (2012), Nr. 1, S. 49 57
- [Cadez et al. 2002] CADEZ, Neza; RASPOR, Peter; COCK, Arthur W.; BOEKHOUT, Teun; SMITH, Maudy T.: Molecular identification and genetic diversity within species of the genera Hanseniaspora and Kloeckera. *FEMS Yeast Research* 1 (2002), Nr. 4, S. 279–289
- [Casey u. Dobson 2004] CASEY, Garrett D.; DOBSON, Alan D.: Potential of using real-time PCR-based detection of spoilage yeast in fruit juice-a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology* 91 (2004), Nr. 3, S. 327 335
- [Casey u. Ingledew 1986] CASEY, Gregory P.; INGLEDEW, W. M. M.: Ethanol tolerance in yeasts. *Critical Reviews in Microbiology* 13 (1986), Nr. 3, S. 219–280
- [Chatonnet et al. 1995] CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J. N.: The

- Influence of Brettanomyces/Dekkera sp. Yeasts and Lactic Acid Bacteria on the Ethylphenol Content of Red Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 46 (1995), Nr. 4, S. 463–468
- [Ciani u. Fatichenti 1999] CIANI, M.; FATICHENTI, F.: Selective sugar consumption by apiculate yeasts. *Letters in Applied Microbiology* 28 (1999), Nr. 3, S. 203–206
- [Clemente-Jimenez et al. 2004] CLEMENTE-JIMENEZ, Josefa M.; MINGORANCE-CAZORL, Lydia; MARTINEZ-RODRIGUEZ, Sergio; HERAS-VAZQUEZ, Francisco Javier L.; RODRIGUEZ-VICO, Felipe: Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology* 21 (2004), Nr. 2, S. 149–155
- [Cocolin et al. 2000] COCOLIN, L.; BISSON, L. F.; MILLS, D. A.: Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters* 189 (2000), Nr. 1, S. 81–87
- [Cocolin et al. 2001] COCOLIN, Luca; HEISEY, Ashley; MILLS, David A.: Direct Identification of the Indigenous Yeasts in Commercial Wine Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* 52 (2001), Nr. 1, S. 49–53
- [Coons u. Kaplan 1950] COONS, Albert H.; KAPLAN, Melvin H.: Localization of Antigen in tissue cells. *Journal of Experimental Medicine* 91 (1950), Nr. 1, S. 1–13
- [Crabtree 1929] CRABTREE, Herbert G.: Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochemical Journal* 23 (1929), Nr. 3, S. 536–545
- [Crissman u. Steinkamp 1973] CRISSMAN, H. A.; STEINKAMP, J. A.: Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *The Journal of Cell Biology* 59 (1973), Nr. 3, S. 766–771
- [Crissman u. Steinkamp 1982] CRISSMAN, H. A.; STEINKAMP, J. A.: Rapid, one step staining procedures for analysis of cellular DNA and protein by single and dual laser flow cytometry. *Cytometry* 3 (1982), Nr. 2, S. 84–90

- [DeLong et al. 1989] DELONG, E. F.; WICKHAM, G. S.; PACE, N. R.: Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243 (1989), Nr. 4896, S. 1360–1363
- [Di Maio et al. 2011] DI MAIO, S.; PLANETA, D.; OLIVA, D.: A Method to Discriminate Between the Candida stellata and Saccharomyces cerevisiae in Mixed Fermentation on WLD and Lysine Agar Media. S. Afr. J. Enol. Vitic 32 (2011), Nr. 1
- [Dittrich u. Grossmann 2010] DITTRICH, Helmut H.; GROSSMANN, Manfred: *Mi-krobiologie des Weines*. 4. aktualisierte Auflage. Ulmer, Stuttgart, 2010
- [Esteve-Zarzoso et al. 1999] ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A.: Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rR-NA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic and evolutionary microbiology* 49 (1999), Nr. 1, S. 329–337
- [Fleet et al. 1984] FLEET, G. H.; LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBEREAU-GAYON, P.: Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines. *Applied and Environmental Microbiology* 48 (1984), Nr. 5, S. 1034–1038
- [Fleet 2003] FLEET, Graham H.: Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86 (2003), S. 11–22
- [Fowell 1965] FOWELL, R. R.: The identification of wild yeast colonies on lysine agar. *Journal of Applied Bacteriology* 28 (1965), Nr. 3, S. 373–383
- [Freer 1991] FREER, S. N.: Fermentation and aerobic metabolism of cellodextrins by yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (1991), Nr. 3, S. 655–659
- [Fuchs et al. 2000a] FUCHS, Bernhard M.; GLOECKNER, Frank O.; WULF, Joerg ; AMANN, Rudolf: Unlabeled Helper Oligonucleotides Increase the In Situ Accessibility to 16S rRNA of Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2000), Nr. 8, S. 3603–3607
- [Fuchs et al. 2000b] FUCHS, Bernhard M.; ZUBKOV, Mikhail V.; SAHM, Kerstin; BURKILL, Peter H.; AMANN, Rudolf: Changes in community compo-

- sition during dilution cultures of marine bacterioplankton as assessed by flow cytometric and molecular biological techniques. *Environmental Microbiology* 2 (2000), Nr. 2, S. 191–201
- [Fugelsang u. Edwards 2007] FUGELSANG, Kenneth C.; EDWARDS, Charles G.: Wine Microbiology Practical applications and procedures. 2. Edition. Springer, New York USA, 2007
- [Ganga u. Martinez 2004] GANGA, M. A.; MARTINEZ, C.: Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-Saccharomyces yeasts. *Journal of Applied Microbiology* 96 (2004), Nr. 1, S. 76–83
- [Gomez u. Forsburg 2004] GOMEZ, Eliana B.; FORSBURG, Susan L.; LIEBERMAN, Howard B. (Hrsg.): *Analysis of the Fission Yeast Schizosaccharomy-ces pombe Cell Cycle*. Totowa, NJ: Humana Press, 2004. 93–111 S.
- [Gonzalez et al. 2006] GONZALEZ, Sara S.; BARRIO, Eladio; GAFNER, Juerg; QUEROL, Amparo: Natural hybrids from Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces bayanus and Saccharomyces kudriavzevii in wine fermentations. FEMS Yeast Research 6 (2006), Nr. 8, S. 1221–1234
- [Gonzalez-Perez et al. 2017] GONZALEZ-PEREZ, M.; BRINCO, C.; VIEIRA, R.: Dual phylogenetic staining protocol for simultaneous analysis of yeast and bacteria in artworks. *Applied Physics A* 123 (2017), S. 142
- [Green u. Gray 1950] GREEN, S. R.; GRAY, P. P.: Paper read at American Society of Brewing Chemists Meeting. *Wallerstein Lab. Communications* 12 (1950), S. 43
- [Groat u. Ough 1978] GROAT, Marge; OUGH, C. S.: Effects of Insoluble Solids Added to Clarified Musts on Fermentation Rate, Wine Composition, and Wine Quality. *American Journal of Enology and Viticulture* 29 (1978), Nr. 2, S. 112–119
- [Guillamon et al. 1994] GUILLAMON, Jose M.; BARRIO, Eladio; HUERTA, Tomas; QUEROL, Amparo: Rapid Characterization of Four Species of the Saccharomyces Sensu Stricto Complex According to Mitochondrial DNA Patterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44 (1994), Nr. 4, S. 708–714

- [Guillamon et al. 1998] GUILLAMON, Jose M.; SABATE, Josepa; BARRIO, Eladio; CANO, Josep; QUEROL, A.: Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology* 169 (1998), Apr, Nr. 5, S. 387–392
- [Gutell 1993] GUTELL, R. R.: Collection of small subunit (16S- and 16S-like) ribosomal RNA structures. *Nucleic acids research* 21 (1993), Nr. 13, S. 3051–3054
- [Hayama et al. 2002] HAYAMA, Yoshiyuki; FUKUDA, Yasuki; KAWAI, Shigeyuki; HA-SHIMOTO, Wataru; MURATA, Kousaku: Extremely simple, rapid and highly efficient transformation method for the yeast Saccharomyces cerevisiae using glutathione and early log phase cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94 (2002), Nr. 2, S. 166–171
- [Heard u. Fleet 1988] HEARD, G. M.; FLEET, G. H.: The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology* 65 (1988), Nr. 1, S. 23–28
- [Helm et al. 1991] HELM, D.; LABISCHINSKI, H.; SCHALLEHN, Gisela; NAUMANN, D.: Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Microbiology* 137 (1991), Nr. 1, S. 69–79
- [Henick-Kling et al. 1998] HENICK-KLING, T.; EDINGER, W.; DANIEL, P.; MONK, P.: Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine.

 *Journal of applied microbiology 84 (1998), Nr. 5, S. 865–876
- [Hierro et al. 2006] HIERRO, Nuria; ESTEVE-ZARZOSO, Braulio; GONZALEZ, Angel; MAS, Albert; GUILLAMON, Jose M.: Real-Time Quantitative PCR (QPCR) and Reverse Transcription-QPCR for Detection and Enumeration of Total Yeasts in Wine. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2006), Nr. 11, S. 7148–7155
- [Hugenholtz et al. 2002] *Kapitel* 6. In: Hugenholtz, Philip; Tyson, Gene W.; Blackall, Linda L.: *Design and Evaluation of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for Fluorescence In Situ Hybridization*. Totowa, NJ: Humana Press, 2002, S. 29–42

- [Hutter 1992] HUTTER, K. J.: Schnellbestimmungen zur tot-lebend-Analyse von Hefezellen. *Brauwelt* 132 (1992), Nr. 7/8, S. 252–262
- [Inacio et al. 2003] INACIO, J.; BEHRENS, S.; FUCHS, B. M.; FONSECA, A.; SPENCER-MARTINS, I.; AMANN, R.: In situ accessibility of Saccharomyces cerevisiae 26S rRNA to Cy3-labeled oligonucleotide probes comprising the D1 and D2 domains. *Applied and Environmental Mi*crobiology 69 (2003), Nr. 5, S. 2899–905
- [Ingledew u. Kunkee 1985] INGLEDEW, W. M.; KUNKEE, Ralph E.: Factors Influencing Sluggish Fermentations of Grape Juice. *American Journal of Enology and Viticulture* 36 (1985), Nr. 1, S. 65–76
- [John et al. 1969] JOHN, H. A.; BIRNSTIEL, M. L.; JONES, K. W.: RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223 (1969), Nr. 5206, S. 582–587
- [Kawai et al. 2010] KAWAI, Shigeyuki; HASHIMOTO, Wataru; MURATA, Kousaku: Transformation of Saccharomyces cerevisiae and other fungi. *Bioengineered Bugs* 1 (2010), Nr. 6, S. 395–403
- [Kemp et al. 1993] KEMP, P. F.; LEE, S.; LAROCHE, J.: Estimating the Growth Rate of Slowly Growing Marine Bacteria from RNA Content. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1993), Nr. 8, S. 2594–2601
- [Kosse et al. 1997] Kosse, Dagmar; Seiler, Herbert; Amann, Rudolf; Ludwig, Wolfgang; Scherer, Siegfried: Identification of Yoghurt-spoiling Yeasts with 18S rRNA-targeted Oligonucleotide Probes. Systematic and Applied Microbiology 20 (1997), Nr. 3, S. 468–480
- [Kraft et al. 2008] KRAFT, Claudine; DEPLAZES, Anna; SOHRMANN, Marc; PETER, Matthias: Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nature Cell Biology* 10 (2008), Nr. 5, S. 602–610
- [Kurtzman u. Robnett 1997] Kurtzman, C. P.; Robnett, C. J.: Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* 35 (1997), Nr. 5, S. 1216–1223
- [Kurtzman et al. 2011] KURTZMAN, Cletus (Hrsg.); FELL, Jack W. (Hrsg.); BOE-

- KHOUT, Teun (Hrsg.): *The yeasts: a taxonomic study*. 5th Edition. Elsevier, 2011
- [Kurtzman 2011] Kurtzman, Cletus P.: Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of Pichia anomala to Wickerhamomyces anomalus. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99 (2011), S. 13–23
- [Kurtzman u. Robnett 1998] Kurtzman, Cletus P.; Robnett, Christie J.: Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73 (1998), Nr. 4, S. 331–371
- [Lafon-Lafourcade et al. 1979] LAFON-LAFOURCADE, S.; LARUE, F.; RIBEREAU-GAYON, P.: Evidence for the Existence of Survival Factors as an Explanation for Some Peculiarities of Yeast Growth, Especially in Grape Must of High Sugar Concentration. *Applied and Environmental Microbiology* 38 (1979), Nr. 6, S. 1069–1073
- [Legras u. Karst 2003] LEGRAS, Jean-Luc; KARST, Francis: Optimisation of interdelta analysis for Saccharomyces cerevisiae strain characterisation. FEMS Microbiology Letters 221 (2003), Nr. 2, S. 249–255
- [Legras et al. 2005] LEGRAS, Jean-Luc; RUH, Olivier; MERDINOGLU, Didier; KARST, Francis: Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of Saccharomyces cerevisiae strains. *International Journal of Food Microbiology* 102 (2005), Nr. 1, S. 73 83
- [Lemperle 2007] LEMPERLE, Edmund: *Weinfehler erkennen*. Ulmer, Stuttgart, 2007
- [Lesnik u. Freier 1995] LESNIK, Elena A.; FREIER, Susan M.: Relative Thermodynamic Stability of DNA, RNA, and DNA:RNA Hybrid Duplexes: Relationship with Base Composition and Structure. *Biochemistry* 34 (1995), Nr. 34, S. 10807–10815
- [de Llanos Frutos et al. 2004] LLANOS FRUTOS, Rosa de; FERNANDEZ-ESPINAR, M. T.; QUEROL, Amparo: Identification of species of the genus Candida by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie van Leeuwenhoek* 85 (2004), Apr, Nr. 3, S. 175–185

- [Loar et al. 1986] LOAR, L. D.; DENNISON, D.; SELL, S.: Production and characterization of monoclonal antibodies to rabbit lymphocyte subpopulations.
 I. Tissue immunofluorescence and flow cytometric analysis. *The Journal of Immunology* 137 (1986), Nr. 9, S. 2784–2790
- [Lopes et al. 2006] LOPES, Christian A.; LAVALLE, Teresa L.; QUEROL, Amparo; CABALLERO, Adriana C.: Combined use of killer biotype and mtDNA-RFLP patterns in a Patagonian wine Saccharomyces cerevisiae diversity study. *Antonie van Leeuwenhoek* 89 (2006), Jan, Nr. 1, S. 147–156
- [Lopez et al. 2001] LOPEZ, Victoria; QUEROL, Amparo; RAMON, Daniel; FERNANDEZ-ESPINAR, M.Teresa: A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 68 (2001), Nr. 1, S. 75 81
- [Manz et al. 1992] MANZ, Werner; AMANN, Rudolf; LUDWIG, Wolfgang; WAGNER, Michael; SCHLEIFER, Karl-Heinz: Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of Proteobacteria: Problems and Solutions. Systematic and Applied Microbiology 15 (1992), Nr. 4, S. 593 600
- [Martinez et al. 2004] MARTINEZ, M. J.; ROY, S.; ARCHULETTA, A. B.; WENTZELL, P. D.; ANNA-ARRIOLA, S. S.; RODRIGUEZ, A. L.; ARAGON, A. D.; QUINONES, G. A.; ALLEN, C.; WERNER-WASHBURNE, M.: Genomic analysis of stationary-phase and exit in Saccharomyces cerevisiae: gene expression and identification of novel essential genes. *Molecular biology of the cell*, 15 (2004), Nr. 12, S. 5295–5305
- [Mikkola u. Kurland 1992] MIKKOLA, R.; KURLAND, C. G.: Selection of laboratory wild-type phenotype from natural isolates of Escherichia coli in chemostats. *Molecular Biology and Evolution* 9 (1992), 05, Nr. 3, S. 394–402
- [Moeller et al. 1977] MOELLER, Klaus; RINKE, Jutta; ROSS, Alexander; BUDDLE, Gerard; BRIMACOMBE, Richard: The Use of Formaldehyde in RNA-Protein Cross-linking Studies with Ribosomal Subunits from Escherichia coli. *European Journal of Biochemistry* 76 (1977), Nr. 1, S. 175–187
- [Moreira et al. 2008] MOREIRA, N.; MENDES, F.; PINHO, P. G.; HOGG, T.; VAS-CONCELOS, I.: Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters

- production profile of Hanseniaspora uvarum and Hanseniaspora guilliermondii grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology* 124 (2008), Nr. 3, S. 231–238
- [Moter u. Goebel 2000] MOTER, Annette; GOEBEL, Ulf B.: Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 41 (2000), Nr. 2, S. 85–112
- [Ness et al. 1993] NESS, F.; LAVALLEE, F.; DUBOURDIEU, D.; AIGLE, M.; DULAU, L.: Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 62 (1993), Nr. 1, S. 89–94
- [OIV 2011] OIV: Resolution OIV-OENO 408. 2011. OIV = International Organisation of Vine and Wine
- [Oliver 1993] Kapitel 11. In: OLIVER, James D.: Formation of Viable but Nonculturable Cells. Boston, MA: Springer US, 1993, S. 239–272
- [Ough et al. 1989] OUGH, C. S.; DAVENPORT, M.; JOSEPH, K.: Effects of Certain Vitamins on Growth and Fermentation Rate of Several Commercial Active Dry Wine Yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture* 40 (1989), Nr. 3, S. 208–213
- [Overton 1988] OVERTON, W. R.: Modified histogram subtraction technique for analysis of flow cytometry data. *Cytometry* 9 (1988), Nr. 6, S. 619–626
- [Padilla et al. 2018] Padilla, Beatriz; Gil, Jose; Manzanares, Paloma: Challenges of the Non-Conventional Yeast Wickerhamomyces anomalus in Winemaking. *Fermentation* 4 (2018), Nr. 3, S. 68
- [Pardue u. Gall 1969] PARDUE, Mary L.; GALL, Joseph G.: Molecular Hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 64 (1969), Nr. 2, S. 600–604
- [Pernthaler et al. 2001] PERNTHALER, Jakob; GLOECKNER, Frank-Oliver; SCHOENHUBER, Wilhelm; AMANN, Rudolf: Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. In: *Marine Microbiology* Bd. 30. Academic Press, 2001. ISSN 0580–9517, S. 207–226

- [Pfannebecker 2008] PFANNEBECKER, Jens: Entwicklung und Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Art- und Stamm-Identifizierung pround eukaryotischer Organismen, Johannes Gutenberg-Universitaet Mainz, Doktorarbeit, 2008
- [Phister u. Mills 2003] PHISTER, Trevor G.; MILLS, David A.: Real-Time PCR Assay for Detection and Enumeration of Dekkera bruxellensis in Wine. Applied and Environmental Microbiology 69 (2003), Nr. 12, S. 7430–7434
- [Poulsen et al. 1993] POULSEN, L. K.; BALLARD, G.; STAHL, D. A.: Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1993), Nr. 5, S. 1354–1360
- [Prakitchaiwattana et al. 2004] PRAKITCHAIWATTANA, Cheunjit J.; FLEET, Graham H.; HEARD, Gillian M.: Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research* 4 (2004), Nr. 8, S. 865–877
- [Querol et al. 1992] QUEROL, Amparo; BARRIO, Eladio; RAMON, Daniel: A Comparative Study of Different Methods of Yeast Strain Characterization. Systematic and Applied Microbiology 15 (1992), Nr. 3, S. 439 – 446
- [Radler et al. 1985] RADLER, F.; PFEIFFER, P.; DENNERT, M.: Killer toxins in new isolates of the yeasts Hanseniaspora uvarum and Pichia kluyveri. FEMS Microbiology Letters 29 (1985), 09, Nr. 3, S. 269–272
- [Rahn 1929] RAHN, O.: The decreasing rate of fermentation. *Journal of bacterio-logy* 18 (1929), Nr. 3, S. 207–26
- [Ribereau-Gayon et al. 2006] RIBEREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONECHE, B.; LONVAUD, A.: *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinificatons 2nd Edition*. Bd. 1. 2. Edition. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, England, 2006
- [Ribereau-Gayon 1999] RIBEREAU-GAYON, Pascal: Observations related to the causes and consequences of stuck fermentation in vinification. *OENO One* 33 (1999), Nr. 1, S. 39–48
- [Riggs et al. 1958] RIGGS, J. L.; SEIWALD, R. J.; BURCKHALTER, J. H.; DOWNS, C. M.; METCALF, T. G.: Isothiocyanate Compounds as Fluorescent La-

- beling Agents for Immune Serum. *The American Journal of Pathology* 34 (1958), Nr. 6, S. 1081–1097
- [van Rij 2013] RIJ, N. J. W. K. (Hrsg.): *The yeasts: a taxonomic study*. Bd. 3. Elsevier, 2013
- [Rodicio u. Heinisch 2009] Kapitel 6. In: RODICIO, Rosaura; HEINISCH, Juergen J.: Sugar Metabolism by Saccharomyces and non-Saccharomyces Yeasts. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009, S. 113–134
- [Roeder 2007] ROEDER, Christoph: Entwicklung von molekularen Sonden fuer die sichere Identifizierung von Hefen der Gattungen Brettanomyces, Dekkera, Johannes Gutenberg-Universitaet Mainz, Diss., 2007
- [Roeder et al. 2007] ROEDER, Christoph; KOENIG, Helmut; FROEHLICH, Juergen: Species-specific identification of Dekkera/Brettanomyces yeasts by fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S rRNA. *FEMS Yeast Research* 7 (2007), Nr. 6, S. 1013–1026
- [Ruimy et al. 1994] RUIMY, Raymond; BREITTMAYER, Violette; BOIVIN, Valerie; CHRISTEN, Richard: Assessment of the state of activity of individual bacterial cells by hybridization with a ribosomal RNA targeted fluorescently labelled oligonucleotidic probe. *FEMS Microbiology Ecology* 15 (1994), S. 207–213
- [Salma et al. 2013] SALMA, M.; ROUSSEAUX, S.; SEQUEIRA-LE GRAND, A.; DI-VOL, B.; ALEXANDRE, H.: Characterization of the Viable but Nonculturable (VBNC) State in Saccharomyces cerevisiae. *Plos One* 8 (2013), Nr. 10, S. e77600
- [Salmon 1989] SALMON, J. M.: Effect of Sugar Transport Inactivation in Saccharomyces cerevisiae on Sluggish and Stuck Enological Fermentations.
 Applied and Environmental Microbiology 55 (1989), Nr. 4, S. 953–958
- [Schaechter et al. 1958] SCHAECHTER, M.; MAALOE, O.; KJELDGAARD, N. O.: Dependency on Medium and Temperature of Cell Size and Chemical Composition during Balanced Growth of Salmonella typhimurium. *Microbiology* 19 (1958), Nr. 3, S. 592–606
- [Scher et al. 1980] SCHER, I.; BERNING, A. K.; KESSLER, S.; FINKELMAN, F. D.: Development of B lymphocytes in the mouse; studies of the frequen-

- cy and distribution of surface IgM and IgD in normal and immunedefective CBA/N F1 mice. *The Journal of Immunology* 125 (1980), Nr. 4, S. 1686–1693
- [Schipper et al. 1980] SCHIPPER, J; TILDERS, F. J.; WASSINK, R. G.; BOLEIJ, H. F.; PLOEM, J. S.: Microfluorimetric scanning of sympathetic nerve fibers: quantification of neuronal and extraneuronal fluorescence with the aid of histogram analysis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 28 (1980), Nr. 2, S. 124–132
- [Schoenhuber et al. 1999] SCHOENHUBER, Wilhelm; ZARDA, Boris; EIX, Stella; RIPPKA, Rosmarie; HERDMAN, Michael; LUDWIG, Wolfgang; AMANN, Rudolf: In Situ Identification of Cyanobacteria with Horseradish Peroxidase-Labeled, rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1999), Nr. 3, S. 1259–1267
- [Schuetz u. Gafner 1993a] SCHUETZ, M.; GAFNER, J.: Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *Journal of Applied Microbiology* 75 (1993), Nr. 6, S. 551–558
- [Schuetz u. Gafner 1993b] SCHUETZ, M.; GAFNER, J.: Sluggish alcoholic fermentation in relation to alterations of the glucose-fructose ratio. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel* 15 (1993), Nr. 3-4, S. 73–78
- [Schuetz u. Gafner 1994] SCHUETZ, M.; GAFNER, J.: Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. *Letters in Applied Microbiology* 19 (1994), Nr. 4, S. 253–257
- [Schuller u. Casal 2007] SCHULLER, Dorit; CASAL, Margarida: The genetic structure of fermentative vineyard-associated Saccharomyces cerevisiae populations revealed by microsatellite analysis. *Antonie van Leeuwenhoek* 91 (2007), Feb, Nr. 2, S. 137–150
- [Schuller et al. 2004] SCHULLER, Dorit; VALERO, Eva; DEQUIN, Sylvie; CASAL, Margarida: Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiology Letters* 231 (2004), Nr. 1, S. 19–26
- [Schwann 1837] SCHWANN, Theodor: Vorlaeufige Mittheilung, betreffend Versu-

- che ueber die Weingaehrung und Faeulniss. *Annalen der Physik* 117 (1837), Nr. 5, S. 184–193
- [Serpaggi et al. 2010] SERPAGGI, Virginie; REMIZE, Fabienne; GRAND, Anabelle Sequeira-Le; ALEXANDRE, Herve: Specific identification and quantification of the spoilage microorganism Brettanomyces in wine by flow cytometry: A useful tool for winemakers. *Cytometry Part A* 77A (2010), Nr. 6, S. 497–499
- [Shapiro 2003] Shapiro, H. M.: *Practical Flow Cytometry*. 4th Edition. Wiley, New Yersey, 2003
- [Shimazu u. Watanabe 1981] SHIMAZU, Y.; WATANABE, M.: Effects of yeast strains and environmental conditions on formation of organic acids in must during fermentation. *J. Ferment. Technol. (Japan)* 59:1 (1981), Feb
- [da Silva et al. 2020] SILVA, Jackeline M.; RIBEIRO, Karol C.; TELES, Gilberto H.; RIBEIRO, Ester; MORAIS JUNIOR, Marcos A.; BARROS PITA, Will de: Fermentation profiles of the yeast Brettanomyces bruxellensis in d-xylose and I-arabinose aiming its application as a second-generation ethanol producer. *Yeast* 37 (2020), Nr. 11, S. 597–608
- [Sipiczki 2004] SIPICZKI, Matthias: Species identification and comparative molecular and physiological analysis of Candida zemplinina and Candida stellata. *Journal of Basic Microbiology* 44 (2004), Nr. 6, S. 471–479
- [Smith 1998] SMITH, M. T.; KURTZMAN, C. P. (Hrsg.); FELL, J. W. (Hrsg.): *Chapter 27 Dekkera van der Walt; in: The Yeasts.* 4th Edition. Elsevier, New York, USA, 1998a. 174–177 S.
- [Sommer 2020] SOMMER, S.: Monitoring the Functionality and Stress Response of Yeast Cells Using Flow Cytometry. *Microorganisms* 8 (2020), Nr. 4, S. 619
- [Southwick et al. 1990] SOUTHWICK, Philip L.; ERNST, Lauren A.; TAURIELLO, Erica W.; PARKER, Stephen R.; MUJUMDAR, Ratnakar B.; MUJUMDAR, Swati R.; CLEVER, Hester A.; WAGGONER, Alan S.: Cyanine dye labeling reagents carboxymethylindocyanine succinimidyl esters. *Cytometry* 11 (1990), Nr. 3, S. 418–430
- [Sponholz et al. 1990] SPONHOLZ, W. R.; HEUER, C.; DITTRICH, H. H.: Vermehrung, Ueberleben und Stoffwechsel von im Most vorkommenden

- Hefen bei Steigenden Zuckerkonzentrationen. Wein-Wissenschaft 45 (1990), Nr. 1, S. 1–7
- [Stender et al. 2001] STENDER, Henrik; KURTZMAN, Cletus; HYLDIG-NIELSEN, Jens J.; SOERENSEN, Ditte; BROOMER, Adam; OLIVEIRA, Kenneth; PERRY-O'KEEFE, Heather; SAGE, Andrew; YOUNG, Barbara; COULL, James: Identification of Dekkera bruxellensis (Brettanomyces) from Wine by Fluorescence In Situ Hybridization Using Peptide Nucleic Acid Probes. Applied and Environmental Microbiology 67 (2001), Nr. 2, S. 938–941
- [Strong et al. 1982] STRONG, Douglas M.; ORTALDO, John R.; PANDOLFI, Franco; MALUISH, Annette; HERBERMAN, Ronald B.: Cryopreservation of human mononuclear cells for quality control in clinical immunology. I. Correlations in recovery of K- and NK-cell functions, surface markers, and morphology. *Journal of Clinical Immunology* 2 (1982), Jul, Nr. 3, S. 214–221
- [Teresa Fernandez-Espinar et al. 2000] TERESA FERNANDEZ-ESPINAR, M.; ESTEVE-ZARZOSO, Braulio; QUEROL, Amparo; BARRIO, Eladio: RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rR-NA gene region of the genus Saccharomyces: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 78 (2000), Jul, Nr. 1, S. 87–97
- [Thomas et al. 1978] THOMAS, D. S.; HOSSACK, J. A.; ROSE, A. H.: Plasma-Membrane lipid composition and ethanol tolerance in Saccharomyces cerevisiae. *Archives of Microbiology* 117 (1978), Nr. 3, S. 239–245
- [Torimura et al. 2001] TORIMURA, Masaki; KURATA, Shinya; YAMADA, Kazutaka; YOKOMAKU, Toyokazu; KAMAGATA, Yoichi; KANAGAWA, Takahiro; KURANE, Ryuichiro: Fluorescence-quenching phenomenon by photoin-duced electron transfer between a fluorescent dye and a nucleotide base. *Analytical Sciences* 17 (2001), Nr. 1, S. 155–160
- [Verhulst 1838] VERHULST, Pf.: Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. *Corresp. Math. Phys.* 10 (1838), 113-126. https://ci.nii.ac.jp/naid/10015246307/en/
- [Viegas et al. 1989] VIEGAS, Cristina A.; ROSA, M. F.; SA-CORREIA, Isabel; No-VAIS, Julio M.: Inhibition of Yeast Growth by Octanoic and Decanoic

- Acids Produced during Ethanolic Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (1989), Nr. 1, S. 21–28
- [van der Vliet et al. 1994] VLIET, G. M. d.; SCHEPERS, P.; SCHUKKINK, R. A.; GEMEN, B. van; KLATSER, P. R.: Assessment of mycobacterial viability by RNA amplification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38 (1994), Nr. 9, S. 1959–1965
- [Vogelei 2014] Vogelei, Christian: Etablierung eines FISH-basierten Flusszytometrienachweises von Hanseniaspora uvarum, Technische Universitaet Kaiserslauten, Masterarbeit, 07 2014. – Diese Masterarbeit wurde von mir im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation betreut
- [Wagner et al. 1993] WAGNER, M.; AMANN, R.; LEMMER, H.; SCHLEIFER, K. H.: Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1993), Nr. 5, S. 1520–1525
- [Waldron u. Lacroute 1975] WALDRON, C.; LACROUTE, F.: Effect of growth rate on the amounts of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast. *Journal of Bacteriology* 122 (1975), Nr. 3, S. 855–865
- [Wallner et al. 1995] WALLNER, G.; ERHART, R.; AMANN, R.: Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (1995), Nr. 5, S. 1859–66
- [Wallner et al. 1993] WALLNER, Guenter; AMANN, Rudolf; BEISKER, Wolfgang: Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14 (1993), Nr. 2, S. 136–143
- [Wang et al. 2014] WANG, Chunxiao; ESTEVE-ZARZOSO, Braulio; MAS, Albert: Monitoring of Saccharomyces cerevisiae, Hanseniaspora uvarum, and Starmerella bacillaris (synonym Candida zemplinina) populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridization. *International Journal of Food Microbiology* 191 (2014), Nr. 0, S. 1–9
- [Woese 1987] WOESE, Carl R.: Bacterial evolution. *Microbiological reviews* 51 (1987), Nr. 2

- [Xufre et al. 2006] XUFRE, A.; ALBERGARIA, H.; INACIO, J.; SPENCER-MARTINS, I.; GIRIO, F.: Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108 (2006), Nr. 3, S. 376–84
- [Yilmaz u. Noguera 2004] YILMAZ, L. S.; NOGUERA, Daniel R.: Mechanistic Approach to the Problem of Hybridization Efficiency in Fluorescent In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2004), Nr. 12, S. 7126–7139
- [Yilmaz et al. 2006] YILMAZ, L. S.; OEKTEN, Hatice E.; NOGUERA, Daniel R.: Making All Parts of the 16S rRNA of Escherichia coli Accessible In Situ to Single DNA Oligonucleotides. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2006), Nr. 1, S. 733–744
- [Yilmaz et al. 2011] YILMAZ, L. S.; PARNERKAR, Shreyas; NOGUERA, Daniel R.: mathFISH, a Web Tool That Uses Thermodynamics-Based Mathematical Models for In Silico Evaluation of Oligonucleotide Probes for Fluorescence In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (2011), Nr. 3, S. 1118–1122
- [Zanol et al. 2010] ZANOL, G. C.; BALEIRAS-COUTO, M. M.; DUARTE, F. L.: Restriction profiles of 26S rDNA as a molecular approach for wine yeasts identification. *Ciencia e Tecnica Vivinicola* 25 (2010), Nr. 2, S. 75–85
- [Zarda et al. 1991] ZARDA, Boris; AMANN, Rudolf; WALLNER, Guenter; SCHLEIFER, Karl-Heinz: Identification of single bacterial cells using digoxigenin-labelled, rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* 137 (1991), Nr. 12, S. 2823–2830
- [Ziomek 1982] ZIOMEK, Carol A.: The use of fluorescein isothiocyanate (FITC) as a short-term cell lineage marker in the peri-implantation mouse embryo. *Wilhelm Roux's archives of developmental biology* 191 (1982), Jan, Nr. 1, S. 37–41
- [Zott et al. 2010] ZOTT, K.; CLAISSE, O.; LUCAS, P.; COULON, J.; LONVAUD-FUNEL, A.; MASNEUF-POMAREDE, I.: Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. *Food Microbiology* 27 (2010), Nr. 5, S. 559 567

[ZwirgImaier 2005] ZWIRGLMAIER, Katrin: Fluorescence in situ hybridisation (FISH) - the next generation. *FEMS Microbiology Letters* 246 (2005), Nr. 2, S. 151–158

A. Anhang

A.1. Versuchsdaten

A.1.1. Negativkontrolle

Daten zu Abb. 3.1: Prozentuale Anteile der hybridisierten Zellen von *H. uvarum* nach Berücksichtigung des FITC-induzierten Hintergrundrauschens - Daten aus Masterthesis Christian Vogelei

Sonde	hybridisierte Zellen [%]	Standardabweichung	CV [%]
Euk	83,6	1,65	1,97
non-Euk	0,003	0,005	141,42
Huv	79,84	1,33	1,67
Sce	0	0	0

A.1.2. Optimierung der Hybridisierungsbedingungen

A.1.2.1. Optimierung von Temperatur, Sondenkonzentration und Inkubationsdauer der Hybridisierung

Daten zu Abb. 3.2: Auswirkung der Hybridisierungstemperatur, Sondenkonzentration und Hybridisierungsdauer auf den Anteil mit Huv-Sonde hybridisierter Zellen von *H. uvarum* - Daten aus Masterthesis Christian Vogelei *extreme Ausreißer entfernt (Stdabw. = Standardabweichung)

41 °C				
Hyb.dauer [min]	Sondenkonz. [pmol/μl]	hyb. Zellen [%]	Stdabw.	CV [%]
	1,5	1,83	0,03	1,37
60	3	2,58	0,20	7,57
	6	2,51	0,59	23,51
	1,5	12,81	0,85	6,61
180	3	10,72	1,15	10,71
	6	24,75	3,78	15,28
	1,5	77,85	0,54	0,69
960	3	89,74	1,68	1,87
	6	88,17	1,24	1,41

46℃				
Hyb.dauer [min]	Sondenkonz. [pmol/μl]	hyb. Zellen [%]	Stdabw.	CV [%]
	1,5	1,48	0,49	33,29
60	3	3,66	*	*
	6	39,34	2,09	5,30
	1,5	30,34	1,44	4,75
180	3	46,05	2,56	5,57
	6	58,92	5,16	8,76
	1,5	85,69	1,12	1,30
960	3	84,30	2,22	2,63
	6	82,30	2,00	2,44

51℃				
Hyb.dauer [min]	Sondenkonz. [pmol/μl]	hyb. Zellen [%]	Stdabw.	CV [%]
	1,5	12,40	1,70	13,73
60	3	18,10	2,31	12,75
	6	33,70	2,73	8,10
	1,5	52,31	7,94	15,18
180	3	66,74	4,52	6,77
	6	76,86	1,49	1,94
	1,5	73,52	3,11	4,22
960	3	69,39	1,43	2,06
	6	66,25	0,71	1,07

Daten zu Abb. 3.3: Abhängigkeit von der Hybridisierungsdauer bei der Hybridisierung von *H. uvarum*

Hyb. [h]	Sonde	hyb. Zellen [%]	Standardabweichung	CV [%]
3	Euk	77,94	2,32	2,97
3	Huv	24,63	0,27	41,59
4	Euk	93,34	1,02	1,52
4	Huv	33,99	8,51	25,05
5	Euk	92,55	1,40	1,52
3	Huv	36,06	4,53	12,56
18	Euk	81,95	7,53	9,19
10	Huv	63,55	4,18	6,59
20	Euk	85,02	0,35	0,41
20	Huv	61,67	3,86	6,27
22	Euk	85,84	1,04	1,21
22	Huv	65,90	4,22	6,41

A.1.2.2. Optimierung der SDS-Konzentration des Hybridisierungspuffers

Daten zu Abb. 3.4: Abhängigkeit von der SDS-Konzentration bei der Hybridisierung von *H. uvarum* - Daten aus Masterthesis Christian Vogelei

SDS [%]	Sonde	hyb. Zellen[%]	Standardabweichung	CV [%]
0,000 Euk		45,74	0,90	1,96
0,000	Huv	32,12	0,39	1,20
0,001	Euk	49,15	0,22	0,46
0,001	Huv	47,47	0,86	1,80
0,010	Euk	83,59	1,65	1,97
0,010	Huv	79,84	1,33	1,67

A.1.3. Optimierung der Fixierungsmethode

Daten zu Abb. 3.5: Auswirkung von Änderungen der Fixierzeit auf die Hybridisierung von *H. uvarum* - Daten aus Masterthesis Christian Vogelei

Fixierdauer [min]	Sonde	hyb. Zellen [%]	Standardabweichung	CV [%]
30	Euk	91,79	0,83	0,90
30	Huv	79,03	0,84	1,07
180	Euk	94,60	0,69	0,73
	Huv	83,43	0,67	0,80
1080	Euk	93,72	1,97	2,10
1080	Huv	84,30	1,91	2,27

Daten zu Abb. 3.6: Auswirkung der Fixiermethode auf die Hybridisierung von *H. uvarum* (Stdabw. = Standardabweichung)

Fixiermethode	Sonde	hyb. Zellen [%]	Stdabw.	CV [%]
	Euk	89,17	0,64	0,72
30min Formaldehyd	HuvH12L	84,51	0,54	0,64
	SceH12	3,09	1,99	64,46
	Euk	86,80	1,08	1,24
70% Ethanol	HuvH12L	83,55	1,02	1,22
	SceH12	7,39	2,20	29,71
	Euk	80,66	1,39	1,72
aufsteigende Ethanolreihe	HuvH12L	76,90	1,14	1,49
	SceH12	2,73	0,83	30,27

Daten zu Abb. 3.7: Auswirkung der Fixiermethode auf die Hybridisierung von *S. cerevisiae* (Stdabw. = Standardabweichung)

Fixiermethode	Sonde	hyb. Zellen [%]	Stdabw.	CV [%]
	Euk	95,83	0,51	0,53
30min Formaldehyd	HuvH12L	15,01	3,64	24,24
	SceH12	96,48	0,46	0,48
	Euk	93,84	0,15	0,15
70% Ethanol	HuvH12L	19,01	4,54	23,89
	SceH12	93,88	1,02	1,08
	Euk	93,25	0,72	0,77
aufsteigende Ethanolreihe	HuvH12L	16,13	2,06	12,78
	SceH12	89,54	2,51	2,81

A.1.4. Einsatz von Hilfssonden

A.1.4.1. Erstellung der Hilfssonden

A.1.4.2. Hilfssondeneinsatz bei H. uvarum

Daten zu Abb. 3.12, 3.13, 3.14 und Abb. 3.15: Normalisierter Median der FITC-Fluoreszenz und Anzahl hybridisierter Zellen [%] bei Verwendung der verschiedenen Hilfssonden bei *H. uvarum* (Stdabw.=Standardabweichung; hyb. Z. = hybridisierte Zellen; norm. Median = normierter Median)

Sonde	hyb. Z. [%]	St.abw.	CV [%]	norm. Median	Stdabw.
Euk	87,90	0,19	0,22	163,09	2,65
Huv	73,03	7,73	10,59	100,00	4,25
Huv + H1	77,01	5,01	6,50	148,50	24,55
Huv + H1 + H2n	90,01	0,68	0,76	213,30	8,82
Huv + H2L	88,84	0,13	0,14	151,93	2,10
Huv + H2n	83,30	0,99	1,19	120,17	1,61
Huv + H7	82,03	1,72	2,10	112,45	6,76
Euk	82,40	0,50	0,60	137,27	2,39
Huv	81,03	0,36	0,44	100,00	1,04
Huv + H1 + H2L	90,83	1,62	1,79	223,62	0,90
Huv + H1 + H3n	82,79	1,25	1,51	117,71	5,14
Huv + H3n	73,90	1,55	2,10	74,91	2,76
Huv + H4L	79,79	1,00	1,25	112,18	2,76
Huv + H4n	75,85	3,73	4,92	87,45	13,31
Euk	73,26	0,94	1,28	119,33	9,51
Huv	71,44	0,67	0,94	100,00	3,82
Huv + H3L	67,08	1,67	2,49	87,96	0,79
Huv + H5	67,38	1,70	2,52	84,31	2,21
Huv + H6n	76,39	1,74	2,28	116,81	5,18
Euk	85,40	1,46	1,71	135,66	10,46
Huv	78,13	4,18	5,35	100,00	5,70
Huv +H1 + H2L + H7	88,87	0,55	0,62	179,84	1,10
Huv + H2 +H4L	82,12	0,36	0,44	105,43	1,10

Sonde	hyb. Z. [%]	St.abw.	CV [%]	norm. Median	Stdabw.
Huv + H5 + H6L	72,01	7,48	10,38	98,45	6,67
Huv + H5 + H6n	80,07	0,55	0,68	96,12	1,10
Huv + H6L	80,72	0,76	0,94	109,30	3,80

A.1.4.3. Hilfssondeneinsatz bei S. cerevisiae

Daten zu Abb. 3.16: Effekt der Hilfssonden bei *S. cerevisiae* (hyb. Z. = hybridisierte Zellen; Stdabw. = Standardabweichung; norm. Median = normierter Median)

FA- Fixierungs- dauer	Sonde	hyb. Z. [%]	Stdabw.	CV [%]	norm. Median	Stdabw.
20 min	Euk	4,89	1,87	38,29	96,53	9,37
30 min	Sce	9,24	0,33	3,56	100,00	1,70
(Standard)	SceH12	35,62	1,34	3,77	169,44	5,47
	Euk	41,55	2,16	5,21	195,83	9,00
2h	Sce	48,16	2,19	4,55	100,00	16,75
	SceH12	75,73	1,43	1,89	169,44	17,76
	Euk	11,02	1,81	16,42	105,19	5,51
3h	Sce	11,67	0,67	5,73	100,00	6,62
	SceH12	41,52	3,82	9,20	297,40	45,92
	Euk	15,42	0,48	3,09	108,33	6,42
5h	Sce	18,62	0,85	4,58	100,00	2,55
	SceH12	51,15	1,17	2,30	396,88	15,31
	Euk	90,68	0,41	0,46	115,10	0,94
20h	Sce	88,44	0,49	0,55	100,00	1,01
	SceH12	92,92	0,54	0,59	143,04	2,39
	Euk	92,17	0,70	0,75	117,60	4,46
24h	Sce	91,40	0,35	0,39	100,00	0,68
	SceH12	94,46	1,25	1,33	150,13	9,24

A.1.4.4. Hilfssondeneinsatz bei P. anomala und D. bruxellensis

Daten zu Abb. 3.17: Effekt der Hilfssonden bei *Pichia anomala* (Stdabw. = Standardabweichung; norm. Median = normierter Median)

Sonde	hyb. Zellen [%]	Stdabw.	CV [%]	norm. Median [%]	Stdabw.
HuvH12L	89,11	3,68	4,13	365,91	17,68
Euk	97,31	0,55	0,57	593,18	29,33
Pan	23,07	2,57	11,12	100,00	3,21
PanH12	93,09	1,59	1,71	455,68	9,78

Daten zu Abb. 3.18: Effekt der Hilfssonden bei *Dekkera bruxellensis* (AWRI1499) (Stdabw.=Standardabweichung; hyb. Z. = hybridisierte Zellen; norm. M. = normierter Median)

Sonde	hyb. Z. [%]	Stdabw.	CV [%]	norm. M. [%]	Stdabw.
Euk	71,43	0,45	0,63	222,92	1,47
D.brux 1.1	22,63	3,41	15,05	100,00	5,10
D.brux 1.2	62,17	1,10	1,76	182,29	1,47
D.brux 1.1 + D.brux	78,39	1,21	1,55	297,92	3,90
1.2					
D.brux 1.1 H1LH2L	69,56	0,23	0,33	220,83	1,47
D.brux 1.2 H1H2L	74,78	0,79	1,05	253,13	2,55
D.brux1.1 H1LH2L +	84,71	0,56	0,66	492,71	1,47
D.brux1.2 H1H2L					

A.1.5. Einfluss der Wachstumsphase auf die Hybridisierungseffizienz

A.1.5.1. Wachstumsverlauf und Hybridisierungseffizienz im Wachstumsverlauf von *H. uvarum*

Daten zu Abb. 3.19: Wachstumskurve von *H. uvarum* (DSM) in Chardonnaymost: exponentielle sigmoide und logistische Funktion $y = a*(1+b*exp(c*x))^{-1}$ - Daten aus Masterthesis Christian Vogelei

Most				
Zeit [min]	Messwerte	Schätzwerte	Chi-Quadrate	Summe
	[Zellzahl]			Chi-Quadrate
30	408680	1,88 * 10 ⁵	$4,85*10^{10}$	$8,30*10^{15}$
60	506575	$2,63*10^{5}$	5, 92 * 10 ¹⁰	
120	548975	5, 14 * 10 ⁵	1,24 * 10 ⁹	
150		$7,17*10^{5}$		
180		1,00 * 10 ⁶		
210	2395020	1,39 * 10 ⁶	1,00 * 10 ¹²	
285		3, 17 * 10 ⁶		
330	6003600	5, 15 * 10 ⁶	$7,29*10^{11}$	
410		1, 18 * 10 ⁷		
450	10195975	$1,75*10^7$	5, 31 * 10 ¹³	
470		$2,11*10^7$		
500		$2,75*10^7$		
530		$3,51*10^7$		
560		$4,37*10^7$		
590		$5,32*10^7$		
620		$6,28*10^7$		
660		$7,52*10^7$		
700		$8,60*10^7$		
1380	60857250	1, 16 * 10 ⁸	$2,99*10^{15}$	
1710	61469450	1, 16 * 10 ⁸	2, 93 * 10 ¹⁵	
2880	67333120	1, 16 * 10 ⁸	$2,33*10^{15}$	
а	1, 16 * 10 ⁸			
b	$8,56*10^{2}$			
С	$-1,12*10^{-2}$			

Daten zu Abb. 3.19: Wachstumskurve von H. uvarum (DSM) in YPD-Medium: exponentielle sigmoide und logistische Funktion $y = a*(1+b*exp(c*x))^{-1}$ - Daten aus Masterthesis Christian Vogelei

YPD				
Zeit [min]	Messwerte	Schätzwerte	Chi-Quadrate	Summe
	[Zellzahl]			Chi-Quadrate
0	2027635	6, 09 * 10 ⁵	2, 01 * 10 ¹²	2,86 * 10 ¹⁴
30	2052860	$8,82*10^5$	1,37 * 10 ¹²	
45	1950053	1,06 * 10 ⁶	$7,90*10^{11}$	
120		$2,67*10^{6}$		
180		5, 51 * 10 ⁶		
210		7, 88 * 10 ⁶		
270	8804170	1,57 * 10 ⁷	$6,20*10^{13}$	
330	20758613	$2,99*10^{7}$	$8,29*10^{13}$	
410		6, 11 * 10 ⁷		
450		8, 06 * 10 ⁷		
470		$9,04*10^{7}$		
500		1,04 * 10 ⁸		
530		1, 17 * 10 ⁸		
560		1, 27 * 10 ⁸		
590		1, 36 * 10 ⁸		
620		1, 42 * 10 ⁸		
660		1, 48 * 10 ⁸		
700		1,52 * 10 ⁸		
1500	168054533	1,59 * 10 ⁸	$7,98*10^{13}$	
2800		1, 59 * 10 ⁸		
4320	151280750	1,59 * 10 ⁸	6, 15 * 10 ¹³	
а	1,59 * 10 ⁸			
b	$2,60*10^{2}$			
С	$-1,24*10^{-2}$			

Daten zu Abb. 3.20: Einfluss der Wachstumsphase von *H. uvarum* (DSM) zum Zeitpunkt der Fixierung auf die Hybridisierungseffizienz - Daten aus Masterthesis Christian Vogelei

YPD				
Wachstumsphase	Sonde	hyb. Zellen [%]	Standardabweichung	CV [%]
lag	Euk	7,41	1,64	22,13
lag	Huv	10,42	3,31	31,77
log	Euk	93,59	2,37	2,53
log	Huv	90,98	0,34	0,37
stationär	Euk	2,5	0,5	20,00
Stational	Huv	37,3	1,31	3,51

Most				
Wachstumsphase	Sonde	hyb. Zellen [%]	Standardabweichung	CV [%]
lag	Euk	49,04	1,51	3,08
lag	Huv	43,24	4,9	11,33
log	Euk	95,18	0,17	0,18
log	Huv	89,36	0,96	1,07
stationär	Euk	27,34	5,87	21,47
Stational	Huv	36,93	3,5	9,48

Daten zu Abb. 3.21: Wachstumskurven verschiedener *H. uvarum* Stämme in YPD-Flüssigkultur: exponentielle sigmoide und logistische Funktion $y = a*(1+b*exp(c*x))^{-1}$

H30				
Zeit [min]	Messwerte	Schätzwerte	Chi-Quadrate	Summe Chi-
	$[OD_{600}]$			Quadrate
30	0,081	0,046	0,001	0,854
90	0,128	0,093	0,001	
120	0,128	0,132	0,001	
150	0,161	0,187	0	
180	0,202	0,265	0,001	
240	0,446	0,524	0,004	
285	0,630	0,861	0,006	

H30				
Zeit [min]	Messwerte	Schätzwerte	Chi-Quadrate	Summe Chi-
	$[OD_{600}]$			Quadrate
340	1,507	1,534	0,053	
410	3,132	2,958	0,001	
440	4,175	3,771	0,030	
470	4,260	4,673	0,163	
500		5,617	0,171	
530		6,544		
560		7,403		
590		8,154		
620		8,779		
660		9,419		
700		9,868		
1475	11,222	10,716	0,256	
1530	10,313	10,716	0,162	
1620	10,630	10,716	0,007	
а	10,716			
b	329,659			
С	-0,012			

H32				
Zeit [min]	Messwerte	Schätzwerte	Chi-Quadrate	Summe Chi-
	$[OD_{600}]$			Quadrate
30	0,074	0,017	0,003	0,140
90	0,098	0,038	0,004	
120	0,120	0,058	0,004	
150	0,135	0,088	0,002	
180	0,175	0,132	0,002	
240	0,333	0,298	0,001	
285	0,521	0,542	0,000	
340	1,029	1,096	0,004	
410	2,507	2,463	0,002	
440	3,294	3,325	0,001	
470	4,339	4,324	0,000	
500		5,394		
530		6,447		
560		7,400		
590		8,201		
620		8,832		
660		9,432		
700		9,815		
1475	10,155	10,384	0,053	
1530	10,635	10,384	0,063	
1620	10,362	10,384	0,000	
а	10,384			
b	938,352			
С	-0,01			

H33				
Zeit [min]	Messwerte	Schätzwerte	Chi-Quadrate	Summe Chi-
	$[OD_{600}]$			Quadrate
30	0,073	0,007	0,004	1,587
90	0,100	0,017	0,007	
120	0,112	0,027	0,007	
150	0,137	0,044	0,009	
180	0,176	0,070	0,011	
240	0,335	0,175	0,025	
285	0,519	0,348	0,029	
340	0,900	0,786	0,013	
410	2,549	2,045	0,254	
440	2,006	2,931	0,856	
470	4,423	4,024	0,159	
500		5,251		
530		6,490		
560		7,616		
590		8,545		
620		9,252		
660		9,888		
700		10,266		
1475	10,939	10,741	0,039	
1530	10,912	10,741	0,029	
1620	10,362	10,741	0,144	
а	10,741			
b	2539,521			
С	-0,016			

H34				
Zeit [min]	Messwerte	Schätzwerte	Chi-Quadrate	Summe Chi-
	$[OD_{600}]$			Quadrate
30	0,081	0,027	0,003	0,094
90	0,108	0,059	0,002	
120	0,128	0,086	0,002	
150	0,151	0,127	0,001	
180	0,193	0,186	0,000	
240	0,380	0,397	0,000	
285	0,591	0,691	0,010	
340	1,403	1,321	0,007	
410	2,841	2,767	0,005	
440	3,491	3,633	0,020	
470	4,671	4,611	0,004	
500		5,639		
530		6,642		
560		7,553		
590		8,326		
620		8,947		
660		9,553		
700		9,954		
1475	10,685	10,608	0,006	
1530	10,695	10,608	0,008	
1620	10,444	10,608	0,027	
а	10,608			
b	579,627			
С	-0,013			

H35				
Zeit [min]	Messwerte	Schätzwerte	Chi-Quadrate	Summe Chi-
	$[OD_{600}]$			Quadrate
30	0,070	0,020	0,003	0,972
90	0,093	0,045	0,002	
120	0,114	0,068	0,002	
150	0,135	0,101	0,001	
180	0,167	0,150	0,000	
240	0,323	0,329	0,000	
285	0,499	0,586	0,007	
340	1,217	1,149	0,005	
410	2,439	2,477	0,001	
440	3,278	3,286	0,000	
470	4,226	4,203	0,001	
500		5,169		
530		6,106		
560		6,950		
590		7,657		
620		8,215		
660		8,751		
700		9,098		
1475	8,840	9,635	0,633	
1530	10,056	9,635	0,177	
1620	10,009	9,635	0,140	
а	9,635			
b	706,324			
С	-0,013			

Daten zu Abb. 3.22: Einfluss der Wachstumsphase von H. uvarum zum Zeitpunkt der Fixierung auf die Hybridisierungseffizienz in YPD-Medium

Wachstumszeit [min]	Zellen/ml in Fixierung	Standardabweichung	CV [%]
30	$3,24*10^{6}$	1, 43 * 10 ⁴	0,44
180	$1,32*10^7$	$2,47*10^5$	1,87
330	$5,42*10^7$	1, 49 * 10 ⁵	0,27
420	4, 27 * 10 ⁸	2, 00 * 10 ⁶	0,47
1440	8, 92 * 10 ⁸	9, 48 * 10 ⁵	0,11

Wachstumszeit [min]	Sonde	hyb. Zellen [%]	Standardabweichung	CV [%]
20	Euk	35,49	6,57	18,52
30	Huv	36,69	5,89	16,07
180	Euk	77,31	2,74	3,54
100	Huv	44,99	2,29	5,09
330	Euk	83,25	1,41	1,69
330	Huv	63,19	11,79	18,66
420	Euk	86,19	1,29	1,50
420	Huv	68,54	4,43	6,47
1440	Euk	15,42	2,44	15,82
1440	Huv	39,16	2,82	7,19

A.1.5.2. Wachstumsverlauf von *S. cerevisiae*

Daten zu Abb. 3.23: Wachstumskurven von S. cerevisiae (DSM) in YPD-Flüssigkultur: exponentielle sigmoide und logistische Funktion $y = a*(1+b*exp(c*x))^{-1}$

Sce DSM				
Zeit [min]	Messwerte	Schätzwerte	Chi-Quadrate	Summe Chi-
	$[OD_{600}]$			Quadrate
1080	0,24	0,07	0,03	2,05
1135	0,38	0,15	0,05	
1175	0,46	0,24	0,05	
1245	0,87	0,56	0,10	
1300	1,38	1,06	0,10	
1360	2,27	2,03	0,06	
1410	2,98	3,25	0,07	
1465	4,64	4,94	0,09	
1520	6,27	6,67	0,16	
1600	9,50	8,57	0,87	
1750	10,00	9,95	0,00	
1900	10,00	10,20	0,04	
2050	10,00	10,23	0,05	
2200	10,00	10,24	0,06	
2350	10,00	10,24	0,06	
2400	10,00	10,24	0,06	
2500	10,00	10,24	0,06	
2570	10,31	10,24	0,01	
2665	10,66	10,24	0,18	
2750	10,69	10,24	0,20	
а	10,241			
b	1, 18 * 10 ⁸			
С	-0,013			

A.1.5.3. Effekt der Hilfssonden auf den Nachweis der Hefen in verschiedenen Wachstumsphasen

Daten zu Abb. 3.24: Effekt der Hilfssonden im Verlauf des Kulturwachstums in YPD bei *H. uvarum* (Stdabw. = Standardabweichung; hyb. Z. = hybridisierte Zellen; norm. M. = normierter Median)

Wachstums-	Sonde	hyb. Z.	Stdabw.	CV [%]	norm.	Stdabw.
phase		[%]			M. [%]	
	Euk	3,40	2,38	70,07	93,33	5,44
30min (lag)	Huv	3,72	4,10	110,35	100,00	9,43
	Huv + H1 +H2L	31,45	1,47	4,68	153,33	5,44
180min	Euk	67,65	2,75	4,07	146,69	11,29
	Huv	60,34	0,64	1,06	100,00	2,40
(frühe log)	Huv + H1 +H2L	78,88	0,27	0,34	243,58	2,40
330min	Euk	86,23	1,14	1,33	135,91	3,32
(mid-log)	Huv	81,28	1,14	1,40	100,00	2,38
(mid-log)	Huv + H1 +H2L	89,95	1,65	1,84	205,41	5,54
420min	Euk	71,14	0,82	1,15	146,86	2,14
	Huv	63,08	0,83	1,31	100,00	2,14
(späte log)	Huv + H1 +H2L	85,06	1,41	1,65	240,57	3,52
24h	Euk	49,76	5,80	11,65	100,00	16,58
	Huv	55,02	9,29	16,89	100,00	16,58
(stationär)	Huv + H1 +H2L	79,73	0,48	0,60	235,26	1,58
7d	Euk	72,74	8,02	11,02	144,09	45,34
	Huv	62,46	15,67	25,09	100,00	39,33
(stationär)	Huv + H1 +H2L	76,53	1,83	2,39	166,67	4,02

Daten zu Abb.3.25: Effekt der Hilfssonden im Verlauf des Kulturwachstums bei *P. anomala*

Wachstumsphase	Sonde	hyb. Zellen [%]	Standardabweichung	CV [%]
OD 0,1 (lag)	Euk	86,13	0,86	1,00
OD 0,1 (lag)	PanH12	76,52	0,33	0,43
OD 0,4 (frühe log)	Euk	88,89	2,09	2,35
OD 0,4 (fruite log)	PanH12	85,77	2,09	2,43
OD 1,0 (mid-log)	Euk	90,70	0,16	0,18
OD 1,0 (IIIId-log)	PanH12	87,46	0,10	0,11
OD 4,0 (späte log)	Euk	87,92	0,61	0,69
OD 4,0 (Spale log)	PanH12	81,26	3,00	3,69
OD10 (stationär)	Euk	71,87	2,72	3,79
ODTO (Stational)	PanH12	71,30	2,39	3,35

Daten zu Daten zu Abb. 3.26: Effekt der Hilfssonden im Verlauf des Kulturwachstums bei *D. bruxellensis* (Stdabw. = Standardabweichung)

Wachstumphase	Sonde	hyb. Zellen [%]	Stdabw.	CV [%]
OD 0,1 (lag)	Euk	73,74	0,82	1,11
OD 0,1 (lag)	Dbrux + Hilfssonden	89,45	2,90	3,24
OD 0,4 (frühe log)	Euk	57,24	0,49	0,86
OD 0,4 (fruite log)	Dbrux + Hilfssonden	85,15	1,31	1,54
OD 1,0 (mid-log)	Euk	82,70	1,09	1,32
OD 1,0 (IIIId-log)	Dbrux + Hilfssonden	93,87	0,30	0,32
OD 4,0 (späte log)	Euk	86,71	3,96	4,57
OD 4,0 (Spale log)	Dbrux + Hilfssonden	94,30	1,64	1,74
OD 10 (stationär)	Euk	81,16	2,56	3,15
OD TO (Stational)	Dbrux + Hilfssonden	94,86	0,42	0,44

A.1.6. Fremdsonden / Kreuzreaktivität

Daten zu Abb. 3.27: *H. uvarum* hybridisiert mit spezifischen und unspezifischen Sonden:

Sonde	hyb. Zellen [%]	Standardabweichung	CV [%]
Euk	83,04	0,82	0,98
HuvH12L	88,39	0,47	0,53
SceH12	0,72	0,00	0,00
Dbrux 1.1 und Dbrux 1.2 + H	41,07	4,24	10,33
PanH12	0,00	0,47	-

Daten zu Abb. 3.28: *S. cerevisiae* hybridisiert mit spezifischen und unspezifischen Sonden

Sonde	hyb. Zellen [%]	Standardabweichung	CV [%]
Euk	94,19	0,55	0,58
HuvH12L	45,42	1,90	4,18
SceH12	85,05	2,28	2,67
Dbrux 1.1 und Dbrux 1.2 + H	67,95	1,41	2,08
PanH12	0,71	1,00	141,42

A.1.7. Mindestzellzahl für einen erfolgreichen FISH-Assay

A.1.7.1. Mindestzellzahl H. uvarum

Daten zu Abb. 3.31: Hybridisierte $\it H.~uvarum$ -Zellen in verschiedenen Verdünnungen ausgehend von der üblicherweise verwendeten Zellzahl von $2*10^6$ Zellen pro Ansatzgefäss

Zellzahl im Ansatz	Sonde	hyb. Zellen [%]	Standardabweichung	CV [%]
2 * 10 ⁶ (100%)	Euk	72,20	0,84	1,16
2 * 10 (100%)	HuvH12L	83,56	0,42	0,51
2 * 10 ⁵ (10%)	Euk	62,80	8,49	13,53
2 * 10 (10 %)	HuvH12L	78,95	0,29	0,37
1 * 10 ⁵ (5%)	Euk	87,63	1,70	1,94
1 * 10°(5%)	HuvH12L	91,44	0,34	0,37
5 * 10 ⁴ (2,5%)	Euk	79,63	0,18	0,23
3 * 10 (2,3 %)	HuvH12L	80,53	3,23	4,01
2 * 10 ⁴ (1%)	Euk	68,05	1,99	2,93
2 * 10 (1/6)	HuvH12L	70,22	4,99	7,11
2 * 10 ³ (0,1%)	Euk	20,80	6,90	33,11
2 * 10 (0,176)	HuvH12L	22,03	2,48	11,23

A.1.7.2. Mindestzellzahl S. cerevisiae

Daten zu Abb. 3.32: Hybridisierte *S. cerevisiae*-Zellen in verschiedenen Verdünnungen ausgehend von der üblicherweise verwendeten Zellzahl von $2*10^6$ Zellen pro Ansatzgefäss

Zellzahl im Ansatz	Sonde	hyb. Zellen [%]	Standardabweichung	CV [%]
2 * 10 ⁶ (100%)	Euk	90,38	0,15	0,16
2 * 10 ⁶ (100%)	SceH12	94,60	0,24	0,26
2 * 10 ⁵ (10%)	SceH12	65,34	6,15	9,41
5 * 10 ⁴ (2,5%)	SceH12	61,84	2,02	3,27
2 * 10 ⁴ (1%)	SceH12	45,36	2,61	5,75

A.1.8. FISH in Mischungen

Daten zu Abb. 3.33 und Abb. 3.34: Hybridisierte Zellen in verschiedenen Mischungen aus H. uvarum und S. cerevisiae bei Verwendung von $2*10^6$ Zellen je Ansatzgefäss und der Sondenkombination HuvH1H2L

Mischungsverhältnis	hyb. Zellen [%]	Standardabweichung	CV [%]
100% Huv, 0% Sce	79,19	0,73	0,93
75% Huv, 25% Sce	63,11	1,56	2,47
50% Huv, 50% Sce	60,60	2,04	3,36
25% Huv, 75% Sce	23,68	1,94	8,18
10% Huv, 90% Sce	25,66	1,82	7,10
0% Huv, 100% Sce	0,38	0,08	21,16

Daten zu Abb. 3.36 und Abb. 3.37: Hybridisierte Zellen in verschiedenen Mischungen aus H. uvarum und S. cerevisiae bei Verwendung von $2*10^4$ Zellen je Ansatzgefäss und der Sondenkombination HuvH1H2L

Mischungsverhältnis	hyb. Zellen [%]	Standardabweichung	CV [%]
100% Huv, 0% Sce	67,99	2,38	3,50
75% Huv, 25% Sce	50,02	4,36	8,71
50% Huv, 50% Sce	41,95	1,20	2,85
25% Huv, 75% Sce	27,18	2,00	7,37
10% Huv, 90% Sce	13,49	1,50	11,10

Daten zu Abb. 3.38: Hybridisierte Zellen in verschiedenen Mischungen aus *H. uvarum, S. cerevisiae* und *P. anomala* (hyb. Z. = hybridisierte Zellen; Stdabw. = Standardabweichung)

Mischung	Sonde	hyb. Z. [%]	Stdabw.	CV [%]	Median	Stdabw.
33% Huv;	HuvH12L	64,01	1,20	1,88	23,00	0,82
33% Sce;	PanH12	27,47	5,49	19,98	9,33	0,94
33% Pan	SceH12	30,80	0,67	2,18	8,67	0,47
50% Huv;	HuvH12L	70,40	3,62	5,14	24,00	2,45
0% Sce;	PanH12	37,95	3,78	9,95	9,67	0,47
50% Pan	SceH12	3,56	2,17	60,87	8,00	0

A.1.9. FISH mit verschiedenen Hefestämmen

Daten zu Abb. 3.39: Verschiedene Stämme von *H. uvarum* und ihre Hybridisierbarkeit mittels FISH

Hefestamm	Sonde	hyb. Zellen [%]	Standardabweichung	CV [%]
H30 (DSM)	Euk	78,02	2,56	3,28
H30 (D3NI)	HuvH12L	89,21	0,29	0,32
H32	Euk	25,60	2,66	10,38
1102	HuvH12L	62,01	2,76	4,46
H33	Euk	35,02	2,77	7,92
Поо	HuvH12L	78,10	2,02	2,59
H30 (DSM)	Euk	91,52	0,41	0,45
H30 (D3NI)	HuvH12L	94,74	0,42	0,44
H34	Euk	77,19	3,90	5,05
П34	HuvH12L	90,54	0,72	0,80
H35	Euk	67,35	9,01	13,39
1100	HuvH12L	89,91	2,34	2,60

Daten zu Abb. 3.40: Verschiedene Stämme von *S. cerevisiae* und ihre Hybridisierbarkeit mittels FISH (Stdabw. = Standardabweichung)

Hefestamm	Sonde	hyb. Zellen [%]	Stdabw.	CV [%]
DSM 70416	SceH12	93,11	0,68	0,73
CY3079	SceH12	93,64	1,11	1,18
VB1	SceH12	80,70	4,23	5,25
DSM 70416	SceH12	88,69	5,27	5,94
Schwarzenbach 1895-A	SceH12	94,60	1,49	1,58
Uvaferm 228	SceH12	92,90	2,41	2,59
EC1118	SceH12	91,79	3,37	3,67

A.1.10. Praxisproben

Daten zu Abb. 3.41 und Abb. 3.46: Proben aus Spontangärungen 1. Variante; h.Z. = hybridisierte Zellen, Stdabw. = Standardabweichung

	Euk				HuvH12L	
Gärtag	h. Z. [%]	Stdabw.	CV [%]	h. Z. [%]	Stdabw.	CV [%]
2						
4						
6	58,86	1,74	2,96	65,11	1,17	1,79
7						
8						
9	49,02	6,88	14,03	19,59	2,38	12,15
13	66,20	17,45	26,36	0,08	0,09	122,98
16	33,96	0,44	1,28	1,79	0,55	30,59
17						
20	23,70	0,54	2,28	0,01	0,00	0,00

		SceH12			
Gärtag	h. Z. [%]	Stdabw.	CV [%]	[Zellen/ml]	Alkohol [g/l]
2					0,06
4					0,56
6	2,51	2,58	102,93	$1,00*10^{7}$	
7					0,52
8					1,29
9	70,71	1,85	2,62	$2,57*10^{8}$	
13	17,68	2,99	16,90	1,51 * 10 ⁸	
16	41,38	1,70	4,11	$1,29*10^{8}$	11,14
17					11,16
20	34,34	8,53	24,84	$5,29*10^7$	11,86

Daten zu Abb. 3.42 und Abb. 3.46: Proben aus Spontangärungen 2. Variante; h.Z. = hybridisierte Zellen, Stdabw. = Standardabweichung

	Euk			Euk HuvH12L			
Gärtag	h. Z. [%]	Stdabw.	CV [%]	h. Z. [%]	Stdabw.	CV [%]	
1	20,87	6,61	31,67	6,24	0,56	8,97	
3							
5	53,84	2,68	4,97	60,33	0,66	1,10	
6							
8	66,63	0,73	1,10	21,43	6,23	29,06	
12	30,91	0,01	0,03	0,02	0,00	28,28	
15	25,71	0,06	0,23	1,77	0,80	45,29	
16							
19	45,58	1,20	2,63	0,11	0,06	55,96	
22	23,72	2,97	12,52	2,34	2,88	123,05	
34							

		SceH12			
Gärtag	h. Z. [%]	Stdabw.	CV [%]	[Zellen/ml]	Alkohol [g/l]
1	0,70	0,64	91,43	$3,11*10^{5}$	0,01
3					0,09
5	1,24	1,18	95,14	$2,25*10^5$	0,06
6					0,00
8	66,44	0,44	0,66	$7,87*10^{6}$	
12	46,19	2,51	5,43	1,22 * 10 ⁸	
15	30,58	1,49	4,88	1,03 * 10 ⁸	11,23
16					11,66
19	39,72	4,97	12,52	$4,20*10^7$	
22	51,02	2,40	4,71	$5,81*10^{7}$	
34				_	12,35

Daten zu Abb. 3.43 und Abb. 3.46: Proben aus Spontangärungen 3. Variante; h.Z. = hybridisierte Zellen, Stdabw. = Standardabweichung

	Euk			HuvH12L		
Gärtag	h. Z. [%]	Stdabw.	CV [%]	h. Z. [%]	Stdabw.	CV [%]
0						
2						
4	64,83	4,54	7,00	71,60	0,23	0,32
7	27,98	1,86	6,65	28,36	0,43	1,53
12	49,14	4,72	9,61	0,00	0,00	
14						
15	34,72	7,32	21,08	1,07	0,72	67,10
19	62,86	0,18	0,29	13,42	1,32	9,80
22	27,75	5,50	19,81	0,11	0,10	87,51
25						
26						

		SceH12			
Gärtag	h. Z. [%]	Stdabw.	CV [%]	[Zellen/ml]	Alkohol [g/l]
0					0,42
2					0,45
4	5,66	0,81	14,24	$1,99*10^{5}$	
7	9,45	0,63	6,70	$1,57*10^7$	
12	59,12	1,31	2,21	$9,75*10^7$	
14					9,71
15	50,04	0,33	0,66	$7,07*10^7$	9,32
19	56,62	0,82	1,45	$7,37*10^7$	
22	28,51	6,48	22,73	$6,16*10^7$	
25					11,30
26					11,45

Daten zu Abb. 3.44 und Abb. 3.46: Proben aus Spontangärungen 4. Variante; h.Z. = hybridisierte Zellen, Stdabw. = Standardabweichung

	Euk			HuvH12L		
Gärtag	h. Z. [%]	Stdabw.	CV [%]	h. Z. [%]	Stdabw.	CV [%]
1						
3	46,41	1,69	3,65	54,59	4,42	8,10
6	17,36	2,70	15,55	27,14	1,20	4,43
10	20,90	0,50	2,42	15,17	10,28	67,73
13	24,22	13,31	54,95	5,95	4,09	68,75
14						
17	58,33	0,36	0,63	4,03	1,02	25,37
19						
20	34,19	4,91	14,36	3,03	3,52	116,17
24	24,00	2,03	8,44	0,31	0,06	17,74
26						
27	11,13	0,04	0,36	0,11	0,10	89,70
31	48,09	1,91	3,96	8,80	2,97	33,70
34	49,34	0,81	1,64	0,27	0,01	3,02
38	65,11	3,49	5,36	0,27	0,10	36,66
41	50,75	1,59	3,12	0,16	0,21	136,93
45	33,23	0,76	2,29	0,00	0,00	
48						

Gärtag	h. Z. [%]	Stdabw.	CV [%]	[Zellen/ml]	Alkohol [g/l]
		SceH12			
1					0,44
3	4,99	0,99	19,84	$5,88*10^{5}$	
6	7,44	2,61	35,06	6, 19 * 10 ⁶	0,39
10	46,32	0,54	1,16	$9,55*10^{7}$	
13	72,07	4,49	6,22	$7,74*10^7$	5,26
14					7,84
17	44,02	1,22	2,78	$5,94*10^7$	
19					9,05
20	68,88	3,63	5,27	$5,95*10^7$	

Gärtag	h. Z. [%]	Stdabw.	CV [%]	[Zellen/ml]	Alkohol [g/l]
24	68,91	1,66	2,41	$7,94*10^7$	9,32
26					9,42
27	49,56	12,48	25,18	$5,35*10^7$	
31	68,13	12,50	18,35	$6,76*10^7$	9,68
34	71,12	5,75	8,09	$3,54*10^7$	
38	79,23	2,31	2,92	$3,68*10^{7}$	
41	59,68	8,62	14,44	$1,22*10^8$	10,34
45	56,29	8,29	14,72	$4,95*10^{7}$	11,07
48					11,52

Daten zu Abb. 3.45 und Abb. 3.46: Proben aus Spontangärungen 5. Variante; h.Z. = hybridisierte Zellen, Stdabw. = Standardabweichung

	Euk			HuvH12L		
Gärtag	h. Z. [%]	Stdabw.	CV [%]	h. Z. [%]	Stdabw.	CV [%]
8	0,17	0,04	23,53	0,01	0,00	35,36
12						
13						
14						
15						
18	7,65	2,78	36,30	0,01	0,00	70,71
20						
21	3,95	1,61	40,68	0,66	0,53	79,94
25	34,51	1,07	3,09	14,95	3,12	20,85
28	30,53	7,37	24,14	0,08	0,01	16,27
32	19,58	1,67	8,53	0,61	0,72	118,61
35	26,87	1,15	4,26	0,31	0,22	71,31
39	23,74	0,55	2,32	4,10	3,96	96,44
41						
42						

		SceH12			
Gärtag	h. Z. [%]	Stdabw.	CV [%]	[Zellen/ml]	Alkohol [g/l]
8	0,42	0,24	56,44		0,18
12					0,58
13					1,48
14					0,35
15					1,02
18	5,96	0,81	13,65	$8,52*10^7$	
20					5,73
21	9,55	0,67	6,97	$5,50*10^{7}$	
25	39,06	7,85	20,11	$4,11*10^7$	7,71
28	48,37	4,22	8,72	$1,82*10^{7}$	
32	41,30	2,14	5,17	$1,75*10^{7}$	
35	53,60	4,65	8,68	$3,64*10^{7}$	9,28
39	44,13	2,57	5,82	$1,26*10^7$	9,86
41					9,60
42					10,17

Daten zu Abb. 3.47: Proben aus mit *S. cerevisiae* angeimpften Fermentationen aus dem Staatsweingut; Tank 16 Riesling

Gärtag	Sonde	hyb. Zellen [%]	Standardabweichung	CV [%]
0 (Most)	Euk	10,42	5,34	51,22
U (IVIOSI)	SceH12	0,37	0,10	26,03
	Euk	75,25	7,60	10,09
4 (~60°Oe)	SceH12	83,62	0,67	0,80
4 (~60 0e)	HuvH12L	25,83	3,68	14,24
	PanH12	0,00	0,00	
	Euk	46,64	0,81	1,74
7 (38℃e)	SceH12	72,28	0,82	1,14
	HuvH12L	1,82	0,37	20,22
	PanH12	0,00	0,00	

Daten zu Abb. 3.48: Proben aus mit *S. cerevisiae* angeimpften Fermentationen aus dem Staatsweingut; Tank 71 Silvaner

Gärtag	Sonde	hyb. Zellen [%]	Standardabweichung	CV [%]
	Euk	60,96	3,25	5,33
4	SceH12	87,32	2,15	2,46
4	HuvH12L	3,43	1,37	39,81
	PanH12	0,39	0,55	141,42
	Euk	41,40	0,08	0,21
7 (28°Oe)	SceH12	51,28	0,33	0,64
7 (26 Oe)	HuvH12L	0,58	0,44	75,51
	PanH12	2,41	2,27	94,38

Daten zu Abb. 3.49: Proben aus 1. Spontanfermentation aus Geisenheim nach Fixierung in 70 %igem Ethanol (Stdabw. = Standardabweichung)

Gärtag	Sonde	hyb. Zellen [%]	Stdabw.	CV [%]
	Euk	0,07	0,04	53,85
	HuvH12L	3,59	1,83	51,06
0	SceH12	7,09	0,60	8,46
	Dbrux 1.1 + Dbrux 1.2 +H	2,36	3,00	127,29
	PanH12	5,71	2,88	50,49
	Euk	7,09	0,56	7,83
	HuvH12L	6,73	2,25	33,43
6	SceH12	10,38	0,99	9,56
	Dbrux 1.1 + Dbrux 1.2 +H	7,64	1,49	19,50
	PanH12	8,61	2,02	23,51
	Euk	55,37	0,70	1,26
	HuvH12L	7,46	7,59	101,77
8	SceH12	61,09	1,28	2,09
	Dbrux 1.1 + Dbrux 1.2 +H	1,06	0,81	76,18
	PanH12	1,82	2,54	139,10
	Euk	11,58	1,01	8,72
	HuvH12L	7,04	2,62	37,25
15	SceH12	4,08	2,56	62,76
	Dbrux 1.1 + Dbrux 1.2 +H	15,61	1,85	11,85
	PanH12	9,24	1,69	18,29

Daten zu Abb. 3.50: Proben aus 2. Spontanfermentation aus Geisenheim nach Fixierung in 70 %igem Ethanol (Stdabw. = Standardabweichung)

Gärtag	Sonde	hyb. Zellen [%]	Stdabw.	CV [%]
	Euk	1,64	1,18	71,95
	HuvH12L	0,09	0,03	32,71
0	SceH12	5,81	1,22	21,07
	Dbrux 1.1 + Dbrux 1.2 +H	11,04	12,41	112,43
	PanH12	2,64	1,99	75,25
	Euk	4,19	1,94	46,24
	HuvH12L	4,40	1,28	29,03
6	SceH12	0,55	0,57	104,17
	Dbrux 1.1 + Dbrux 1.2 +H	0,04	0,01	34,02
	PanH12	10,90	3,21	29,41
8	Euk	42,90	5,50	12,81
	HuvH12L	6,23	3,47	55,62
	SceH12	56,89	1,34	2,35
	Dbrux 1.1 + Dbrux 1.2 +H	3,21	2,79	86,78
	PanH12	2,54	1,95	76,82
	Euk	93,89	5,59	5,95
15	HuvH12L	26,42	3,05	11,54
	SceH12	36,26	6,69	18,44
	Dbrux 1.1 + Dbrux 1.2 +H	65,79	8,09	12,30
	PanH12	9,28	1,99	21,49