

Vor- und Nachteil weinmikrobiologischer Analysen

Dr.Karin Mandl
HBLA und BA für Wein- und Obstbau
A-3400 Klosterneuburg

Natürliche Hefeflora

- **Saccharomyces cerevisiae**
- **Hanseniaspora uvarum**
- **Metschnikowia pulcherima**
- **Pichia**
- **Wickerhamiella**



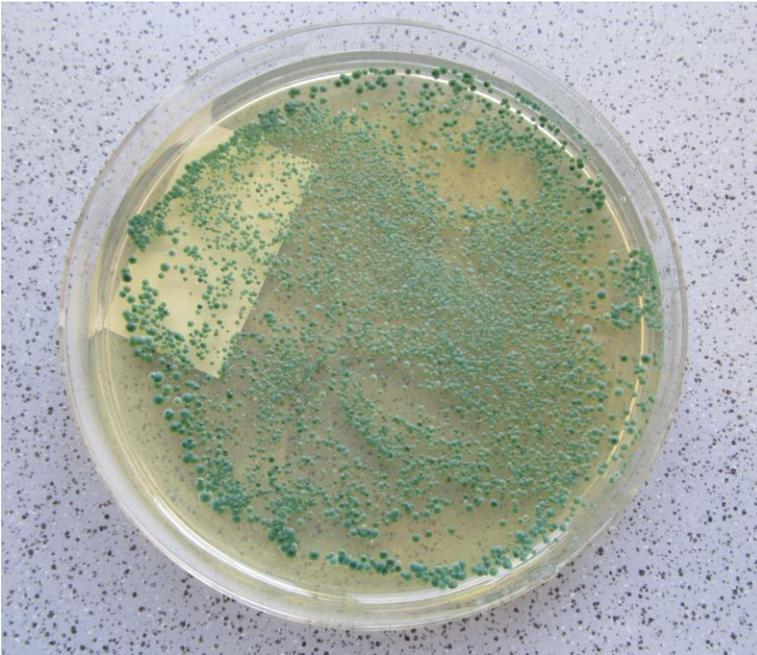
Natürliche bakterielle Flora

- Milchsäurebakterien
 - **Pediococcus**
 - **Lactobacillus**
 - **Oenococcus**
 - **Leuconostoc**
- Essigsäurebakterien
 - **Gluconobacter**
 - **Acetobacter**



Fragestellung

Welche Mikroorganismen sind in diesem Wein?



PCR

- ITS 1-4 – Pilze

- Sequenzieren

- RFLP – mit Restriktionsenzymen arbeiten

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editor. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press Inc; 1990. pp. 315–322

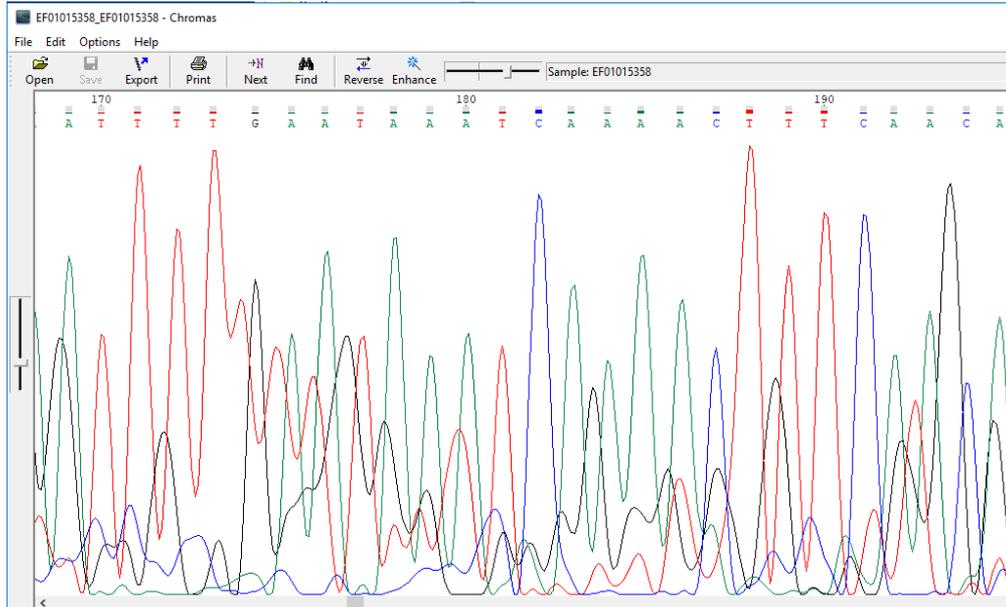
- AC₁ –AC₃ Poblet et al. 2000

POBLET, M., ROZE, ÁS, N., GUILLAMOÁN, J.M. and MAS, A. 2000: Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. Letters Appl. Microbiol. 31: 63-67

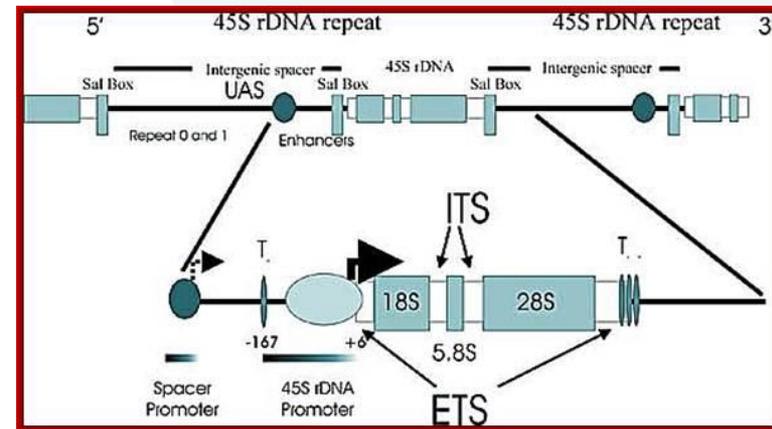
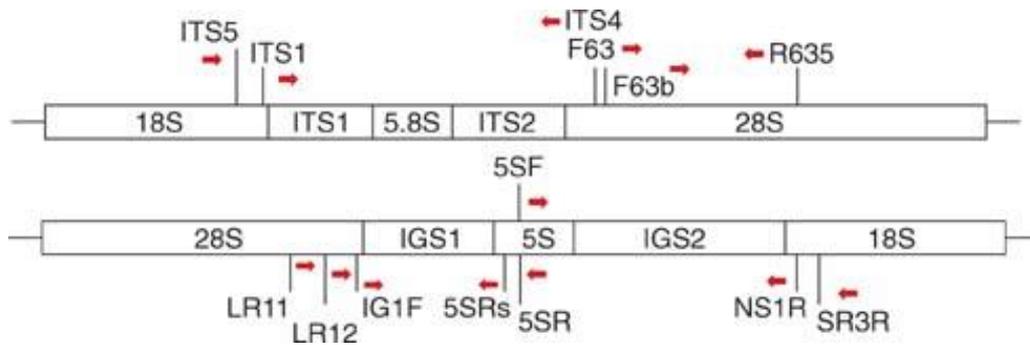
- Sequenzieren



FASTA DATEI



INTERNAL TRANSCRIBED SPACER



Multiplexed Detection of Fungal Nucleic Mara R. Diaz,¹Sherry A. Dunbar,²and James W. Jacobson²
https://www.researchgate.net/publication/23236807_Multiplexed_Detection_of_Fungal_Nucleic_Acid_Signatures

http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Ribose_Nucleic_Acid2C-rRNA_Processing_in_Eukaryotes.htm

RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)

- Esteve-Zarzoso B1, Belloch C, Uruburu F, Querol A. : Int J Syst Bacteriol. 1999 Jan;49 Pt 1:329-37. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers.

Species*	CECT strain no.	AP†	Restriction fragments		
			<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinFI</i>
<i>Candida vini</i>	10053, 11137, 11174	500	230+180+90	500	220+220+60
<i>Candida wickerhamii</i>	10231 ^T	660	600	560+100	325+325
<i>Candida zeylanoides</i>	1441	620	295+295	415+140	310+310
<i>Debaromyces hansenii</i>	10386	650	300+300+50	420+150+90	325+325
<i>Debaromyces polymorphus</i>	1132	730	300+200+180+100	650+80	310+200+140+100
	10043	650	300+300+50	420+150+90	325+325
<i>Debaromyces pseudopolymorphus</i>	10018, 10286	650	300+300+50	420+150+90	325+325
<i>Dekkera anomala</i>	11162 ^T	800	340+340+120	800	360+190+160+80
<i>Dekkera bruxellensis</i>	1009, 1010, 1451 ^T , 1452, 11045	485	255+140+90	375+95	270+215
<i>Hansenula mrakii</i>	11031	610	580	330+140+85	305+305
<i>Issatchenkia terricola</i>	11139, 11176	450	130+100+90+85+45	290+125	240+105+105
<i>Kluyveromyces aestuarii</i>	1949, 1955	750	285+165+125+100+65	640+95	365+180+165+40
<i>Kluyveromyces africanus</i>	1963 ^T	780	350+320+105	680+110	395+385

Microsatellite analysis of commercial wine yeast strains

KARIN SILHAVY, SUSANNE BERGER, KARIN MANDL, ROBERT HACK and FERDINAND REGNER

Mitteilungen Klosterneuburg 56 (2006): 140-146

SSR (SIMPLE SEQUENCE REPEATS)

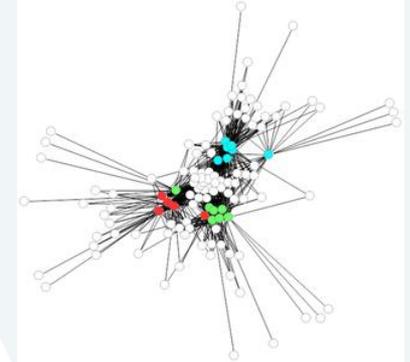
- sind kurze, nichtcodierende DNA-Sequenzen von zwei bis sechs Basenpaaren Länge, die im Genom eines Organismus oft wiederholt werden.

Primer	Sequence	References
SCYOR267C-fw	5'- tac taa cgt caa cac tgc tgc caa - 3'	(LEGRAS et al., 2005)
SCYOR267-rv	5'- gga tet act tgc agt ata cgg g - 3'	(GONZÁLEZ TECHERA et al., 2001)
C5fw	5'- tga cac aat agc aat ggc ctt ca - 3'	(LEGRAS et al., 2005)
C5rv	5'- gca agc gac tag aac aac aat cac a - 3'	(LEGRAS et al., 2005)
C11fw	5'- ttc cat cat aac cgt cgt gga tt - 3'	(LEGRAS et al., 2005)
C11rv	5'- tgc ctt ttt ctt aga tgg gct ttc - 3'	(LEGRAS et al., 2005)
SC8132X-fw	5'- ctg ctc aac ttg tga tgg gtt ttg g - 3'	(GONZÁLEZ TECHERA et al., 2001)
SC8132X-rv	5'- cct cgt tac tat cgt ctt cat ctt gc - 3'	(GONZÁLEZ TECHERA et al., 2001)

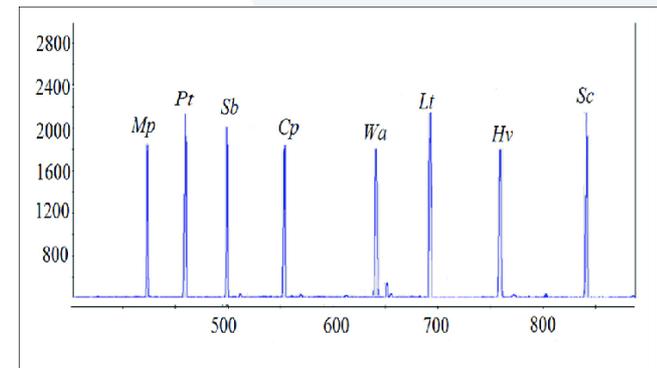
Yeast strain	Locus			
	C5	C11	SCYOR267C	SC8132X
Oenoferm Klosterneuburg	115, 153	215, 238	335, 342	210, 219
Oenoferm Rouge	115, 153	215, 238	335, 342	210, 219
Oenoferm Bouquet	130, 160, 165	191, 219	280, 288	210, 216
Oenoferm Freddo	120, 128	189, 215	305, 310	186, 198
Oenoferm Interdry bayanus	144, 184	215, 224	305, 310	195, 216
Oenoferm Tipico	120	222	304, 310	195
Oenoferm Color	139, 148	199, 217	291, 296	166, 216

ARISA (AUTOMATED APPROACH FOR RIBOSOMAL INTERGENIC SPACER ANALYSIS)

- Detektion von Mikroorganismen mit Vergleichsbanden mit Hilfe eines Sequenzer



Annals of Microbiology December 2015, Volume 65, Issue 4, pp
1833–1840 Assessment of wine microbial diversity using ARISA and
cultivation-based methods Soumya GhoshBahareh BagheriHoratio
H. MorganBenoit DivolMathabatha E. Setati



RAPD

- randomly amplified polymorphic DNA
- 1 Primer wird verwendet
- Zeigt ein Bandenmuster – oft nicht wiederholbar – wegen geringen Temperaturschwankungen im Thermocycler

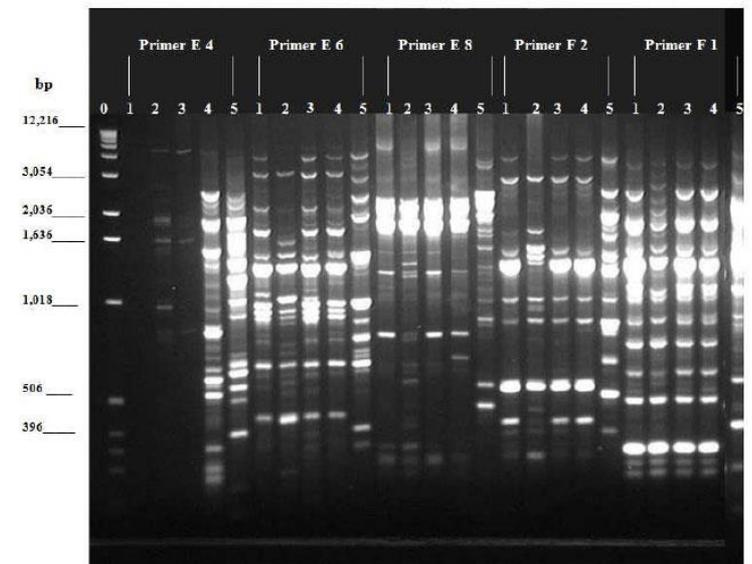


Figure 2 – RAPD-PCR comparison between brazilians and chineses *Ganoderma lucidum* strains. Lanes: 0, 1kbp DNA ladder; 1, CC-22; 2, CC-63; 3, CC-144; 4, CC-157; 5, *Ganoderma appplanatum* (included to ensure the consistency of the bands). Primers used: OPE-4, OPE-6, OPE-8, OPF-1 e OPF-2.

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132011000200008

TGGE/DGGE

- Temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)
- PCR Banden werden nach Größe auf einem Polyacrylgel aufgetrennt



<http://www.cleaverscientific.com/electrophoresis-products/dgge-package/>

PFGE

RT – PCR – REAL TIME PCR

PNA FISH -FISH

FLOWCYTOMETER

**PROTEOMICS – MICROARRAY –
DNS CHIP TECHNOLOGIE**

1.	PROBEN FILTRIEREN	Proben (!Menge überdenken – je nach Keimdruck) filtrieren und möglichst steril auf Plattenmedium auflegen (Markierung oben)
2.	INKUBATION	der Membranen am Agar, 30-37°C, 20 bis 40 h
3.	FIXIERUNG	Fixative schon vorbereitet auf Pads in PDs Membranen zur Fixierung 5 min (Markierung oben) von Agar auf Pads auflegen, PSs beschriftet und mit HB befüllen Membranen anschl. in Hybridisierungspuffer legen.
4.	HYBRIDISIERUNG	Membranen für 30 min bei 50°C Sterilisationsschrank
5.	WASCHEN	vorgewärmter Puffer in Tubes und Flasche zum Nachfüllen 50°C Wasserbad 4 x 7 Minuten – jeweils frischer Waschpuffer
6.	DETEKTION	am Mikroskop – nur deutliche Signale von Kolonien zählen – Rest sind VBNCs oder tote oder fremde Organismen

NGS NEXT GENERATION SEQUENCING

Material and Methodes

- DNA Isolation
 - Soil DNA Isolation Mini Kit von Favorgen Biotech
- Illumina MiSeq von der Fa. Eurofins Genomic GmbH
 - Yeasts ITS₁ und ITS₄ Primer
- bacteria V₁- V₃ Primer



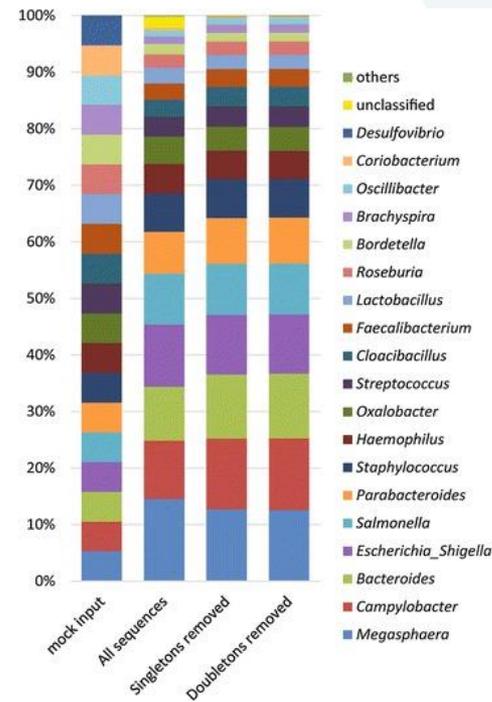
http://www.favorgen.com/port_pro1.php?type_1=pro_v_p11&id_1=dis15b9a59ea5ed00

ILUMINA

BMC Res Notes. 2016 Aug 2;9:380. doi:
10.1186/s13104-016-2172-6.

Pipeline for amplifying and analyzing
amplicons of the V1-V3 region of the 16S
rRNA gene.

Allen HK₁, Bayles DO₂, Looft T₃, Trachsel
J_{3,4}, Bass BE_{3,5}, Alt DP₂, Bearson SM₃,
Nicholson T₆, Casey TA₃.



Künstliche Weinprobe

Künstlicher Wein	Zugefügte Bakterien
	Lactobacillus fermentum (MSB, eigene Selektion), Bacillus cereus (DSM 31), Leuconostoc pseudomesenteroides (MSB, DSM 20193), Pediococcus damnosus (MSB, DSM 20331), Lactobacillus plantarum (MSB, DSM 20174), Gluconobacter oxydans (ESB, DSM 50049), Bacillus coagulans (MSB, DSM 2308), Bacillus subtilis (MSB, DSM 347), Oenococcus oeni (MSB, DSM 20252), Escherichia coli (DSM 1576)
	Zugefügte Hefen
	Metschnikowia pulcherrima (H32 Eigenselektion), Metschnikowia pulcherrima (H40 Eigenselektion), Hanseniaspora uvarum (Eigenselektion), Saccharomyces cerevisiae (DSM 70449)

Ergebnis – wir fanden alle zugesetzten Keime wieder

Künstlicher Wein	Zugesetzte Bakterien
	Lactobacillus fermentum (MSB, eigene Selektion), Bacillus cereus (DSM 31), Leuconostoc pseudomesenteroides (MSB, DSM 20193), Pediococcus damnosus (MSB, DSM 20331), Lactobacillus plantarum (MSB, DSM 20174), Gluconobacter oxydans (ESB, DSM 50049), Bacillus coagulans (MSB, DSM 2308), Bacillus subtilis (MSB, DSM 347), Oenococcus oeni (MSB, DSM 20252), Escherichia coli (DSM 1576)
	Zugesetzte Hefen
	Metschnikowia pulcherrima (H32 Eigenselektion), Metschnikowia pulcherrima (H40 Eigenselektion), Hanseniaspora uvarum (Eigenselektion), Saccharomyces cerevisiae (DSM 70449)

Natural wines

Natural wines	Milchsäurebakterien	Essigsäurebakterien
Rosé	Pediococcus damnosus, Oenococcus oeni	Acetobacter pasteurianus, Gluconobacter
Weißwein	Pediococcus damnosus, Oenococcus oeni	Acetobacter pasteurianus, Gluconobacter

Proben von Weintanks	Bakterien	Hefen
1	Oenococcus oeni	Metschnikowia sp., Metschikowia viticola, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces bayanus, Hanseniaspora uvarum, Wickerhamiella
2	Pediococcus damnosus Oenococcus oeni Gluconobacter	Metschnikowia sp., Metschikowia viticola, Metschikowia pulcherima, Pichia sp., Pichia terricola, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces bayanus, Hanseniaspora uvarum, Wickerhamiella
3	Lactobacillus sp. Lactobacillus plantarum , Pediococcus damnosus, Leuconostoc mesenteroides Oenococcus oeni , Gluconobacter	Metschnikowia sp., Metschikowia viticola, Metschnikowia pulcherima, Pichia membranefaciens, Pichia sp., Pichia terricola, Pichia diversa, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces bayanus, Hanseniaspora uvarum, Wickerhamiella

- **Potential der Technik
mit einer DNA Reinigung und NGS Sequencing
vollständiger Einblick in die mikrobielle Zusammensetzung
der Probe**

Nachteil:

**die derzeit noch hohen Kosten
keine Unterscheidung zwischen
lebendigen und toten Keimen möglich**

Danke für ihre Aufmerksamkeit!

