



Hefecharakterisierung und -identifizierung

Angelika VIVIANI-NAUER, Petra HOFFMANN-BOLLER und Jürg GAFNER, Eidgenössische Forschungsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau (FAW), CH-8820 Wädenswil

Während zwei Jahren charakterisierten wir die Hefepopulation im Rebberg und auf Trauben. Die Kenntnis über die Zusammensetzung der Mikroflora ermöglicht es, eine veränderte Mikroorganismenpopulation frühzeitig zu erkennen. Somit kann rechtzeitig eingegriffen werden, wenn mikrobielle Schädlinge während der Vegetationsperiode oder während der Weinbereitung auftreten.

Mikroorganismen, wie zum Beispiel die Hefen, spielen in der landwirtschaftlichen Produktion eine wichtige Rolle. Bekannt sind vor allem die Schadorganismen sowie einige Nützlinge. Die grosse Mehrheit der Mikroorganismen ist für uns indifferent, wird daher selten analysiert und ist entsprechend wenig bekannt. Dabei wäre es wichtig, die Gesamtheit aller Mikroorganismen zu kennen, weil ein Verschieben des jeweiligen Mikroorganismengleichgewichts das Auftreten von Krankheiten oder von Fehlprozessen bedingen kann. Ein weiterer Grund, die autochthone¹ Mikroflora zu identifizieren, ist die Tendenz, dass sogenannte Nützlinge (*Fusarium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*) in Zukunft im grossen Massstab gegen Schädlinge eingesetzt werden sollen. Was diese Nützlinge im positiven wie im negativen Sinne bewirken, kann letztlich nur geklärt werden, wenn die gesamte Mikroflora vor und nach der Behandlung beobachtet wird. Der Grund, dass wir in unserem Ökologiedenken den Sprung in den Mikroorganismenbereich noch nicht geschafft haben, liegt darin, dass die klassischen, mikrobiologischen Nachweismethoden sehr zeitaufwendig sind und nicht immer zu eindeutigen Resultaten führen. Erst das Aufkommen der molekulargenetischen Methoden zur sicheren und seriellen Erfassung von Mikroorganismen lässt uns diesem Ziel näher kommen. Dieser Artikel beschreibt die Charakterisierung der Hefeflora im Rebberg und auf den Trauben.

Wie können Mikroorganismen analysiert werden?

Zur Charakterisierung von Mikroorganismen müssen bestimmte Methoden mit de-

finierten Kriterien angewandt werden. Zur Identifikation muss ein Organismus charakterisiert und mit einem Referenzstamm verglichen werden. Charakterisierungsmethoden für Hefen gibt es unzählige. Weltweit zu Identifikationszwecken standardisiert sind aber bis heute nur die klassischen Tests, die auf morphologischen, biochemischen und physiologischen Kriterien beruhen (Dittrich 1987; Barnett *et al.* 1990). So hat allein das Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) in Delft gegen 7800 Hefen getestet. Diese können als Referenzstämme angefordert werden. Das Anwenden der klassischen Methoden ist sehr zeitintensiv, und die Resultate sind oft schwer zu interpretieren, so dass ein serienmässiges Screening nicht möglich ist. Für serielle, reproduzierbare Analysen bieten sich die molekulargenetischen Methoden an, die weniger Zeit beanspruchen als die klassischen Tests und eindeutige Resultate liefern (Tab. 1). Einziges Problem bei der

Anwendung dieser Techniken ist das Fehlen von Referenzdaten.

Geeignet für die Charakterisierung und Identifizierung von Mikroorganismen ist die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR: Polymerase Chain Reaction), da innerhalb eines Tages Daten erhältlich sind, die auf die Art eines Organismus schliessen lassen. Mit der PCR-Methode wird ein bestimmter Abschnitt (Sequenz) der gesamten Erbinformation (Genom) untersucht. Eine zweite molekulargenetische Analysenmethode, das Karyotyping, ist etwas zeitaufwendiger als PCR, aber schneller und viel präziser als die klassischen Tests. Bei dieser Methode wird die gesamte Erbmasse betrachtet. Anzahl und Länge der Chromosomen geben Auskunft über die Art und Unterart (Stamm) eines Organismus.

Gattung - Art - Unterart

Alle lebenden Organismen werden, sobald sie entdeckt sind, charakterisiert, systematisch erfasst und taxonomisch eingeordnet, um Grundlagen zur Identifizierung weiterer Organismen zu erhalten. Die systematische Einteilung der Hefen erfolgte bisher durch klassische Tests, basierend auf morphologischen, biochemischen und physio-

Tab. 1. Vergleich der drei verschiedenen Analysemethoden, die zur Charakterisierung und Identifizierung von Hefen angewandt wurden

	Klassische Tests	PCR	Karyotyping
Unterscheidungsmerkmale	Morphologie, Biochemie, Physiologie	spezifische Genomsequenz	Gesamtgenom
Analysedauer	2 bis mehrere Wochen	1 bis 2 Tage	3 bis 6 Tage
Reproduzierbarkeit	unbefriedigend	sehr gut	sehr gut
Standardisierte Methode	ja	nein	ja ¹⁾ /nein
Hefereferenzstämme	ca. 7800 ²⁾	keine ³⁾	unter 10
Erfassbare Taxonomiestufe	Art, selten Unterart	Art, selten Unterart	Unterart

PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

1) Als Chromosomengrössen-Standards sind Gesamt-DNAs von einigen definierten Hefestämmen kommerziell erhältlich.

2) 7800 bezieht sich nur auf die Hefestammensammlung des Centraalbureaus voor Schimmelcultures in Delft.

3) PCR-Analysen werden sehr oft zur Charakterisierung von Hefen in der Literatur beschrieben, aber die Kriterien sind uneinheitlich.

¹ Im Boden heimische Mikroorganismen

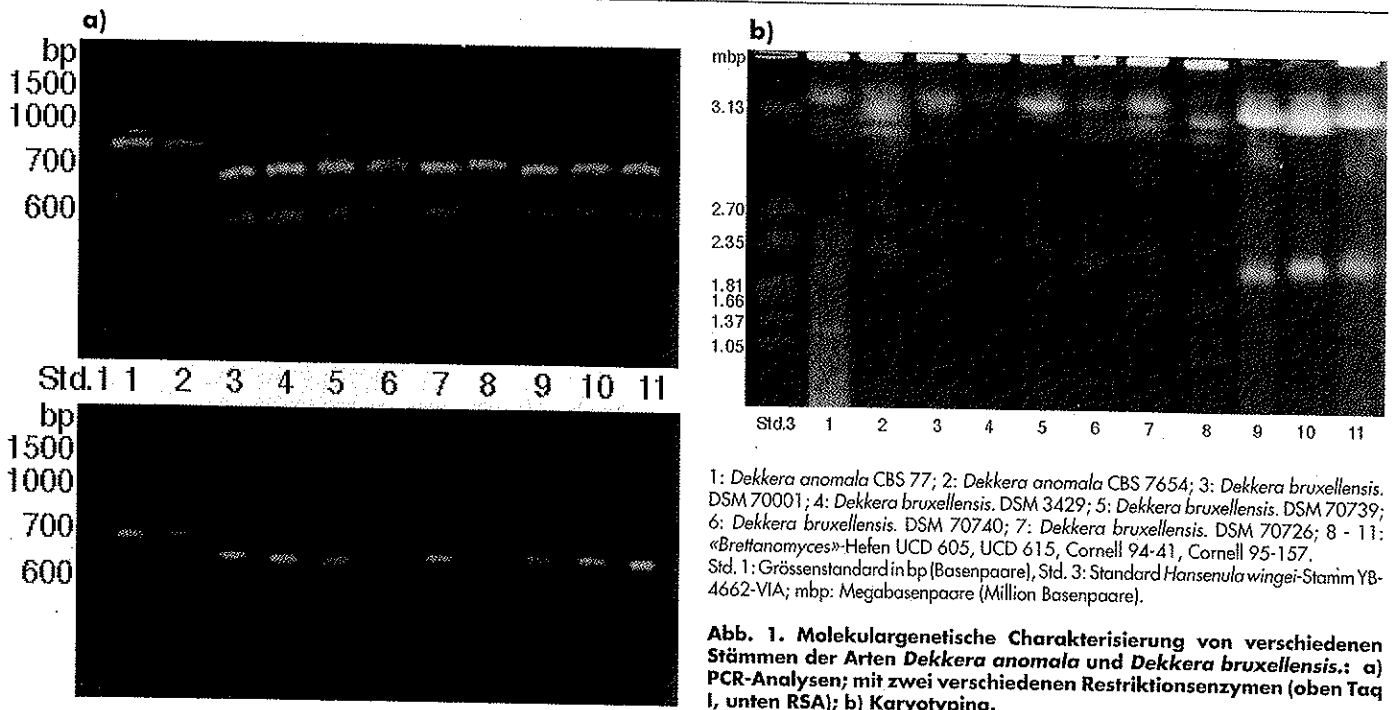


Abb. 1. Molekulargenetische Charakterisierung von verschiedenen Stämmen der Arten *Dekkera anomala* und *Dekkera bruxellensis*.: a) PCR-Analysen; mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen (oben Taq I, unten RSA); b) Karyotyping.

logischen Kriterien. Die Hefearten innerhalb einer taxonomischen Gruppe sollten sich so ähnlich sein, dass auch die molekulargenetischen Daten mit den klassischen Resultaten übereinstimmen: Mit der PCR-Methode werden ein oder mehrere artenspezifische Amplifikationsprodukte² erzeugt, welche als Banden auf einem Agarose-Gel sichtbar gemacht werden (Abb. 1a). Mit der klassischen und der PCR-Methode werden Arten - in einzelnen Fällen auch Unterarten (Stämme) - charakterisiert. Beim Karyotyping muss innerhalb einer Art die Anzahl Chromosomen konstant sein und deren Längen in einem definierten Bereich liegen (Abb. 1b). Damit lassen sich Stämme innerhalb einer Art bestimmen. Auf diese Weise wurden in den letzten Jahren an unserem Labor 60 verschiedene Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* charakterisiert (Schütz und Gafner 1994). Einige sind in Abbildung 2 zusammengestellt.

Klassische versus molekulargenetische Methoden

In Tabelle 1 wird gezeigt, dass es unzählige Referenzstämme gibt, die mittels klassischen Kriterien charakterisiert wurden. Für das Karyotyping können von definierten Hefestämmen Chromosomengrößenstandards kommerziell erworben werden. In der Literatur wird die PCR-Methode sehr oft zur Charakterisierung von Hefen ange-

führt (Lavallée *et al.* 1994; Grando *et al.* 1994; Tisserat *et al.* 1994). Die Daten können aber oft nicht miteinander verglichen werden, weil die amplifizierten, spezifischen Genomsequenzen nicht übereinstimmen. Die Vorteile der molekulargenetischen Techniken bezüglich Reproduzierbarkeit der Daten und Zeitgewinn sind jedoch so gross, dass wir diese Methoden zur Untersuchung der gesamten, autochthonen Hefeflora im Rebberg und auf den Trauben den klassischen Tests vorzogen. Dabei wurde folgendes Vorgehen gewählt:

- verschiedene Referenzstämme molekulargenetisch analysieren und miteinander vergleichen;
- die im Rebberg und auf den Trauben gesammelten Hefen klassisch und molekulargenetisch charakterisieren und mit Referenzstämmen vergleichen;
- Beispiel aus der Praxis: *Brettanomyces*.

Referenzstämme: Mit physiologischen Tests wurde die Vielfalt der Hefen grob umrissen. Häufigste Artvertreter waren *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Rhodotorula glutinis* und *Candida stellata*. Daneben wurden oft *Pichia kluyveri*, *Torulaspora delbrueckii* und verschiedene Arten der Gattung *Candida* isoliert. Von diesen sowie einigen andern Arten wurden Referenzstämme aus den etablierten Hefestammsammlungen des Centraalbureaus voor Schimmelcultures (CBS) in Delft und der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig angefordert.

Anhand der molekulargenetischen Analyse der Referenzstämme konnte gezeigt werden, dass beim Karyotyping die Chromosomenlängen der Hefen der Gattungen *Hanseniaspora* (Abb. 3), *Zygosaccharomyces* (Abb. 4) und *Debaryomyces* sich innerhalb der erwarteten Grössenordnung bewegten. Bei der Gattung *Candida* sind *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii* und *Candida zeylanoides* aufgrund der chromosomalen Analyse mit Chromosomenlängen zwischen 1 und 2 Megabasen verwandt, während sich *Candida sake* dadurch von den andern unterscheidet, dass das grösste Chromosom 3,2 Megabasen lang ist. Bei *Candida stellata* lag nur das kleinste Chromosom von 1,1 Megabasen im Bereich der andern *Candida*-Arten. Aufgrund der molekulargenetischen Analyse müsste diese Hefe bei einer taxonomischen Neuerfassung aus der *Candida*-Gattung ausgeschlossen werden.

Isolierte Hefen und Referenzstämme: Die Hefen, die wir aus dem Rebberg und von den Trauben isolierten, wurden anhand der physiologischen Tests grob erfasst und die Arten mit dem Computerprogramm bestimmt, welches das Centraalbureau voor Schimmelcultures auf dem Internet zur Verfügung stellt. Von diesen «klassisch» analysierten Hefen wurden zehn Einzelkolonien pro Hefearart molekulargenetisch überprüft. Bei den aufgrund der physiologischen Tests *Debaryomyces polymorpha*-Hefen zugeordneten Kolonien wiesen drei verschiedene Chromosomenmuster auf, obwohl die Resultate der 25 durchgeführten Tests übereinstimm-

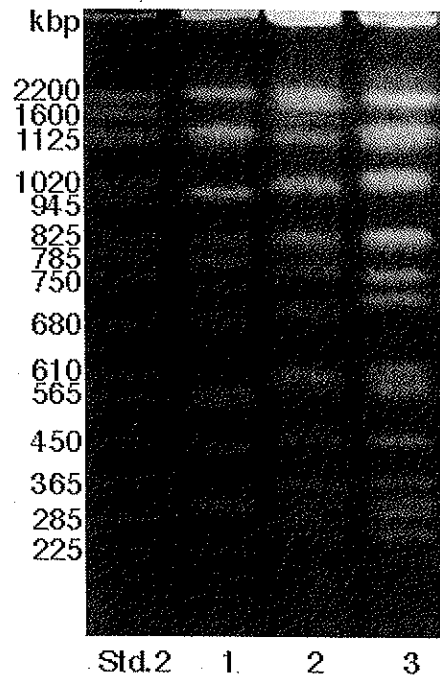
² Kopien bestimmter Abschnitte des Genoms

ten. Zwei wiesen ein ähnliches Chromosomenmuster wie die *Debaryomyces*-Referenzstämmen auf, waren aber untereinander verschieden. Die restlichen Kolonien erwiesen sich als nicht zu diesen *Debaryomyces*-Arten gehörig. Bei den mit klassischen Tests bestimmten *Zygosaccharomyces microellipsoides* stimmte kein einziges Chromosomenmuster der sieben molekulargenetisch analysierten Hefen mit jenen von den Referenzstämmen *Zygosaccharomyces microellipsoides* und *Zygosaccharomyces rouxii* überein (Abb. 4). Innerhalb der sieben Hefen scheinen zwei Arten vertreten zu sein, wovon von der einen Art zwei Stämme (Nr. 2 und 6) und von der andern vier Stämme (Nr. 3, 4, 5, 7, 8 und 9; 3 und 7 identisch) gefunden wurden. Diese Beispiele zeigen, dass physiologische Tests zur groben Beschreibung von Mikroorganismen nützlich sein können, aber auf keinen Fall zu einer Identifizierung genügen.

Brettanomyces: Der Name *Brettanomyces* bezeichnet für die Bier- und Weinfachleute Hefen, welche viel Essig produzieren und für einen nach Pferdeurin riechenden Fehlton verantwortlich gemacht werden. In der Mikrobiologie ist dieser Name veraltet, und die *Brettanomyces*-Hefen wurden neu folgenden Arten zugeordnet (Barnett *et al.* 1990; Molina *et al.* 1993):

Veraltete Bezeichnung	Neue Bezeichnung
<i>Brettanomyces italicus</i>	<i>Candida stellata</i>
<i>Brettanomyces anomalus</i>	<i>Dekkera anomala</i>
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>
<i>Brettanomyces lambicus</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>
<i>Brettanomyces intermedius</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>
<i>Brettanomyces vini</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>

Alle erwähnten *Brettanomyces*-Arten können im Wein vorkommen und sind sehr gefürchtet. Deshalb ist eine schnelle und sichere Identifizierung erwünscht. Mit klassischen Tests ist *Candida stellata* zufriedenstellend identifizierbar, hingegen sind die zwei *Dekkera*-Arten mit physiologischen Kriterien gemäss Barnett (1990) *et al.* nicht eindeutig differenzierbar. Mit Hilfe von PCR und Karyotyping wurden *Candida stellata* FAW 3, zwei Referenzstämmen von *Dekkera anomala* und vier Referenzstämmen von *Dekkera bruxellensis* miteinander verglichen. Parallel wurden vier aus Weinen isolierte *Brettanomyces*-Stämme untersucht, welche von der Cornell University in New York zur Verfügung gestellt wurden: UCD 605, UCD 615, Cornell 94-41 und Cornell 95-157. PCR-Analysen zeigten einen deutlichen Unterschied zwischen den Arten *Dekkera anomala* und



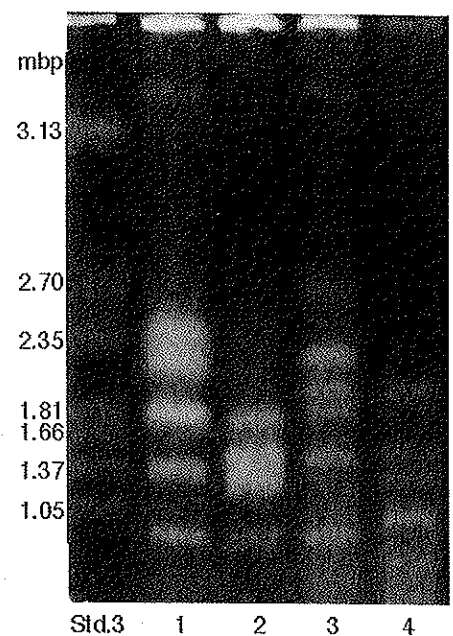
Std. 2: Standard *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm YNN-295; kbp: Kilobasenpaare (1000 bp).

Abb. 2. Typische Chromosomenmuster der Hefeart *Saccharomyces cerevisiae* (Karyotyping). Die Unterschiede in den Chromosomenlängen innerhalb von 225 bis 2200 kb lassen verschiedene Stämme erkennen.

Dekkera bruxellensis (Abb. 1a). UCD 615, Cornell 94-41 und Cornell 95-157 stimmten mit den Referenzstämmen von *Dekkera bruxellensis* überein, während die Bande des Amplifikationsproduktes UCD 605 sich deutlich von jenen der zwei Referenzstämmen unterschied. Dieses Resultat wurde mit Karyotyping bestätigt (Abb. 1b). Das Chromosomenmuster von UCD 605 ist deutlich verschieden von den Mustern der drei andern Hefen UCD 615, Cornell 94-41 und Cornell 95-157, welche einander so ähnlich sind, dass sie sicher alle zur gleichen Art gehören. UCD 605 weist auch Ähnlichkeit mit dem Referenzstamm DSM 3429 auf. Alle andern Referenzstämmen hingegen zeigen völlig andere und sehr verschiedene Chromosomenmuster. Vergleicht man die Chromosomenmuster der verschiedenen Referenzstämmen von *Dekkera anomala* und *Dekkera bruxellensis* miteinander, stellt man fest, dass diese sowohl bei der einen wie auch bei der andern Art vorkommen. Darum kann aufgrund des Karyotypings keine Aussage darüber gemacht werden, ob es sich wirklich um zwei verschiedene Arten handelt, wie das PCR-Resultat vermuten lässt.

Wie weiter?

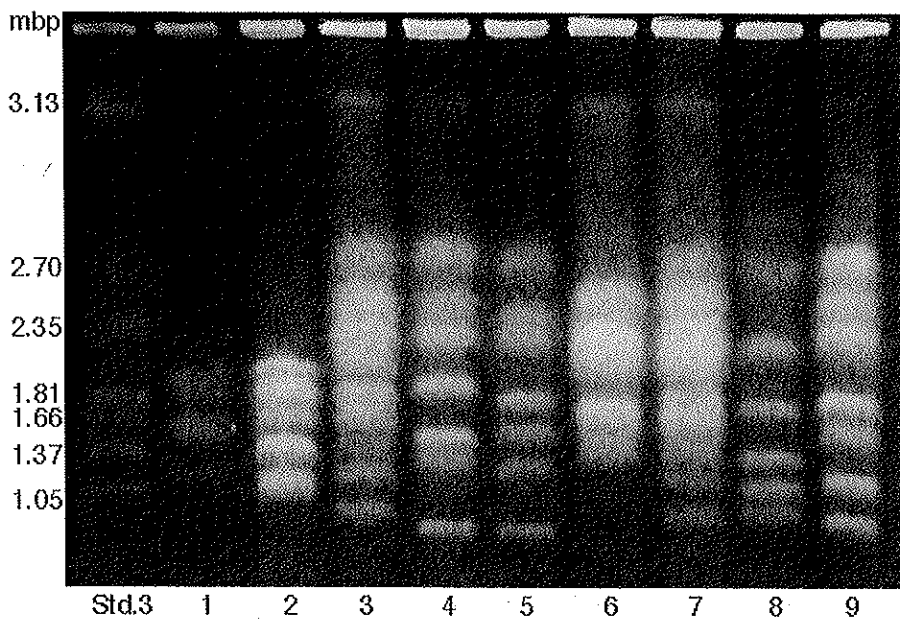
Viele Fragen werden aufgeworfen, wenn mit klassischen Methoden charakterisier-



1: *Hanseniaspora vineae*; 2: *Hanseniaspora osmophila*; 3: *Hanseniaspora occidentalis*; 4: *Hanseniaspora uvarum*. Std. 3: Standard *Hansenula wingei*-Stamm YB-4662-VIA; mbp: Megabasenpaare (Million Basenpaare).

Abb. 3. Chromosomenmuster von Vertretern der Hefegattung *Hanseniaspora* (Karyotyping). Alle vier *Hanseniaspora*-Arten unterscheiden sich deutlich durch ihre Chromosomenlängen.

te Hefen mit molekulargenetischen Analysen konfrontiert werden. Fest steht, dass die molekulargenetischen Methoden reproduzierbare Daten liefern, während die Resultate der klassischen Tests manchmal sehr schwer zu interpretieren sind. Sind PCR- und Karyotyping-Daten bei zwei Hefen unterschiedlich, dann handelt es sich auf jeden Fall um zwei verschiedene Individuen. Ob zwei verschiedene Stämme oder Arten vorliegen, kann in den meisten Fällen durch Karyotyping festgestellt werden. Stimmen bei zwei Hefen alle molekulargenetischen Tests überein, sind es sehr nahe verwandte Stämme, deren Genome sich nur durch einzelne, nicht erfasste Allele voneinander unterscheiden, oder sogar Klone, deren Erbmaterial identisch ist. Auf jeden Fall genügen diese Methoden, um Mikroorganismen systematisch zu erfassen und zu analysieren, sofern bereits Referenzdaten für den entsprechenden Organismus vorhanden sind. Entsprechend sollten die molekulargenetischen Analysen so standardisiert werden, dass jedes mikrobiologische Labor die Resultate seiner isolierten und charakterisierten Organismen mit entsprechenden Werten anderer Labors vergleichen kann. Dies bedingt letztlich eine Neubeurteilung der taxonomischen Kriterien und führt höchstwahrscheinlich zu einer stark revidierten Taxonomie. Damit hoffen wir,



1: *Zygoccharomyces rouxii* CBS 732; 2: *Zygoccharomyces microellipsoides* CBS 427; 3-9: vermeintliche *Zygoccharomyces microellipsoides*.
Std. 3: Standard *Hansenula wingei*-Stamm YB-4662-VIA; mbp: Megabasenpaare

Abb. 4. Vergleich der Chromosomenmuster von Hefen, die gemäss klassischen Tests zur Art *Zygoccharomyces microellipsoides* gehören.

dass die 34 verschiedenen Hefestämme, welche an unserem Labor in den letzten zwei Jahren aus dem Rebberg und von den Trauben isoliert und physiologisch sowie molekulargenetisch charakterisiert worden sind, in den nächsten Jahren eindeutig identifiziert werden können.

LITERATUR

- Barnett J.A., Payne R.W. and Yarrow D., 1990. Yeasts: Characteristics and Identification. University Press, Cambridge.
- Dittrich H.H., 1987. Mikrobiologie des Weines. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Grando M.S., Ubeda J. and Briones A.I., 1994. RAPD Analysis of Wine *Saccharomyces cerevisiae* Strains Differentiated by Pulsed Field Gel Electrophoresis. *Biotechnology Techniques* 8 (8), 557-560.
- Lavallée F., Salvat Y., Lamy S., Thomas D.Y., Degré R. and Dulau L., 1994. PCR and DNA Fingerprinting Used as Quality Control in the Production of Wine Yeasts Strains. *Am. J. Enol. Vitic.* 45 (1), 86-91.
- Molina F., Shen P. and Jong S., 1993. Validation of the Species Concept in the Genus *Dekkera* by Restriction Analysis of Genes Coding for rRNA. *Int. J. Syst. Bact.* 43 (1), 32-35.
- Schütz M. and Gafner J., 1994. Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. *Letters in Appl. Microbiol.* 19, 253-257.
- Tisserat N.A., Hulbert S.H. and Sauer K.M., 1994. Selective Amplification of rDNA Internal Transcribed Spacer Regions to Detect *Ophiostoma koreanae* and *O. herbotricha*. *Phytopathology* 84 (5), 478-482.

manque de souches standardisées pour pouvoir caractériser toute la population des levures.

SUMMARY

Characterization and identification of yeasts

During the last two years, the yeasts present in a vineyard and on its grapes were isolated and characterized by physiological and molecular genetic methods. First the collected yeasts were characterized by 25 different physiological tests. Yeasts with the same characteristics were controlled by PCR and karyotyping. The analyzed yeasts were compared with reference strains to determine the yeast species. The karyotyping results of *Hanseniaspora* species showed that the chromosomal patterns were comparable. But in the case of *Candida*, the reference strains of the different species showed quite different patterns. The chromosomal pattern of *Candida stellata* had little similarity to the other *Candida* species examined and should be assigned to another taxonomic group. Yeasts assigned to the species *Debaryomyces polymorpha* by classical characterizing methods showed three different chromosomal patterns and those of the supposed species *Zygoccharomyces microellipsoides* even six. Thus, physiological tests never give reliable results in yeast characterization. Molecular genetical examination of the wine spoiling yeast *Brettanomyces* confirmed that the *Brettanomyces* strains analyzed belong to the species *Dekkera bruxellensis*. However the reference strains of *Dekkera bruxellensis* and *Dekkera anomala* do not differ significantly in their chromosomal patterns. The results described show very clearly that molecular genetic characterizing methods give reproducible information concerning yeast species and strains. The main problem today however is, that only a few reference strains are available.

KEY WORDS: Yeast characterization, karyotyping, PCR, reference strains, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Zygoccharomyces*, *Debaryomyces*, *Brettanomyces*

RÉSUMÉ

Caractérisation et identification des levures

Au cours de ces deux dernières années, des levures ont été isolées dans une vigne et sur des grappes de raisin. Ces levures ont tout d'abord été caractérisées par 25 tests physiologiques. Celles qui présentaient les mêmes caractères ont été contrôlées par PCR et «karyotyping». Les levures analysées ont été comparées avec des échantillons standard. Dans le cas de *Hanseniaspora*, le profil chromosomique était comparable. Mais dans le cas de *Candida*, les souches de référence des différentes espèces montraient des profils assez différents. *Candida stellata* a peu de similitudes avec les autres espèces de *Candida* et devrait être intégrée dans un autre groupe taxonomique. Les levures déterminées comme étant *Debaryomyces polymorpha* par des méthodes physiologiques ont montré trois profils chromosomiques différents, alors que celles supposées être *Zygoccharomyces microellipsoides* en ont montré six. Ces résultats indiquent que les tests physiologiques ne donnent jamais des informations complètes.

Les analyses chromosomiques de la levure *Brettanomyces*, nuisible pour le vin, ont montré que les souches analysées appartenaient à l'espèce *Dekkera bruxellensis*. Mais les souches de référence de *Dekkera bruxellensis* et *anomala* ne présentent pas de différences significatives.

Les méthodes modernes de «karyotyping» et de PCR nous donnent des informations importantes et reproductibles sur les espèces et les souches de levures. Le plus grand problème actuel est le