

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie

Entwicklung von Mikrosieb-Applikationen
in der Getränke-Filtrationstechnologie

Henning Kötke

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. R. F. Vogel

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. U. M. Kulozik
2. Univ.-Prof. Dr. F.-J. Methner
(Technische Universität Berlin)

Die Dissertation wurde am 25.04.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 27.08.2012 angenommen.

Danksagung

Ich danke den Menschen,
die mich bei meiner Arbeit gefördert, unterstützt und begleitet haben.

Professor Dr. Eberhard Geiger

Dr. Wilfried Hofmann
und den Mitarbeitern der NFT GmbH

Martin Koch

Dr. Mathias Hutzler

Dr. Christoph Tenge

Christl Volkhart, Jaqueline Lorenz
und den weiteren Mitarbeitern
des Lehrstuhls für Technologie der Brauerei II

Hubert Walter

Dr. Georg Stettner, Erich Schuster, Marc Schäfer

Markus Müller und Alexander Meyer

Ich danke meinen Eltern,
die es mir stets ermöglicht haben,
mich nach besten Möglichkeiten zu entwickeln.

Ich danke Dir, Marina,
für Deine Geduld, Dein Vertrauen und Deinen Zuspruch.

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
Problemstellung.....	1
Lösungsansatz	3
2 Stand des Wissens	6
2.1 Klassische Nachweisverfahren in der biologischen Betriebsüberwachung der Brau- und Getränkeindustrie.....	6
2.2 Schnellnachweisverfahren in der biologischen Betriebsüberwachung der Brau- und Getränkeindustrie	8
2.2.1 Mikrobiologischer Schnellnachweis durch Fluoreszenzmarkierung	10
2.2.2 Mikrobiologischer Schnellnachweis durch Real-Time-PCR	14
3 Material und Methoden	22
3.1 Silizium-Membranfilter	22
3.1.1 Struktureigenschaften von Silizium-Membranfiltern.....	23
3.1.2 Chemische Beständigkeit von Silizium-Membranfiltern	24
3.1.3 Permeabilität von Silizium-Membranfiltern für Wasser.....	27
3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	29
3.2.1 Bestimmung von Trenngrenzen	29
3.2.2 Schnellnachweisverfahren mit Silizium-Membranfiltern.....	32
3.3 Reagenzien und Chemikalien	34
3.3.1 Bestimmung von Trenngrenzen	34
3.3.2 PCR & Fluoreszenz.....	34
3.4 Testorganismen	34
3.4.1 Bestimmung von Trenngrenzen	34
3.4.2 PCR & Fluoreszenz.....	35

3.5	Methodik der Bestimmung des Rückhaltevermögens von Silizium-Membranfiltern	35
3.5.1	Prüfung des Rückhaltevermögens mittels Challenge-Test.....	35
3.5.2	Auswahl von Testorganismen	37
3.5.3	Kalkulation der Testkeim-Beaufschlagung.....	38
3.5.4	Herstellung der Unfiltrat-Suspensionen	39
3.5.5	Filtration der Testkeim-Suspensionen	39
3.5.6	Kontrolle der Zellkonzentration in Unfiltrat und Filtrat	41
3.5.7	Kennzahlen des Rückhaltevermögen	41
3.5.8	Statistische Auswertung der Messdaten zum Rückhaltevermögen.....	42
3.6	Methodik des kombinierten Einsatz von Silizium-Membranfiltern und Fluoreszenzmarkierung	43
3.6.1	Prozeduren zur Fluoreszenzmarkierung von Testkeimen	43
3.7	Methodik des kombinierten Einsatz von Silizium-Membranfiltern und Real-Time-PCR.....	44
3.7.1	Verfahren zur DNA-Isolierung	44
3.7.2	PCR-Protokolle	47
3.8	Methodik des kombinierten Einsatz von Silizium-Membranfiltern mit Fluoreszenzmarkierung sowie Real-Time-PCR.....	48
3.8.1	Filtration mit Silizium-Membranfiltern.....	48
3.9	Methodik des kombinierten Einsatz von Silizium-Membranfiltern und Real-Time-PCR im mikrobiologischen Betriebslabor einer Großbrauerei	49
4	Ergebnisse	51
4.1	Untersuchungen zum Rückhaltevermögen von Silizium-Membranfiltern gegenüber Kultur- und Schadhefen sowie bierschädlichen Bakterien.....	51
4.1.1	Rückhaltevermögen für <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> (Kulturhefe)	51
4.1.2	Rückhaltevermögen für <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>	53
4.1.3	Rückhaltevermögen für <i>Saccharomyces exiguus</i>	55
4.1.4	Rückhaltevermögen für <i>Debaryomyces hansenii</i>	57
4.1.5	Rückhaltevermögen von Silizium-Membranfiltern für <i>Lactobacillus brevis</i>	59
4.1.6	Rückhaltevermögen von Silizium-Membranfiltern für <i>Pediococcus damnosus</i>	63

4.2	PCR & Fluoreszenz	65
4.2.1	Eignung von Fluoreszenzfarbstoffen	65
4.2.2	Prozeduren zur Markierung von Mikroorganismen mit Fluoreszenz-Farbstoffen	72
4.2.3	Kombinierte Anwendung von Silizium-Membranfiltern und Real-Time-PCR	75
4.2.4	Kombinierte Anwendung von Silizium-Membranfiltern, Fluoreszenzmarkierung und Real-Time-PCR	78
4.2.5	Validierung des kombinierten Einsatzes von Silizium-Membranfiltern und Real- Time-PCR durch Versuche in einer Großbrauerei	80
5	Diskussion	83
5.1	Rückhaltevermögen von Silizium-Membranfiltern	83
5.2	Optimierung mikrobiologischer Schnellnachweisverfahren durch kombinierten Einsatz von Silizium-Membranfiltern	90
6	Zusammenfassung	93
7	Abstract	96
8	Literaturverzeichnis	98
9	Anhang	108

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3-1:	Struktureller Aufbau (links) und Siliziumnitrid-Porenmembran (rechts) eines von Silizium-Membranfilters	22
Abb. 3-2:	Korrelation zwischen Blasendruck und Defekt-Abmessungen bei Silizium-Membranfiltern	24
Abb. 3-3:	Durchflussraten von Silizium-Membranfiltern für entsalztes Wasser	28
Abb. 3-4:	Testfiltrationsanlage zur Bestimmung von Rückhalteraten von Silizium-Membranfiltern	31
Abb. 3-5:	Filtergehäuse der Testfiltrationsanlage für die Bestimmung von Rückhalteraten von Silizium-Membranfiltern.....	31
Abb. 3-6:	Regelung des transmembranen Druckes bei der Bestimmung von Rückhalteraten für Silizium-Membranfiltern	40
Abb. 3-7:	Saugflasche mit aufgesetztem Trichter; Rahmen mit fixiertem Silizium-Membranfiltern	50
Abb. 4-1:	Mittlere prozentuale Rückhalteraten von Silizium-Membranfiltern für brauerei-relevante Hefen	52
Abb. 4-2:	Mittlere logarithmische Rückhalteraten (LRV) von Silizium-Membranfiltern für <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	53
Abb. 4-3:	Mittlere logarithmische Rückhalteraten (LRV) von Silizium-Membranfiltern für <i>Saccharomyces cerevisiae varians diastaticus</i>	55
Abb. 4-4:	Mittlere logarithmische Rückhalteraten (LRV) von Silizium-Membranfiltern für <i>Saccharomyces exiguus</i>	57
Abb. 4-5:	Mittlere logarithmische Rückhalteraten (LRV) von Silizium-Membranfiltern für <i>Debaryomyces hansenii</i>	59
Abb. 4-6:	Mittlere prozentuale Rückhalteraten von Silizium-Membranfiltern für Bakterien (<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Pediococcus damnosus</i>)	62
Abb. 4-7:	Mittlere logarithmische Rückhalteraten (LRV) von Silizium-Membranfiltern für <i>Lactobacillus brevis</i>	63
Abb. 4-8:	Mittlere logarithmische Rückhalteraten (LRV) von Silizium-Membranfiltern für <i>Pediococcus damnosus</i>	65
Abb. 4-9:	Lebend-Tot-Differenzierung von Hefezellen (<i>S.carlsbergensis</i>) durch Fluoreszenzmarkierung mit CFDA,SE und PI (oben); Verbesserung der Differenzierbarkeit durch Bildbearbeitung (unten)	66

Abb. 4-10: Fluoreszenzmarkierung mit CFDA,SE bei Hefezellen (S.carlsbergensis) durch Färbung der Zellen auf dem Silizium-Membranfilter (oben) oder in der Unfiltratlösung (unten).....	67
Abb. 4-11: Fluoreszenzmarkierung von Bakterienzellen (L.brevis) mit DAPI (oben); Fluoreszenzmarkierung von Hefezellen (S.carlsbergensis) DAPI (unten).....	68
Abb. 4-12: Beeinträchtigung der optischen Auswertung nach DAPI-Markierung von Hefezellen (S.carlsbergensis) aus Bierproben durch Sekundärfärbungen (oben); Verbesserung der Differenzierbarkeit bei Bierproben durch Bildbearbeitung (unten).....	69
Abb. 4-13: Fluoreszenzmarkierung mit PI bei Hefezellen (S.carlsbergensis) aus isotonischer Kochsalzlösung (oben) und Bier (unten)	70
Abb. 4-14: Differenzierung von lebenden und toten Zellen durch Fluoreszenz-Markierung mit DAPI und PI bei S.carlsbergensis (oben), L.brevis (Mitte) und P.damnokus (unten).....	71
Abb. 4-15: Verlagerung von abgeschiedenen Mikroorganismen aus Bereichen mit filtrationswirksamer Porenmembran in periphere Bereiche (oben); Schädigung von Testkeimen bei Färbung auf demontierten Silizium-Membranfiltern (unten).....	73
Abb. 4-16: Nachweisgrenzen für den PCR-Nachweis von Schadhefen in isotonischer Kochsalzlösung [transparente Darstellung – Messwerte mit negativer Schmelzkurvenanalyse]	76
Abb. 4-17: Nachweisgrenzen für den PCR-Nachweis von Schadhefen in Bier.....	76
Abb. 4-18: Nachweisgrenzen für den PCR-Nachweis von L.brevis [transparente Darstellung – Messwerte mit negativer Schmelzkurvenanalyse]	78
Abb. 4-19: Einfluss einer vorhergehenden Fluoreszenzmarkierung auf den PCR-Nachweis von Kultur- und Schadhefen.....	79
Abb. 4-20: Einfluss einer vorhergehenden Fluoreszenzmarkierung auf den PCR-Nachweis von bierschädlichen Bakterien	80
Abb. 5-1: Abhängigkeit zwischen dem Porendurchmesser von Silizium-Membranfiltern und den Durchtrittsraten von Schadhefen	85
Abb. 5-2: Abhängigkeit der mittleren logarithmischen Rückhalterate (LRV) vom Alter der Testorganismen (ausgewählte Beispiele)	86
Abb. 5-3: Einfluss von Zell-Morphologie und geometrischer Struktur der Silizium-Membranfilter auf Durchsatzraten und Filtratvolumina.....	88

Tabellenverzeichnis

Tab. 3-1:	Prozessparameter bei der Färbung von Mikroorganismen mit Fluoreszenzfarbstoffen	44
Tab. 3-2:	Temperaturprotokoll für die Real-Time-PCR von Hefen	48
Tab. 3-3:	Temperaturprotokoll für die Real-Time-PCR von Bakterien.....	48
Tab. 4-1:	Bestimmung des Rückhaltevermögens von Silizium-Membranfiltern für brauerei-relevante Hefen	52
Tab. 4-2:	Übersicht – Bestimmung des Rückhaltevermögens von Silizium-Membranfiltern für bierschädliche Bakterien.....	61
Tab. 9-1:	Rückhalteraten – <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	108
Tab. 9-2:	Rückhalteraten – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>	109
Tab. 9-3:	Rückhalteraten – <i>Saccharomyces exiguus</i>	110
Tab. 9-4:	Rückhalteraten – <i>Debaryomyces hansenii</i>	111
Tab. 9-5:	Rückhalteraten – <i>Lactobacillus brevis</i>	112
Tab. 9-6:	Rückhalteraten – <i>Pediococcus damnosus</i>	113
Tab. 9-7:	Nachweisgrenzen für Schadhefen bei der RTQ-PCR [rote Markierung – Messwerte mit negativer Schmelzkurvenanalyse]	114
Tab. 9-8:	Nachweisgrenze für <i>L.brevis</i> bei der RTQ-PCR [rote Markierung – Messwerte mit negativer Schmelzkurvenanalyse]	114
Tab. 9-9:	Einfluss einer vorhergehenden Fluoreszenzfärbung auf eine PCR zum Nachweis von Kultur- und Schadhefen	115
Tab. 9-10:	Einfluss einer vorhergehenden Fluoreszenzfärbung auf eine PCR zum Nachweis von bierschädlichen Bakterien.....	115

1 Einleitung

Problemstellung

Bier ist hinsichtlich seiner mikrobiologischen Stabilität grundsätzlich ein sehr stabiles Lebensmittel. Durch seinen niedrigen pH-Wert, die niedrigen Gehalte an Sauerstoff und vergärbaren Zuckern, den enthaltenen Ethanol und die bakteriostatische Wirkung der Hopfenbitterstoffe besitzt Bier sehr selektive Eigenschaften, die das Wachstum vieler Mikroorganismen inhibieren oder zumindest stark limitieren [KAMMHUBER 2008]. So stellen pathogene Keime in Bier grundsätzlich kein Problem dar. Es gibt jedoch einzelne Mikroorganismen, die auch die beschriebene komplexe Produktmatrix tolerieren und in der Praxis der Brau- und Getränkeindustrie als Schadkeime auftreten. Dazu zählen vor allem Schadhefen und bierverderbende Bakterien wie z.B. Laktobazillen und Pediokokken, auch *Pectinatus* spp. und *Megasphaera cerevisiae* kommen vor. Durch diese Organismen können sensorische Mängel bis hin zur Ungenießbarkeit, Trübungen, Bodensatz, Schleimbildung und Gebinde-Bombagen hervorgerufen werden [BACK 1994a+c, BRANDL 2006].

Vor dem Hintergrund der potentiellen Gefährdung der Produktqualität ist ein routinemäßiges Monitoring der biologischen Stabilität des produzierten Bieres erforderlich und stellt die zentrale Aufgabe der biologischen Betriebsüberwachung (BBÜ) dar. Ziel ist es dabei zuerst, möglichst schnell ein valides Urteil zum biologischen Status des Produkts geben zu können und ggf. vorhandene mikrobiologische Kontaminationen zu identifizieren und im Produktionsprozess zu lokalisieren. Daneben soll eine belastbare Prognose über die zu erwartende Haltbarkeit des Bieres getroffen werden, der insbesondere vor dem Hintergrund von heute hohen Anforderungen an die Produktqualität, einer oft komplexen Struktur der Distribution, von globalen Vertriebswegen und entsprechend langen MHD-Festlegungen große Bedeutung zukommt.

Aus den genannten Erfordernissen lassen sich die Attribute „sicher“, „schnell“, „sensitiv“ und „spezifisch“ als Anforderungen an mikrobiologische Nachweisverfahren ableiten [BRANDL und GEIGER 2004]. Die klassische mikrobiologische Nachweismethodik durch kulturelle Anreicherung ggf. unter Zugabe von Nährmedien bietet zwar eine hohe Sicherheit beim Spurennachweis, erfordert aber im Regelfall eine Bearbeitungsdauer von wenigstens mehreren Tagen und erfüllt somit die heutigen

Anforderungen hinsichtlich einer schnellen Bereitstellung von validen Ergebnissen nicht mehr [SCHMIDT 1993, BACK 1994a+b, BAST 2001, NITZSCHE und EGGERS 2001, STRACHOTTA 2003]. Zudem ist die Kultivierung im Regelfall unspezifisch und bei sensiblen Keimen ebenso wie die Auswertung anspruchsvoll [BRANDL und GEIGER 2004]. Trotz der genannten Nachteile ist die klassische Vorgehensweise in Ermangelung an brauchbaren Alternativen in zahlreichen Betrieben der Brau- und Getränkeindustrie unverändert etabliertes Standard-Prozedere.

Der Bedarf nach alternativen Schnellnachweismethoden konnte somit bis dato nicht erfüllt werden. Dabei gibt es durchaus unterschiedliche Verfahren, die das Attribut „Schnellnachweis“ prinzipiell erfüllen. So lassen sich bierschädliche Mikroorganismen unspezifisch anhand des Vorkommens von ATP oder durch Fluoreszenzmarkierung innerhalb einer Stunde nachweisen [SCHOKNECHT 2009, HUTTER 2000, NITZSCHE 2002]. Auch mit molekularbiologischen Markierungsmechanismen wie Sandwich-Hybridisierung, fluoreszenzmarkierte Gensonden (FISH - Fluoreszenz in Situ Hybridisierung) oder RTQ-PCR sowie immunchemische Fluoreszenzmarkierung können innerhalb von 3 Stunden Screenings oder spezifische Nachweise ausgeführt werden [HUHTAMELLA et al. 2007, THELEN et al. 2001, BEIMFOHR und THELEN 2002, BRANDL 2006, HUTZLER 2009, SCHOKNECHT 2009]. Als entscheidendes Hemmnis bei der Etablierung dieser „Schnellnachweisverfahren“ in der betrieblichen Praxis hat sich neben den teilweise hohen Kosten der Umstand erwiesen, dass beim Nachweis von Spurenkontaminationen, wie sie in der Brau- und Getränkeindustrie im Regelfall allenfalls vorkommen, auch beim Einsatz dieser modernen Verfahren wegen der gegebenen Nachweisgrenzen der Verfahren auf wenigstens eine kurze Voranreicherung von 24 bis 48 Stunden nicht verzichtet werden kann, so dass ein wesentlicher Teil des potentiellen zeitlichen Vorteils verloren geht [JUVONEN et al. 1999, MÜCHER und SCHÖNLING 2000, BISCHOFF 2001, BRANDL et al. 2003, JUVONEN et al. 2003].

Mit Blick auf das prinzipiell vorhandene Potential der Methoden zum schnellen Nachweis von bierschädlichen Mikroorganismen stellt sich somit die Frage, wie die Verfahren hinsichtlich ihrer Prozessdauer so optimiert werden können, dass sie den Anforderungen der betrieblichen Praxis in der Brau- und Getränkeindustrie an ein zeitgemäßes mikrobiologisches Schnellnachweisverfahren gerecht werden?

Lösungsansatz

Hier setzt der kombinierte Einsatz von Silizium-Membranfiltern und mikrobiologischen Schnellnachweismethoden an, der im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich seiner Machbarkeit geprüft werden soll. Bei dem zu entwickelnden Verfahren soll nicht durch Voranreicherung, sondern durch Konzentrierung aus einem geeigneten Probevolumen die hinsichtlich der Nachweisgrenzen der analytischen Verfahren erforderliche Mindestanzahl bzw. Mindestkonzentration von Keimen bereitgestellt werden. Für eine solche Methodik wurden bereits erste Ansätze aufgezeigt [HUTTER et al. 2003]. Dazu soll im ersten Prozessschritt durch Filtration über Silizium-Membranfilter eine Konzentrierung von Mikroorganismen aus dem Unfiltrat in einem eingegengten Unfiltrat-Restvolumen auf der Anströmseite der Silizium-Membranfilter oder durch Fixierung unmittelbar auf der Filteroberfläche erfolgen. Dabei ist sicherzustellen, dass sämtliche in einer Probe enthaltenen Keime sicher abgetrennt und für die anschließende Analytik bereitgestellt werden. Mit ihrer glatten und weitgehend inaktiven Siliziumnitrid-Oberfläche sowie ihrer absoluten Trennwirkung bieten Silizium-Membranfilter diesbezüglich günstige Voraussetzungen.

Im anschließenden zweiten Prozessschritt sollen durch geeignete Verfahren die abgetrennten Mikroorganismen nachgewiesen werden. Die Wahl für die Nachweisverfahren fällt auf Fluoreszenzmarkierung und RTQ-PCR, weil sich durch die Kombination dieser Verfahren mit der Konzentrierung über Silizium-Membranfiltern prinzipiell die Perspektive für ein sensitives, sicheres und dabei schnelles Nachweisverfahren eröffnet. Der Einsatz der RTQ-PCR bietet zusätzlich die Option auf einen spezifischen Nachweis von Schadkeimen. Für beide Verfahren wurde in der betrieblichen Praxis in Kombination mit einer Voranreicherung Ihre Eignung zum Einsatz in der biologischen Betriebsüberwachung nachgewiesen und beide Verfahren finden bereits Anwendung in der betrieblichen Routineanalytik.

Der Fluoreszenzmarkierung kommt in der zu entwickelnden Methode die Funktion eines schnellen Screenings und insbesondere der Lebend-tot-Differenzierung zu. Die im eingegengten Unfiltrat oder auf der Filteroberfläche konzentrierten Mikroorganismen sollen dabei mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, auf der Oberfläche fixiert, detektiert, optional auch quantifiziert und nach lebenden und toten Zellen differenziert werden. Das beschriebene Verfahren böte mit einer Dauer von weniger

als einer Stunde die Voraussetzungen für eine produktionsnahe mikrobiologische Grundüberwachung noch während der Filtration oder Abfüllung des Bieres. Damit würde ein deutlicher Schritt in Richtung einer mikrobiologischen Online-Analytik getan. Daneben ist für das beschriebene Verfahren auch eine Inline-Anwendung naheliegend. Ergänzend oder alternativ zur Fluoreszenzmarkierung soll die Real-Time-PCR eingesetzt werden, um einen ggf. auch spezifischen Nachweis zu führen und bei kombinierter Anwendung das Ergebnis des Fluoreszenz-Screenings mit hoher Nachweissicherheit zu validieren.

Bei der Methodenentwicklung liegt der erste Schwerpunkt auf der Auswahl von Silizium-Membranfiltern mit geeigneten Trenneigenschaften für die Konzentrierung der Mikroorganismen. Dazu werden Untersuchungen zum Rückhaltevermögen der Filter angestellt. Anhand der Ergebnisse aus den Untersuchungen sollen Filter mit geeigneten Porengrößen für die unterschiedlichen Problemstellungen der biologischen Betriebsüberwachung ausgewählt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit werden mögliche Formen der kombinierten Anwendung von Silizium-Membranfiltern mit Fluoreszenzmarkierung und Real-Time-PCR geprüft. In den Versuchen zur Anwendung einer Fluoreszenzmarkierung von Mikroorganismen nach vorhergehender Konzentrierung durch Silizium-Membranfilter liegt der erste Schwerpunkt auf der Auswahl geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe und deren Anwendung in einer auf die Silizium-Membranfilter abgestimmten Färbeprozedur. Dabei wird auch die Lebend-tot-Differenzierung berücksichtigt.

Für den kombinierten Einsatz von Silizium-Membranfiltern und Real-Time-PCR wird zuerst eine angepasste Prozedur zur DNA-Isolierung aus den durch die Filter konzentrierten Mikroorganismen entwickelt. Danach folgt die Bestimmung von Nachweisgrenzen für das Verfahren und eine Bewertung im Vergleich zum Standardverfahren. Abschließend wird hinsichtlich einer kombinierten Anwendung von Fluoreszenzmarkierung und Real-Time-PCR geprüft, ob für eine vorhergehende Fluoreszenz-Markierung von Mikroorganismen ein nachteiliger Einfluss auf das Ergebnis einer nachfolgenden PCR-Analyse ausgeschlossen werden kann.

Die Entwicklung und Eignungsprüfung insbesondere mit Blick auf eine spätere Umsetzbarkeit in der Praxis der betrieblichen Qualitätsüberwachung erfolgt in Kooperation mit der mikrobiologischen Betriebskontrolle einer deutschen Großbrauerei. Dabei wird das neu entwickelte Verfahren gegen das Standard-PCR-Prozedere der betrieblichen Praxis abgeglichen. Daneben erfolgt eine grundlegende Bewertung der entwickelten Methodik gegen generelle Anforderungen an routinetaugliche Schnelldiagnostikmethoden für die Brau- und Getränkeindustrie [BRANDL und GEIGER 2004].

2 Stand des Wissens

2.1 Klassische Nachweisverfahren in der biologischen Betriebsüberwachung der Brau- und Getränkeindustrie

Die klassische Form der biologischen Betriebsüberwachung (BBÜ) in getränkeherstellenden Unternehmen ist die biologische Haltbarkeits- bzw. Standprobe, bei der abgefüllte Flaschen aus der Produktion und ergänzende Proben für bis zu 4 Wochen bei 25-28°C gelagert und im Anschluss auf Trübung, Bodensatz und eine Kontamination des Bodensatzes kontrolliert werden. Für die zeitpunktbezogene Entnahme von Haltbarkeitsproben an einem Ort ist grundsätzlich zu beachten, dass es sich bei diesen Proben um „Momentanproben“ handelt, die lediglich eine Bewertung des mikrobiologischen Status zum Zeitpunkt und am Ort der Probenahme ermöglichen [NITZSCHE 2002]. Wegen der schnellen und oft weitreichenden Distribution der Produkte ist heute eine wesentlich schnellere Bewertung des mikrobiologischen Produktstatus erforderlich. Daher wird heute den Proben häufig vor der Inkubation ein Nährmedium zur Beschleunigung des Wachstums von ggf. vorhandenen Keimen zugesetzt (Anreicherungskultur), wodurch eine deutliche Verkürzung des Nachweisverfahrens und eine Erhöhung der Nachweissicherheit ohne einen Verlust an Selektivität erreicht wird [BAST 2001]. In der Brauerei verbreitete Nährmedien für den Nachweis von bierschädlichen Bakterien sind NBB, MRS, S-Bier, für den Nachweis von Hefen wird üblicherweise Würze eingesetzt. Ein Einfluss des Nährmediums auf das Untersuchungsergebnis muss grundsätzlich ausgeschlossen sein [NITZSCHE 2002]. Da im Verkaufsbier üblicherweise allenfalls Spurenkontaminationen auftreten und sich bierverderbende Bakterien gewöhnlich nur sehr langsam vermehren, ist trotz der Zugabe eines wachstumsfördernden Nährmediums meist eine mehrtägige Inkubation erforderlich die bei einer Bebrütungstemperatur von 25-28°C im Idealfall weniger als 4 Tage, durchschnittlich jedoch 7-8 Tage dauert (abschließende Auswertung nach 10-12 Tagen). Es folgt eine Auswertung der Flüssiganreicherungen hinsichtlich Trübung, Bodensatz und Kontamination des Bodensatzes [BACK 1994a+b, LÖGTENBÖRGER und ELTER 2003, NITZSCHE 2002].

Neben der flüssigen Haltbarkeitsprobe wird häufig die Membranfiltration in der BBÜ eingesetzt, die allerdings nur für nicht zu trübe und zu viskose Proben wie z.B. filtriertes Bier oder klare Getränke im Allgemeinen angewendet werden kann. Die

großen Vorteile der Membranfiltration liegen in der Anreicherung, die das Probenmaterial durch die Siebwirkung des Membranfilters erfährt, und der Möglichkeit einer quantitativen Auswertung durch Kontrolle auf Koloniewachstum bei Kombination der Filter mit festen Nährmedien. In der BBÜ werden üblicherweise Membranfilter aus Cellulosenitrat oder Celluloseacetat mit einem Durchmesser von 50 mm eingesetzt. Die verwendeten Porengrößen liegen bei 0,2 µm für Trinkwasseruntersuchungen, bei 0,45 µm für den Nachweis von produktschädlichen Bakterien und bei 0,65 µm bis 1,20 µm (bei schlecht filtrierbaren Medien) für den Nachweis von Hefen [SCHMIDT 1994a]. Bei filtriertem, abgefülltem Bier wird üblicherweise ein Probevolumen von 50 bis 500 ml, häufig von 150 bis 170 ml in der Membranfiltration eingesetzt. Die anschließende Inkubation der Membranfilter kann entweder auf einem festen oder in einem flüssigen Nährmedium erfolgen. Dabei wird das Filter z.B. für den quantitativen Nachweis von Schadhefen für 2 Tage bei 27°C auf Würze-Agar aerob bebrütet oder für den qualitativen Nachweis von bierschädlichen Bakterien für 5-6 Tage bei 27°C unter anaeroben Bedingungen (Anaerobiertopf/-werkbank) in NBB-B oder einem anderen geeigneten flüssigen Nährmedium. Die Auswertung der Membranfilter erfolgt durch Kontrolle auf Koloniebildung (Plattenkultur) und auf Trübung bzw. Indikatorumschlag (Flüssiganreicherung) [BACK 1994a+b, SCHMIDT 1994b].

Da Momentanproben nur eine sehr begrenzte Bewertung von üblicherweise großen Produktionschargen in der Brau- und Getränkeindustrie zulassen, wurden sogenannte „Tagesproben“ (Tropfflaschen) eingeführt. Diese Proben werden nicht zeitpunktbezogen erhoben, sondern es erfolgt eine kontinuierliche oder getaktete, zeit- oder mengenproportionale Probenentnahme über einen längeren Zeitraum (z.B. ein Produktionstag oder eine Schichtdauer), so dass eine bessere Beurteilung der durchschnittlichen Qualität einer Produktionscharge möglich ist. Nachteil der Methode ist, dass für die gesamte beprobte Produktmenge keine Differenzierung zum Ursprung und Ausmaß von nachgewiesenen Kontaminationen möglich ist [STRACHOTTA 2004]. Bei Tagesproben werden Probenvolumina von üblicherweise 1000 ml bis 3000 ml erreicht [BACK und PÖSCHL 1998]. Die Probenahmestellen für Tagesproben liegen z.B. am Kieselgurfilterauslauf, am Schichtenfilterauslauf, an den Drucktanks oder am Füllereinlauf. Die Tagesprobe wird im Zuge der weiteren Verarbeitung membranfiltriert und in einem flüssigen Nährmedium für 5-7 Tage

(min./max.: 3-12 Tage) bebrütet. Die Auswertung erfolgt wie bei klassischen Haltbarkeitsproben qualitativ durch Kontrolle auf Trübung oder Bodensatzbildung [BACK 1994a+b].

Mit dem Ziel einer In- und Online-Analytik mit gesteigerten Probenvolumina für die BBÜ wurde das Bypass-Membranfiltration-Systems (BM-System) entwickelt, das sich bereits in einigen Brauereien und Getränkeherstellenden Unternehmen im Praxiseinsatz befindet. Beim BM-System wird kontinuierlich mittels einer Förderpumpe ein Teilstrom aus dem Produktstrom entnommen, über einen Membranfilter in der Bypassleitung filtriert und wieder in den Produktstrom eingeleitet. Der Membranfilter aus Celluloseacetat, Cellulosenitrat, Polysulfon oder Membranflies hat einen Durchmesser von 142 mm und je nach Einsatzzweck einen nominalen Porendurchmesser von 0,2 bis 0,65 μm . Der Durchfluss kann zwischen 2,4 und 200 l/h variiert werden. Mit dem System konnte eine Vervielfachung des Probevolumens um den Faktor 40 bis 100 erreicht werden, was einer Verbesserung der Nachweissicherheit um eine Zehnerpotenz entspricht. Um bei der kombinierten Anwendung von BM-System und PCR-Schnellnachweis die Nachweissicherheit auch bei weniger als 10^2 Keimen in einer Probe gewährleisten zu können, ist eine Anreicherung von mindestens 24 Stunden erforderlich [BACK und PÖSCHL 1998, BRANDL und GEIGER 2004, AMMON et al. 2004]. Damit ist man dem Ziel einer Online-Analytik zwar näher gekommen, erreicht wurde es noch nicht. Auch mit dem BM-System kann nur eine zeitlich versetzte Bewertung der gesamten beprobten Produktmenge erfolgen.

2.2 Schnellnachweisverfahren in der biologischen Betriebsüberwachung der Brau- und Getränkeindustrie

Im Rahmen dieser Arbeit werden Untersuchungen zur Optimierung der bestehenden Verfahren „Fluoreszenzmarkierung“ und „PCR“ zum Schnellnachweis von bierschädlichen Mikroorganismen durch kombinierten Einsatz mit Silizium-Membranfiltern angestellt. Die Methoden werden in den nachfolgenden Kapiteln 2.2.1 und 2.2.2 genauer erläutert.

Neben diesen beiden Verfahren gibt es aktuell weitere mikrobiologische Schnellnachweisverfahren. So ist durch Messung von ATP-Biolumineszenz der Nachweis von Mikroorganismen möglich, wenn zuvor freies ATP und ATP aus

somatischen Zellen aus der Probelösung entfernt wurden. Eine Identifizierung von Keimen ist mit diesem Verfahren allerdings nicht möglich [SCHOKNECHT 2009]. Mit molekularbiologischen Markierungsmechanismen können dagegen Schadkeime je nach Auswahl der Sequenzen von Detektions- (Fluoreszenz-) und Fängersonden auf Art-, Gruppen- oder Gattungsebene identifiziert werden. Bei der Sandwich-Hybridisierung wird ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA) durch eine Fängersonde für die optische Auswertung auf eine Basis (z.B. Mikrotiterplatte) fixiert und durch eine Detektionssonde markiert, an die wiederum ein Enzymkomplex bindet. Durch Umsetzung eines fluorogenen Substrates durch das Enzym wird der Nachweis von Schadkeimen geführt [HUHTAMELLA et al. 2007]. Zu den Methoden mit molekulargenetischem Markierungsmechanismus zählen auch fluoreszenzmarkierte Gensonden, die an die komplementäre ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA) vermehrungsfähiger Schadkeime hybridisieren (FISH, Fluoreszenz in Situ Hybridisierung) und je nach Auswahl der Sonden-Sequenz ein Screening oder auch einen spezifischen Nachweis ermöglichen [THELEN et al. 2001, BEIMFOHR und THELEN 2002]. Den Vorteil einer Differenzierung bzw. Identifikation bietet auch eine immunchemische Fluoreszenzmarkierung, bei der durch eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion (ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay) kritische Keime markiert werden. Der kombinierte Einsatz einer Immunfluoreszenzmarkierung mit einem Durchflusscytometer bietet dabei den Vorteil, dass das Messinstrument die markierten Zellen prinzipiell ohne Voranreicherung erfassen kann [SCHOKNECHT 2009]. Neben der immunochemischen Fluoreszenzmarkierung sind Durchflusscytometer auch in Kombination mit anderen Fluoreszenzmarkierungen einsetzbar [SCHOKNECHT 2009]. Der Einsatz eines Durchflusscytometers bietet dabei den Vorteil, dass zumindest die Option besteht, auf eine Voranreicherung zu verzichten. Diese ist ansonsten für die genannten Verfahren bei Nachweisgrenzen von 100 bis 1000 Zellen oder höher meist zu berücksichtigen.

Zur schnellen Identifizierung von bier- und getränkeschädlichen Mikroorganismen werden heute in zunehmendem Maße chemotaxonomische Methoden wie MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight Mass Spectroscopy) [QIAN et al. 2008, BUSCH 2010] und FTIR-Mikrospektroskopie (Fourier-transformierte Infrarot Mikrospektroskopie) [KÜMMERLE et al. 1998, TIMMINS et al. 1998, WENNING 2004, BÜCHL 2009] eingesetzt. Wegen der hohen

Investitionskosten und vor allem wegen der erforderlichen Datenbanken zur Zuordnung bzw. Interpretation der Messergebnisse sind diese Methoden aber für die betriebliche Routineanalytik keine Optionen.

2.2.1 Mikrobiologischer Schnellnachweis durch Fluoreszenzmarkierung

Fluoreszenzoptische Schnellmethoden besitzen zwar prinzipiell Routinetauglichkeit, ihre Verbreitung in der Praxis der Brau- und Getränkeindustrie ist aber bis dato noch begrenzt, obwohl sie gemessen an den klassischen Anreicherungsverfahren und der PCR einen großen Zeitvorteil bei vergleichbarer statistischer Sicherheit und Zuverlässigkeit bieten [HUTTER 2000]. Diese noch mangelnde Akzeptanz liegt auch darin begründet, dass der zeitliche Aufwand für diese Analysenmethode infolge der bislang ungenügenden flächenmäßigen Konzentrierung der Mikroorganismen häufig noch als zu hoch angesehen wird [NELSON 1985, BARNEY und KOT 1992]. So kommt der prinzipiell größte Vorteil einer schnellen Ergebnis-Verfügbarkeit nach ca. 30 Minuten bis dato nur zum Tragen, wenn eine ausreichend hohe Keimdichte die Erhebung von wenigen Stichproben auf der Gesamfilterfläche zulässt. So hätte die Methodik tatsächlich den Charakter einer Online-Überwachung und es könnten selbst bei zeitkritischen Prozessen wie Filtration und Abfüllung noch korrigierende Maßnahmen ergriffen werden. Da jedoch in der betrieblichen Praxis gemeinhin allenfalls Spurenkontaminationen auftreten, muss zur Aufrechterhaltung der Nachweissicherheit die gesamte Filterfläche ausgewertet werden, was bei gängigen Membranfiltern mit einem Durchmesser von 50 mm zu deutlich längeren Bearbeitungszeiten führt [HUTTER 1992, HUTTER 2000, NITZSCHE 2002, HUTTER et al. 2003, BRANDL und GEIGER 2004].

Der Nachweis von Keimen durch fluoreszenzoptische Methoden erfolgt durch Isolierung der Mikroorganismen mittels Membranfilter, die anschließende Färbung der Keime mit Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochromen) auf den Filtern und eine abschließende Auswertung im Fluoreszenzmikroskop [SCHMIDT 1994a-c, SPECTOR und GOLDMAN 2005]. Durch eine optimal abgestimmte Färbeprozedur wird eine hohe Sensitivität erreicht, die auch den Nachweis von wenigen Zellen bis hin zur Einzelzelle ermöglicht. Weitere Vorteile der Fluoreszenzmarkierung liegen in der Möglichkeit einer Quantifizierung durch Zählung und der Differenzierung von lebenden und toten Zellen durch Einsatz von Vital- und Letalfarbstoffen [HUTTER

1992]. Der größte Nachteil liegt dagegen in der fehlenden Möglichkeit eines spezifischen Nachweises, wie er durch Real-Time-PCR oder fluoreszenzmarkierte Sonden möglich ist. Die Identifizierung eines Keims ist hier allein durch die korrekte Zuordnung in der mikroskopischen Auswertung möglich [BRANDL und GEIGER 2004]. Neben der manuellen Auswertung kann auch ein automatisiertes optisches Auswertesystem zum Einsatz kommen [HUTTER 2000, NITZSCHE und EGGERS 2001, NITZSCHE 2002].

Die Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) für die Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte zuerst mit der Zielsetzung, eine geeignete Färbung der auf der Oberfläche von Silizium-Membranfiltern isolierten Mikroorganismen zu erzielen. Für diese Problemstellung wurden die Vitalfarbstoffe 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) und 5,6-Carboxyfluoresceindiacetat-succinimidylester (CFDA,SE) sowie der Letalfarbstoff Propidiumiodid (PI) ausgewählt. Gleichzeitig konnte für die ausgewählten Farbstoffe angenommen werden, dass sie hinsichtlich des angestrebten kombinierten Einsatzes von Fluoreszenzfärbung und PCR jeweils eine Perspektive für das Vermeiden einer nachteiligen Beeinflussung der PCR boten.

- **CFDA,SE – 5,6-Carboxyfluoresceindiacetat-succinimidylester**

Mit dem Cytoplasma-Vitalfarbstoff 5-,6-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester (CFDA,SE) kann sowohl die Viabilität von Zellen durch Detektion von Esterase-Aktivität als auch die Membran-Integrität nachgewiesen werden [HOEFEL et al. 2005, WANG et al. 2005, HANSSON et al. 1987, BIANCHI et al. 2004]. CFDA,SE ist ein fluorogenes Substrat („pre-fluorochrome“), das zwar ein Fluorescein-Molekül, aber praktisch keine Fluoreszenz aufweist. Neben seinen lipophilen Eigenschaften durch zwei Acetylreste ist CFDA,SE unpolar, so dass es Zellmembranen nahezu ungehindert durch passive Diffusion durchdringen kann [HOEFEL et al. 2003a, MOTHE und TATOR 2005, NAKAJIMA et al. 2005, LYONS 1999, LYONS 2000]. Im Cytoplasma von viablen Zellen werden durch endogene Esterasen die beiden Acetylreste hydrolysiert, so dass als Produkt 5-,6-Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CF,SE) entsteht, das eine starke grüne Fluoreszenz besitzt und als polares, anionisches Molekül die Zellmembran kaum mehr durchdringen kann [BRACEY et al. 1998, HAUGLAND 2008]. Zudem kommt es nachfolgend durch Reaktion der reaktiven Succinimidylgruppe des CF,SE mit vorrangig cytoplasma-

tischen Proteinen zur Entstehung von stark fluoreszierenden, nicht reaktiven Farbstoff-Protein-Konjugaten, so dass der Farbstoffkomplex durch kovalente Bindung („Protein-Anker“) in den Zellen gebunden und weitgehend zurückgehalten wird [UECKERT et al. 1997, HOEFEL et al. 2003a, LECEUR et al. 2001, LYONS 1999, GRAZIANO et al. 1998, MOTHE und TATOR 2005, FULLER et al. 2001]. Nur bei toten oder sterbenden Zellen mit beschädigter Zellmembran kann es zu einem raschen Verlust der Fluoreszenz durch Auslaufen des Farbstoffs kommen [HAUGLAND 1992].

Aus den unpolaren und lipophilen Eigenschaften von CFDA,SE ergibt sich die Notwendigkeit, Verdünnungslösungen des Farbstoffs mit organischen Lösungsmitteln wie Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Dimethylformamid (DMF) herzustellen [LI et al. 2003, HAUGLAND 1992]. CFDA,SE-wird üblicherweise in Anwendungskonzentrationen von 1 bis 50 μM eingesetzt [HASBOLD et al. 1999, KOHLWEIN 2000]. Eine Inkubation von bis zu 30 Minuten bei 37°C bei Dunkelheit ist angeraten [WANG et al. 2005, HANSSON et al. 1987, HOEFEL et al. 2003b]. Die Reaktionsprodukte Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CF,SE) bzw. Carboxyfluorescein (CF) besitzen wie Fluorescein ein Absorptionsmaximum bei ca. 491 nm und ein Emissionsmaximum bei ca. 518 nm [NAKAJIMA et al. 2005]. Damit besitzen die Fluorescein-Derivate ein identisches Emissionsmaximum wie SYBR-Green-1, einem in der Real-Time-PCR weit verbreiteten Fluoreszenzfarbstoff, der auch in den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten kommerziellen PCR-Nachweiskits eingesetzt wurde, so dass sich die Frage stellt, ob es bei der kombinierten Anwendung einer Fluoreszenzfärbung mit CFDA,SE und einer nachgeschalteten Real-Time-PCR mit SYBR-Green-1 zu einer Beeinflussung des PCR-Ergebnisses durch verschlepptes CFDA,SE kommt. Da SYBR-Green-1 in Zellen an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet, erscheint hier – eine qualitative Isolierung der DNA aus dem Zelllysat bei der Probenaufbereitung vorausgesetzt – ein kombinierter Einsatz der beiden Farbstoffe nicht ausgeschlossen.

- **DAPI – 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)**

4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) ist ein Fluorochrom für die Färbung von Zellkernen und Chromosomen, das erst durch die Wechselwirkung mit dissymmetrischen Molekülen (z.B. Nukleinsäuren) bei UV-Anregung eine blaue

Fluoreszenz zeigt [HAUGLAND 2008]. DAPI ist ein kationisches Molekül, das aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften sowohl die intakten Zellmembranen von viablen Zellen als auch geschädigte Zellmembranen von toten Zellen passieren kann [GADELLE und FORTERRE 1994, SHIMAKITA et al. 2007]. Entsprechend ist bei einer Lebend-Tot-Differenzierung bei Einsatz von DAPI als Vitalfarbstoff die gleichzeitige Verwendung eines für tote Zellen spezifischen Farbstoffs zur Differenzierung unabdingbar und die Entstehung von Mischfarben mit einem Blauanteil von DAPI nicht zu vermeiden. In Zellen komplexiert DAPI bei hoher, konstanter Affinität mit doppelsträngiger Desoxyribonukleinsäure (dsDNA), wodurch eine hoch-spezifische Färbung von nukleinsäurehaltigen Zellkompartimenten erzielt wird (v.a. Zellkern). Bei deutlich verringerter Fluoreszenz-Intensität und anderem Emissionsmaximum (ca. 500 nm) bindet DAPI auch an doppelsträngige RNA (dsRNA). Trotz des bei DAPI durch die molekulare Struktur prinzipiell hohen Potentials zur Interkalation in Nukleinsäuren, wird heute überwiegend angenommen, dass DAPI durch elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoff-Brückenbindungen reversibel an die kleine Furche der dsDNA bindet [DOLEZEL et al. 1992, COLEMAN et al. 1981, PAROLIN et al. 1990]. Die Bindung von DAPI an doppelsträngige DNA führt in Abhängigkeit von der Anzahl der verfügbaren Bindungsstellen zu einer ca. 20-fachen Intensivierung der Fluoreszenz [COLEMAN und MAGUIRE 1982]. Wegen seines Emissionsmaximums bei 451 nm (blau) ist für DAPI keine negative Beeinflussung einer PCR mit SYBR-Green-1 (Emissionsmaximum: 520 nm, grün) zu erwarten. Allerdings ist eine Konkurrenz um die Bindung an Nukleinsäuren möglich, da beide Farbstoffe in bzw. an diese binden [HAUGLAND 2008, HAUGLAND 1992, UECKERT et al. 1997]. Empfohlene Anwendungskonzentrationen für DAPI liegen zwischen 0,1 und 5 µg/ml [KOHLWEIN 2000, HAUGLAND 2008, COLEMAN und MAGUIRE 1982, SWANNELL und WILLIAMSON 1988]. Die Inkubation mit dem Fluorochrom sollte bei Raumtemperatur bis zu 120 Minuten andauern [HOEFEL et al. 2005, DOLEZEL et al. 1992, DELLINGER und GEZE 2001].

- **PI – Propidiumiodid**

Propidiumiodid (PI) ist ein Letalfarbstoff, der in Kombination mit Vitalfarbstoffen häufig zur Gegenfärbung von toten Zellen eingesetzt wird. PI ist ein Indikator für die Membranintegrität, da es wegen seiner positiven Eigenladung keine intakten Zellmembranen durchdringen kann. Es interkaliert nur bei toten oder sterbenden Zellen mit hoher Affinität in die Helix-Struktur von doppelsträngiger Nukleinsäure (DNA und RNA), wodurch es zu einer Verzehnfachung der Fluoreszenz-Intensität kommt [SHIMAKITA et al. 2007, HOEFEL et al. 2003b, DOLEZEL et al. 1992, HAUGLAND 2008, WESTON und PARISH 1990]. Hinsichtlich des Emissionsmaximums ist für PI (617 nm, rot) keine negative Beeinflussung einer PCR mit SYBR-Green-1 (Emissionsmaximum: 520 nm, grün) zu erwarten. Allerdings ist eine Konkurrenz um die Bindung an Nukleinsäuren möglich, da beide Farbstoffe in diese interkalieren [HAUGLAND 2008, HAUGLAND 1992, UECKERT et al. 1997]. Es werden Anwendungskonzentrationen zwischen 0,05 und 5 µg/ml genutzt, die jeweils über der Sättigungsgrenze liegen sollten [DOLEZEL 1991, HAUGLAND 1992, HAUGLAND 2008, KOHLWEIN 2000]. Die Dosierung von PI kann üblicherweise unmittelbar vor der Auswertung erfolgen, ggf. ist eine Inkubationszeit von 5 bis 10 Minuten bei Dunkelheit zu berücksichtigen [UECKERT et al. 1997, WANG et al. 2005, ATTFIELD et al. 2000].

2.2.2 Mikrobiologischer Schnellnachweis durch Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR besitzt grundsätzlich das Potential zur Erfüllung der Forderung aus der Brau- und Getränkeindustrie nach einem mikrobiologischen Schnellnachweisverfahren mit hoher Spezifität und Sensitivität als Alternative zu den klassischen Nachweisverfahren [MÜCHER und SCHÖNLING 2000, METHNER et al. 2004]. Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine in den 1980er Jahren zur Praxisreife entwickelte Methode für die In-Vitro-Vervielfältigung (Amplifikation) von Nukleinsäuren [BARTLETT und STIRLING 2003, BALTES und KROH 2004]. Dabei werden definierte Abschnitte des Genoms exponentiell vervielfältigt, identifiziert und quantifiziert [MÜCHER und SCHÖNLING 2000, VOETZ 2002, LOCH-AHRING 2002]. Durch die exponentielle Vervielfältigung kann in einer vergleichsweise kurzen Zeitspanne von 1 bis 1,5 Stunden (30-40 Zyklen) auch aus einer sehr geringen Menge an Ausgangs-DNA eine mit einer

geeigneten Auswerteeinheit detektierbare Menge an DNA synthetisiert werden [NEWTON 1995, MÜLHARDT 2000, VOETZ 2002, BARNEY und KOT 1992, NEWTON und GRAHAM 1994, BRIDGE et al. 1998]. Die wesentlichen Vorzüge der PCR-Analytik liegen somit in ihrer großen Schnelligkeit, ihrer hohen Sensitivität, die auch den sicheren Nachweis geringer Keimmengen ermöglicht, und ihrer je nach Primer-Auswahl hohen Spezifität für den Nachweis von Organismen bis auf Gruppen- oder Art-Ebene [MÜCHER und SCHÖNLING 2000, MOCK 2001, MAURER 2006]. So kann für die Probenaufbereitung bei bis zu 30 Proben eine Dauer von ca. 60 bis 90 Minuten veranschlagt werden, so dass sich eine Gesamtdauer von etwa 3 Stunden ergibt [BRETTSCHNEIDER 2002, HOMANN et al. 2002, VOETZ 2002, HUTTER et al. 2003]. Mit einer Gesamtdauer von unter 3 Stunden stellt die Real-Time-PCR eine Schnellnachweismethode dar, der man praktisch den Status einer Online-Methode zuschreiben kann [BRETTSCHNEIDER 2003]. Gegenüber klassischen mikrobiologischen Nachweisverfahren stellt die Real-Time-PCR somit in der Qualität und Spezifität ihrer Ergebnisse einen immensen Fortschritt für die mikrobiologische Qualitätssicherung dar und bietet sehr günstige Voraussetzungen, um im Rahmen der routinemäßigen Qualitätssicherung der betrieblichen Produktion eine schnelle und gesicherte Chargenfreigabe herbeizuführen [LOCH-AHRING 2002].

Voraussetzung für den Ablauf einer eigentlichen PCR ist das Vorhandensein einer Ausgangs-DNA (Template-DNA), die in ihrer Basensequenz jenen Teilabschnitt (Target-DNA) aufweisen muss, der als Matrize für die nachfolgende Vervielfältigung dient [VOETZ 2002]. Dabei hat die Reinheit der eingesetzten Template-DNA hinsichtlich der Erzielung eines sensitiven und verlässlichen PCR-Nachweises große Bedeutung, so dass sich ein nicht unerheblicher Aufwand für die DNA-Isolierung ergibt [LOCH-AHRING 2002]. Die Abgrenzung der Target-DNA im PCR-Prozess erfolgt durch spezifische Primer (Oligonukleotide, ca. 15 bis 25 Nukleotide), die sequenzspezifisch an die komplementäre Zielsequenz der Template-DNA hybridisieren und so den zu amplifizierenden Sequenzbereich flankieren. Das 3'-OH-Ende der Primer markiert dabei jeweils den Startpunkt der Neusynthese des neuen DNA-Strangs (Amplikon). Da die PCR beide Stränge der Template-DNA betrifft, muss immer mindestens ein Primer-Paar vorhanden sein, das entsprechend auf jedem der beiden Stränge der Template-DNA das 5'-Ende der Target-DNA markiert.

Die Sequenz eines Primers sollte möglichst spezifisch für das gewünschte Amplifikationsprodukt sein, so dass der Primer mit höchster Wahrscheinlichkeit nur an der korrekten Stelle der Template-DNA hybridisiert [MÜLHARDT 2000]. Die Auswahl der Target-DNA wird üblicherweise so vorgenommen, dass der entsprechende Abschnitt der DNA den Organismus oder die Organismen, die nachgewiesen werden sollen, möglichst eindeutig determiniert [MÜCHER und SCHÖNLING 2000, MOCK 2001, BRETTSCHEIDER 2003]. Je nach Spezifität der ausgewählten Primer kann eine Zuordnung des Befundes zu einer Organismengruppe (Screening) oder eine direkte Identifizierung erreicht werden [BRANDL und GEIGER 2004]. Der eigentliche Aufbau des komplementären Basenstrangs erfolgt aus den ebenfalls im Reaktionsgemisch vorliegenden Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) durch die katalytische Wirkung von DNA-Polymerase (5'-3'-Polymeraseaktivität; Temperaturoptimum: 74°C; Syntheserate: ca. 2800 Nukleotide pro Minute), die von den durch die Primer markierten Startpunkten auf den Template-DNA-Einzelsträngen an die Synthese von doppelsträngiger DNA initiiert. Um ideale Reaktionsbedingungen für die PCR zu gewährleisten, wird mit dem Reaktionsmix neben den bereits erwähnten Komponenten ein spezieller Reaktionspuffer eingesetzt, in dem u.a. Mg^{2+} -Ionen als Co-Faktoren der Polymerase enthalten sind [NEWTON und GRAHAM 1994, MÜLLER 2001, BALTES und KROH 2004].

Der beschriebene Reaktionsmechanismus wird in der Praxis als ein Prozess realisiert, in dem der beschriebene Reaktionsansatz wiederholt einen dreistufigen Temperaturzyklus durchläuft. Dabei erfolgt die künstlich initiierte Neusynthese von DNA [NEWTON 1995]. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird durch eine Temperaturerhöhung auf ca. 94°C der DNA-Doppelstrang der Template-DNA in seine zwei komplementären Einzelstränge aufgespalten. Im Anschluss wird die Temperatur auf ca. 55°C abgesenkt und die in der Reaktionslösung im Überschuss enthaltenen Oligonukleotid-Primer (Amplimere) hybridisieren an jene Bereiche der einzelsträngigen Template-DNA, die eine komplementäre Basensequenz aufweisen [MÜCHER und SCHÖNLING 2000]. Nachdem mit dieser als Annealing bezeichneten Anlagerung die Startpunkte für die DNA-Polymerase definiert sind, kommt es im dritten Prozessschritt („Elongation“) nach einer Temperaturerhöhung auf das Temperaturoptimum des Enzyms bei ca. 72°C zu einer zügigen Synthese des zur

Template-DNA komplementären DNA-Strangs durch Anlagerung von dNTPs, so dass für den Sequenzabschnitt der Original-Target-DNA ein kurzer Teilbereich doppelsträngiger DNA entsteht [NEWTON und GRAHAM 1994]. Mit einer erneuten Temperaturerhöhung auf 94°C wird der Zyklus abgeschlossen und zugleich der nächste Reduplikationszyklus eingeleitet. Der gesamte dreistufige Vorgang der Vervielfältigung wird als Amplifikation bezeichnet und in PCR-Anwendungen üblicherweise etwa 30- bis 40-mal durchlaufen [LOCH-AHRING 2002, NEWTON 1995]. Ein PCR-Ergebnis ist dann als positiver Befund einzustufen, wenn nach der PCR jenes Amplikon nachgewiesen werden kann, für das der eingesetzte Primer die Target-DNA definiert [BURKE 1996, MÜLLER 2001, BALTES und KROH 2004].

Bei der ursprünglichen Form der PCR folgte die Auswertung durch Bewertung von DNA-Banden von PCR-Produkten mittels Ethidiumbromid-Markierung und Gel-Elektrophorese. Dieses Verfahren ist mit einem großen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden [MAURER 2006]. Den aktuellen Standard der PCR-Analytik auch in der betrieblichen Praxis stellt die quantitative Real-Time-PCR mittels Real-Time-Thermocyclern dar. Diese Geräte sind Voraussetzung für die Anwendung des Verfahrens, bei dem die Bildung von Amplikons schon während des PCR-Laufs durch Detektion der Fluoreszenzintensität von universellen Fluoreszenzfarbstoffen oder fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden in jedem Temperierzyklus und somit in Echtzeit (Real-Time) gemessen wird [HOMANN et al. 2002]. Entsprechend sind die Thermocycler mit einer Anregungslichtquelle (UV) und einer Detektionseinrichtung (CCD-Kamera oder Fotodioden) ausgestattet. Zudem besitzen die Geräte einen Heizblock mit sehr hoher Aufheiz- und Kühlrate, in dem die PCR-Ansätze das Temperatur-Protokoll durchlaufen. In Kombination mit Thermocyclern werden üblicherweise spezielle Nachweiskits eingesetzt, die in einem Reaktionsmix die für die Real-Time-PCR erforderlichen Fluoreszenzfarbstoffe oder sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden enthalten [VOETZ 2002, MAURER 2006, MOCK 2001, LOCH-AHRING 2002]. Mit den letztgenannten spezifischen DNA-Sonden ist auch eine spezifische Identifizierung von Mikroorganismen-Spezies in der Real-Time-PCR möglich [VOETZ 2002].

Der zum Zweck der Visualisierung der DNA-Amplifikation am häufigsten verwendete Fluoreszenzfarbstoff ist SYBR-Green (Absorptionsmaximum: 492 nm; Emissionsmaximum: 519 nm) [MOCK 2001, HOMANN et al. 2002, MAURER 2006]. Dieser

Farbstoff bindet unspezifisch an doppelsträngige Desoxyribonucleinsäure (dsDNA), wobei es durch die Bindung an die dsDNA zu einer starken Zunahme der Fluoreszenz-Intensität von SYBR-Green kommt. Die Fluoreszenzfärbung tritt somit während der Real-Time-PCR immer dann auf, wenn an den durch Hitze vereinzelt DNA-Strängen durch die Wirkung der Polymerase wieder ein komplementärer Strang synthetisiert wird und dsDNA entsteht. Ein nicht unwesentlicher Nachteil der Real-Time-PCR mit SYBR-Green liegt im unspezifischen Charakter der dsDNA-Färbung, durch die nicht nur die Amplikons, sondern auch andere Formen von dsDNA (z.B. Primer-Dimere, nicht spezifische Amplikons) markiert werden [MAURER 2006]. Der Nachteil der Nicht-Spezifität lässt sich bedingt durch eine Schmelzpunktanalyse im Anschluss an den PCR-Lauf relativieren. Dabei wird die Temperatur allmählich angehoben, so dass es zu einer Denaturierung der Amplikons und folglich auch einer Freisetzung des Fluorochroms kommt. Der Schmelzpunkt ist durch jene Temperatur markiert, bei der nur noch 50% der DNA in Form von Doppelsträngen vorliegen, und in Abhängigkeit von Länge und Basensequenz spezifisch für unterschiedliche Amplikons [MOCK 2001, HOMANN et al. 2002, MAURER 2006, TEVFIK DORAK 2006, MAURER 2006]. Neben universellen Fluoreszenzfarbstoffen können auch fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden für die Visualisierung der DNA-Amplifikation eingesetzt werden. Diese Sonden tragen zwei Fluorochrome, zwischen denen bei räumlicher Nähe eine Wechselwirkung nach dem FRET-Prinzip (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers) besteht: einer der Farbstoffe (Donor) nimmt die Energie des Anregungslichts auf und überträgt sie ohne selber Licht zu emittieren auf das zweite Fluorochrom (Akzeptor, Quencher), das die Energie in Form von Licht abgibt [MÜLLER 2001, REISCHL et al. 2002]. Wird jedoch durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase die fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde von der Template-DNA entfernt und die räumliche Nähe der beiden Fluorochrome aufgehoben, so gibt das erste Fluorochrom die absorbierte Energie des Anregungslichts ohne FRET unmittelbar in Form von Licht mit seinem spezifischen Emissionsmaximum wieder ab (Reporter-Funktion). Entsprechend ergibt sich während jedes PCR-Zyklus ein Fluoreszenzsignal während der durch die DNA-Polymerase vermittelten Elongation, das in seiner Intensität mit fortschreitender DNA-Amplifikation zunimmt [MÜLHARDT 2000, MAURER 2006].

Der Verlauf einer PCR-Analyse wird durch die Festlegung eines Cp- oder Ct-Wertes (Cp – Crossing Point, Ct – Crossing Threshold) quantifiziert, wobei diese Kenngröße angibt, zu welchem Zeitpunkt die linear-logarithmische Phase der Fluoreszenzzunahme im Zuge der PCR beginnt, die das Kennzeichen eines positiven PCR-Befundes ist [EDWARDS et al. 2004, HOMANN et al. 2002]. Wegen des linearen Zusammenhangs zwischen Ct-Wert und DNA-Konzentration kann durch die Real-Time-PCR auch eine quantitative Bewertung erfolgen, d.h. es kann prinzipiell auch eine Aussage zum Gehalt an Template-DNA in der Probe getroffen werden [BARNEY und KOT 1992, MAURER 2006].

Ein potentieller Nachteil ergibt sich aus der Nachweisempfindlichkeit (Sensitivität) der PCR-Analytik. Dies liegt bei kommerziellen PCR-Nachweiskits üblicherweise bei 100 bis 1000 Keimen; es werden aber auch in der Praxis bereits Nachweisgrenzen von 5 bis 20 Keimen erreicht [MÜCHER und SCHÖNLING 2000, MOCK 2001, LÖGDENBÖRGER und ELTER 2003, HUTZLER et al. 2008]. Die Beachtung der Nachweisgrenzen ist bei der Anwendung der PCR-Analytik eine Grundvoraussetzung für das Erzielen von belastbaren Ergebnissen. Es kann nur dann ein sicherer Nachweis geführt werden, wenn bei relevanten Kontaminationen mit dem Probenmaterial eine ausreichende Anzahl an Keimen der PCR-Analyse zugeführt wird, so dass auch ein positiver Befund gewährleistet ist. Bei der Beprobung von Bier ist dieser Umstand in besonderer Weise zu beachten, weil in Bier gemeinhin allenfalls Spurenkontaminationen mit nur sehr geringen Ausgangskeimzahlen vorkommen. Erst durch die Erhöhung der Zelldichte z.B. durch Kultivierung der Mikroorganismen im Probenmaterial vor der eigentlichen PCR-Analytik (Voranreicherung) kann hier das Auftreten von falsch-negativen Analyseergebnisse vermieden und eine hohe Nachweissicherheit erreicht werden [JUVONEN et al. 1999, MÜCHER und SCHÖNLING 2000, MOCK 2001, HOMANN et al. 2002]. Aus der Notwendigkeit dieser Voranreicherung, die in der betrieblichen Praxis meist nicht zu vermeiden ist, ergibt sich der große Nachteil einer deutlichen Verzögerung bis zum Erhalt der Analyseergebnisse bei der Anwendung der Real-Time-PCR und auch anderer molekularbiologischer Schnellnachweismethoden (z.B. fluoreszenzmarkierte Sonden) [HOMANN 2002, LOCH-AHRING 2002, BRANDL und GEIGER 2004, BEIMFOHR und THELEN 2002, LÖGDENBÖRGER und ELTER 2003]. Die Voranreicherung erfolgt meist durch Filtration von 500 bis 1000 ml

Probevolumen über einen Membranfilter, der anschließend für mindestens 24 Stunden, im Regelfall jedoch für 1 bis 3 Tage, in einem geeigneten flüssigen Nährmedium bei 28°C inkubiert wird [HUTTER et al. 2003, MOCK 2001, BRANDL und GEIGER 2004]. Aus der Voranreicherung wird dann üblicherweise ein Aliquot von maximal 1 µl entnommen und für die PCR aufbereitet [LOCH-AHRING 2002, HOMANN et al. 2002]. Sobald der Real-Time-PCR eine Voranreicherung vorgeschaltet wird, geht ein Großteil des für das Verfahren realisierbaren Zeitgewinns gegenüber klassischen mikrobiologischen Nachweisverfahren und auch ihr Status als „Online-Kontrolle“ verloren, da eine direkte Reaktion auf die Betriebssituation anhand der PCR-Ergebnisse damit nicht mehr möglich ist [HUTTER et al. 2003]. Vor diesem Hintergrund und mit Blick auf die zusätzlich hohen Kosten für molekularbiologische Nachweisverfahren wie die Real-Time-PCR stellt sich somit die Frage, ob sie tatsächlich einen zusätzlichen Nutzen generieren, der ihren Einsatz rechtfertigt [LÖGDENBÖRGER und ELTER 2003]. Ohne Voranreicherung wäre ein solcher Nutzen allein wegen der Zeitersparnis gegenüber klassischen Nachweismethoden sicher gegeben.

Ein alternativer Ansatz zur Gewährleistung einer ausreichenden Zelldichte ohne zeitaufwendige Vorkultivierung liegt in der Konzentrierung der Keime aus einem ausreichend großen Probevolumen z.B. durch Filtration über Membranfilter. Allerdings erwiesen sich sowohl Verfahren, bei denen die zurückgehaltene Keime durch das Ab- oder Rückspülen von Membranfiltern gewonnen werden sollten, als auch Versuche mit löslichen Filtern wegen des Verlusts an Zellen bzw. Template-DNA als so wenig geeignet, dass bis dato eine Voranreicherung zur Gewährleistung einer ausreichenden Nachweissicherheit als unverzichtbar anzusehen ist [BRANDL 2006].

Hier bietet die Konzentrierung von Keimen aus einer Unfiltratlösung durch Anwendung von Mikrosieben mit anschließendem Nachweis der Keime durch fluoreszenzoptische oder molekularbiologische Methoden einen interessanten Lösungsansatz für das beschriebene Anreicherungsproblem. Den Mikrosieben wird eine absolute Trennwirkung zugeschrieben, die Abscheidung von Mikroorganismen erfolgt oberflächlich und ihre Materialeigenschaften (geringe Fläche, glatte Oberfläche, beständiges Material) erscheinen grundsätzlich sehr geeignet für die

beabsichtigte Anwendung. Bis dato konnten aber noch keine praxistauglichen Ergebnisse erzielt werden. So konnte mit PCR laut Literatur lediglich eine Nachweisgrenze für Bierschädlinge von 10^5 KBE aus 20 ml Unfiltratlösung erreicht werden. Zudem ergaben sich für das angewendete Verfahren mit einer Rückspülung der Filter und anschließender Aufnahme der resuspendierten Keime deutliche Hinweise auf einen Verlust von Zellmaterial im Zuge der Probenaufbereitung. Für den Fluoreszenz-Nachweis von Keimen bieten sich ebenfalls interessante Ansätze. Insgesamt konnte im Rahmen der bis dato in der Literatur dargelegten Untersuchungen noch keine praxistaugliche Methodik entwickelt werden [HUTTER et al. 2003].

Weitere Nachteile der PCR liegen in den hohen Anforderungen an die Probenaufbereitung, bei der ein Zutritt von Fremd-DNA ausgeschlossen sein muss, und auch in der fehlenden Möglichkeit zur Unterscheidung von lebenden und toten Keimen, die ebenfalls zu falsch-positiven Befunden durch den Nachweis von freier DNA oder von DNA aus toten Zellen führen kann [BARNEY und KOT 1992]. Daher wird mit dem Ziel, eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Keimen durch eine ggf. erfolgreiche Organismenvermehrung zu ermöglichen, üblicherweise eine 1- bis 2-tägige Anreicherung nach der erfolgten KZE durchgeführt, um durch ein verstärktes PCR-Signal einen Hinweis auf vermehrungsfähige Zellen in der Probe zu erhalten. Quieszente Zellen können allerdings auch mit dieser Verfahrensweise nicht erfasst werden [MÜCHER und SCHÖNLING 2000, MOCK 2001, HOMANN et al. 2002, BRANDL et al. 2003].

3 Material und Methoden

3.1 Silizium-Membranfilter

Die Gesamtstruktur der Silizium-Membranfilter besteht aus einer Siliziumschicht mit rückseitigen Kammern, die die stabilisierende Grundstruktur der Filter darstellt, und der eigentlichen filtrationswirksamen Porenmembran in einer Siliziumnitridschicht auf der Oberseite der Filter (vgl. Abb. 3-1, links) [KÖHLER 1998, VÖLKLEIN und ZETTERER 2000]. Die Materialstärke der gesamten Schichtstruktur liegt bei ca. 490 μm , die Siliziumnitrid-Porenmembran besitzt eine Dicke von lediglich 0,8 μm (vgl. Abb. 3-1, rechts). Für die Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Silizium-Membranfilter mit mittleren Porendurchmessern von 0,50 bis 3,64 μm eingesetzt. Für das Minimum bzw. Maximum der Porengrößenverteilung gibt der Hersteller eine maximale Schwankungsbreite von +/-10% bezogen auf den mittleren Porendurchmesser an.

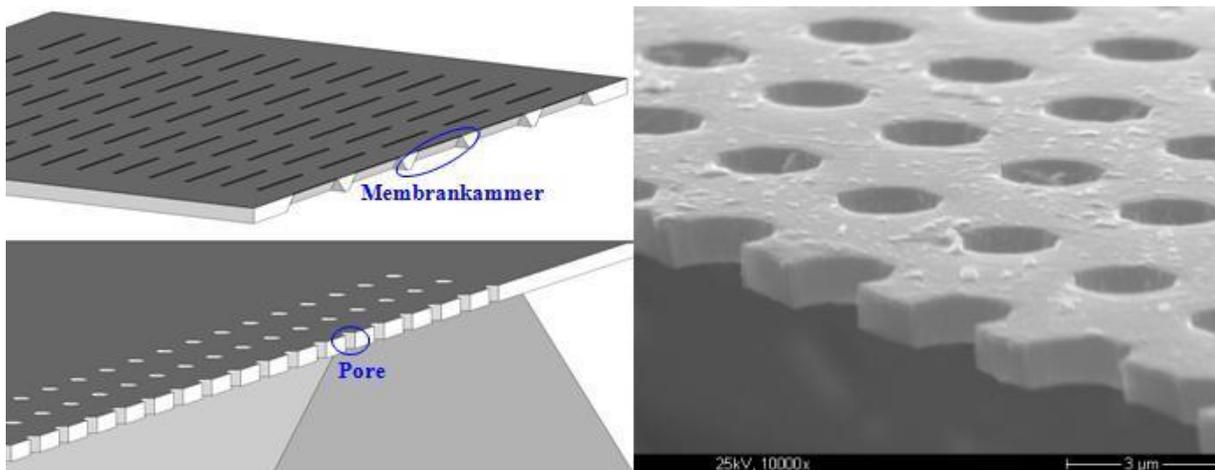


Abb. 3-1: Struktureller Aufbau (links) und Siliziumnitrid-Porenmembran (rechts) eines von Silizium-Membranfilters

Mikrosiebe wie Silizium-Membranfilter werden von noch mindestens einem weiteren Anbieter hergestellt, folgen in ihrer Auslegung aber einer anderen Konzeption und Konstruktion [KUIPER et al. 1998, KUIPER et al. 2002a, KUIPER et al. 2002b, VAN RIJN 2004, BRANS et al. 2006].

Struktureigenschaften von Silizium-Membranfiltern

Nachdem sich aus den Ergebnissen der Untersuchungen zu den Trenngrenzen (vgl. Kap. 4) von Silizium-Membranfiltern Zweifel an der Belastbarkeit der vom Hersteller mitgeteilten Vermessungsdaten für die Filter ergeben hatten, wurden begleitend zur vorliegenden Arbeit eigene Blasendruckmessungen zur Validierung der Filterstruktur durchgeführt.

Die Bestimmung des Blasendrucks erfolgte entsprechend der Vorgaben von DIN 58355-2 „Membranfilter – Prüfung des Blasendrucks“ [DIN 1990, BAST 2001]. Bei dem auch in der betrieblichen Praxis für die Überwachung von Membranfiltersystemen etablierten Blasendrucktest (Bubble-Point-Test) erfolgt eine Messung des Gasdrucks, der erforderlich ist, um die Kapillarwirkung zwischen einem Benetzungsmittel und der benetzten Porenmembran zu überwinden und das Benetzungsmittel aus der größten Pore zu verdrängen [JAKOBS und KOROS 1997, PMI 1998, RIPPERGER 1992]. Mit der Messung werden anders als bei der REM-Vermessung nicht nur 10 Poren stichprobenartig vermessen, sondern die gesamte Filterstruktur des untersuchten Filters erfasst und auf maximale Porengröße(n) und Integrität geprüft [STAUDE 1992, OHLROGGE und EBERT 2006].

Durch Korrelation der Ergebnisse aus den Blasendrucktests mit einem Äquivalent-Kreisdurchmesser (berechnet aus der Fläche der Öffnung in der Siliziumnitrid-Membran gemäß REM-/CAD-Vermessung) bei zugeordneten Membran-Defekten wurde eine nahezu ideale Übereinstimmung zwischen Messwertepaaren von Blasendruck und Defekt-Abmessungen sowie dem Kurvenverlauf der Cantor-Gleichung ($d_p = 4 \cos \theta / \Delta p$) nachgewiesen (vgl. Abb. 3–2) [STAUDE 1992, GAUB 1993a+b, DRIOLI 2006]. Damit bleibt festzuhalten, dass durch die Cantor-Gleichung die Beziehung von Blasendrücken und Porenabmessungen bei den Poren von Silizium-Membranfiltern sehr gut beschrieben wird.

Da bei allen 42 untersuchten Filtern mindestens ein Blasendruckmesswert von $< 1,3$ bar gemessen wurde, kann nach Umrechnung mit der Cantor-Gleichung für jeden der untersuchten Filter mindestens eine Pore bzw. ein Defekt mit einem Durchmesser von etwa $0,75 \mu\text{m}$ angenommen werden. Für die bei zahlreichen Filtern gemessenen Blasendrücke $< 1,2$ bar bzw. $< 1,0$ bar ergeben sich analog

Porendurchmesser von $> 0,82 \mu\text{m}$ bzw. $> 0,98 \mu\text{m}$. Da zu den untersuchten Silizium-Membranfiltern auch mehrere Filter mit mittleren Porendurchmessern zwischen $0,50 \mu\text{m}$ und $0,65 \mu\text{m}$ zählten, muss festgehalten werden, dass die ursprünglichen Angaben des Herstellerunternehmens zur Beschaffenheit der Filter (Porengrößenverteilung: $\pm 10\%$ um den mittleren Porendurchmessers) für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Silizium-Membranfilter nicht allgemein gültig waren.

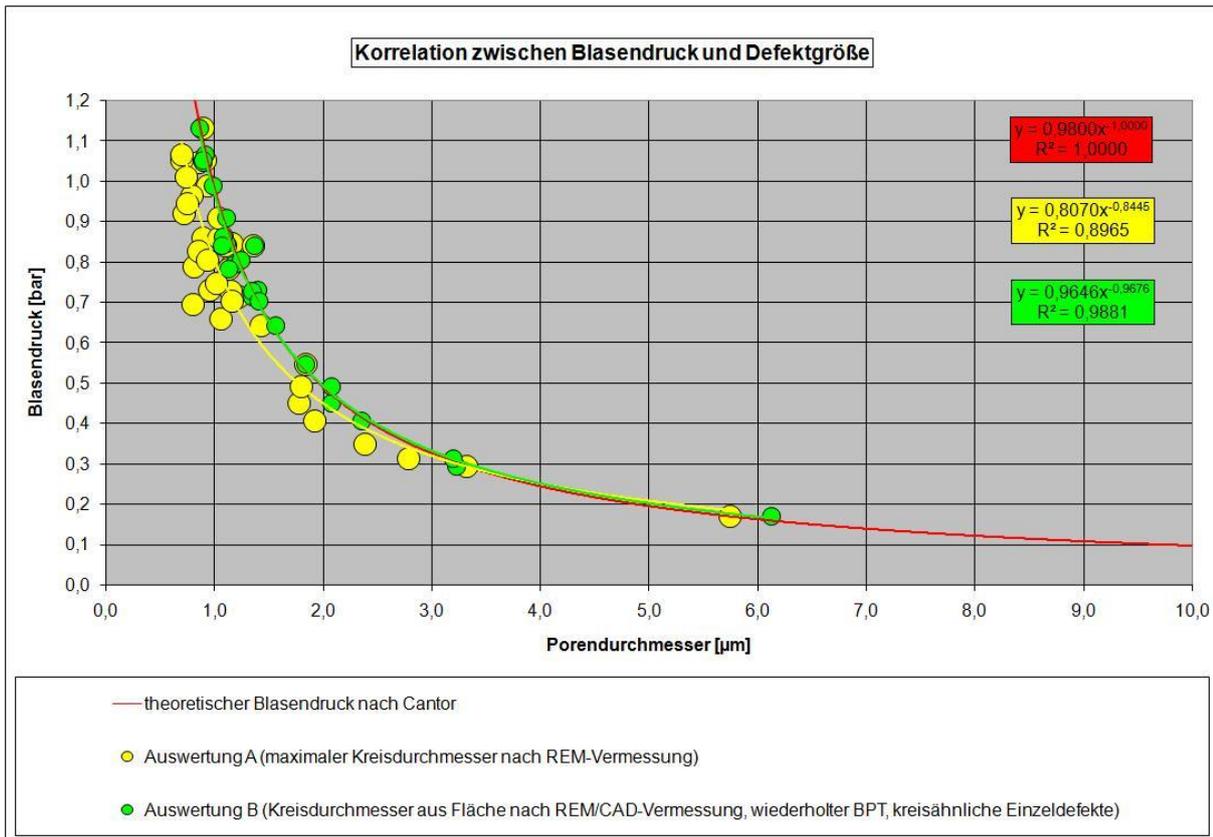


Abb. 3-2: Korrelation zwischen Blasendruck und Defekt-Abmessungen bei Silizium-Membranfiltern

3.1.1 Chemische Beständigkeit von Silizium-Membranfiltern

Nachdem für die Silizium-Membranfilter zu Projektbeginn auf Basis der Informationen vom Herstellerunternehmen eine ausreichende chemische Beständigkeit für Anwendungen in der Brau- und Getränkeindustrie angenommen worden war, ergaben sich während des Versuchsbetriebs Zweifel an dieser Einschätzung [KÖTKE 2003]. Daher wurden begleitend zur vorliegenden Arbeit eine Literaturrecherche und eigene Untersuchungen zu dieser Thematik durchgeführt.

Bei den aus der Bierfiltration resultierenden Verschmutzungen an Membranfiltern handelt es sich überwiegend um organische Substanzen (Proteine, Protein-Gerbstoff-Komplexe, hochmolekulare Kohlenhydrate, Mikroorganismenzellen, etc.) [MEIER et al. 1995, FILLAUDEAU 1999, FILLAUDEAU und CARRERE 2002, BRANTLEY 2005, HARTMANN 2006]. Wegen ihrer grundsätzlich sehr günstigen Eigenschaften zur Entfernung von organischen Ablagerungen bietet sich Natronlauge (Natriumhydroxid) für die Regeneration der Filter an [HINRICHS und STAHL 1995, SCHMIDT 1995b, GEIGER et al. 1997]. Für die Entfernung insbesondere von hartnäckigen Verunreinigungen auch aus der inneren Porenstruktur von Membranfiltern kann die alkalische Reinigungswirkung zusätzlich durch kombinierte Anwendung mit einer oxidierenden Wirkkomponente verstärkt werden [LEONEL et al. 1994, GAN et al. 1997, GAN et al. 2001]. Während in der Brau- und Getränkeindustrie üblicherweise Anwendungskonzentrationen von 1,5 bis 2,0% NaOH eingesetzt werden, sollten bei der Membran-Regeneration mit Natriumhydroxid und Wasserstoffperoxid bereits Konzentrationen zwischen 0,3 und 0,5% bei einer Temperatur von 60°C günstige Reinigungsergebnisse liefern [BIRD und FRYER 1992, KRETSCH 1994, SCHMIDT 1995a, DUCA 1999, GAN et al. 1999].

Die kombinierte Anwendung von Alkali und Oxidationsmittel wird auch in der betrieblichen Praxis von den führenden Herstellern von Cross-Flow-Membranfiltrationssystemen für die kieselgurfreie Bierfiltration bei der Regeneration ihrer Polyethersulfon-Membranen genutzt (Pall, PROFI-CMF-System; Norit, BMF-200-Filtermodule; Alfa-Laval & Sartorius, Alfa Bright Crossflow-Filtration-System mit AlfaSartocon®-Filterkassetten) [VAN HOOFF et al. 2000, DENNIGER et al. 2003, SNYDER und GAUB 2005, SCHWARZ et al. 2005, VOIGT und DE WIT 2007].

Hinsichtlich der chemischen Beständigkeit von Silizium-Membranfiltern sind das Silizium der Grundstruktur, das Siliziumnitrid der Porenmembran und das native Siliziumoxid auf der Silizium-Oberfläche in die Betrachtung einzubeziehen. Für Siliziumdioxid und Siliziumnitrid ist eine sehr hohe, aber nicht vollständige Beständigkeit gegenüber wässrigen Alkalilaugen dokumentiert [VÖLKLEIN und ZETTERER 2000, MENZ et al. 2005, GERLACH und DÖTZEL 2006]. Dagegen muss bei Silizium für die in der Lebensmittelindustrie übliche Form der Anwendung von Alkalien mit Korrosion gerechnet werden [GREENWOOD und EARNSHAW 1988,

HEUBERGER 1991, MESCHEDER 2004, SCHWISTER 2005]. Gegenüber den in der Lebensmittelindustrie für Reinigungszwecke eingesetzten Säuren sollten sowohl Silizium als auch Siliziumdioxid und Siliziumnitrid unlöslich sein [MOSS und LEDWITH 1987, NEUMÜLLER 1987, HADAMOVSKY 1990, BÜTTGENBACH 1994].

Die wenigen verfügbaren Informationen zur chemischen Beständigkeit von Silizium-Mikrosieben gehen sämtlich auf eine Kooperation zwischen der University of Twente und Aquamarijn Microfiltration BV bzw. Fluxxion BV zurück, wobei hier Mikrosiebe mit einer filtrationswirksamen Porenmembran aus Siliziumnitrid und einer mit Siliziumnitrid-Schutzschicht beschichteten Grundstruktur genutzt wurden [LYKO 2005]. Diese Silizium-Membranfiltern werden überwiegend als chemisch inert beschrieben [KUIPER et al. 1998, KUIPER et al. 2002a, KUIPER et al. 2002b, VAN RIJN 2004], lediglich in einer Literaturquelle ergeben sich Hinweise auf eine nicht vollständige Beständigkeit [BRANS et al. 2006]. Für diese Filter wird eine chemische Regeneration durch eine kombinierte alkalisch-oxidative Reinigung (1% Natriumhydroxid, 2% Wasserstoffperoxid, 40°C, 30 min) beschrieben [HUTTER et al. 2003]. Für eine solche kombinierte alkalisch-oxidierende Reinigung (2% Natriumhydroxid, 2% Wasserstoffperoxid), 60°C (40 bis 80°C), 30 min (bis 90 min) wurden auch im eigenen Versuchsbetrieb die günstigsten Reinigungsergebnisse erzielt.

In den Untersuchungen zur chemischen Beständigkeit von Silizium-Membranfiltern wurden die als Probestücke eingesetzten Silizium-Membranfilter im temperierten Dauerkontakt mit den Wirksubstanzen (Natronlauge, Wasserstoffperoxid, Mineralsäuren, Bier) gelagert. Die Prüfung auf Materialabtrag erfolgte für die Silizium-Grundstruktur durch gravimetrische Kontrolle und für die Siliziumnitrid-Porenmembran durch Vermessung von Strukturen und Schichtdicke.

Für den Dauerkontakt von Silizium-Membranfiltern mit Natronlauge wurde ein Masseverlust der Silizium-Grundstruktur festgestellt. Zudem wurde in den Versuchen nach Alkalien-Dauerkontakt auch Korrosion am Siliziumnitrid der Porenmembran in Form von Porenaufweitung und Schichtdickenabnahme nachgewiesen. An Silizium-Membranfiltern wurde nach Dauerkontakt mit Natronlauge und Wasserstoffperoxid ein gegenüber dem reinen Alkali-Einsatz deutlich reduzierter Masseverlust an der Silizium-Grundstruktur, jedoch eine verstärkte Korrosion an der Siliziumnitrid-Porenmembran festgestellt. Für den alleinigen Einsatz von Wasserstoffperoxid wurde

ebenfalls eine Porenaufweitung ohne einen Masseverlust der Silizium-Grundstruktur ermittelt. Gegenüber Säuren und Bier zeigten sich die Filter beständig.

Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass die ursprüngliche Annahme einer ausreichenden chemischen Beständigkeit der Silizium-Membranfilter für einen Einsatz in der Brauerei- und Getränkeindustrie nicht pauschal aufrecht erhalten werden kann. Somit könnte auch an den im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Filter zumindest im Zuge der alkalisch-oxidativen Regeneration eine nicht definierte Veränderung der Filterstruktur aufgetreten sein. Gerade mit Blick auf spätere Praxisanwendungen sind hinsichtlich der chemischen Beständigkeit der Silizium-Membranfilter Lösungen erforderlich, um zukünftig einen Masseverlust an der Silizium-Grundstruktur, eine Verringerung der Siliziumnitrid-Schichtdicke und insbesondere eine Aufweitung der Poren zu vermeiden, so dass definierte Materialeigenschaften (Druckbeständigkeit, Trennwirkung) gewährleistet sind.

3.1.2 Permeabilität von Silizium-Membranfiltern für Wasser

Für Durchsatzraten von Silizium-Membranfiltern anderer Hersteller finden sich vereinzelte Angaben in der Literatur [GIRONES et al. 2005, GIRONES et al. 2006]. In eigenen Untersuchungen von Durchflussraten für entsalztes Wasser durch einen oder vier Silizium-Membranfiltern konnten aus den Messergebnissen mittlere Durchflüsse von 6,7 l/(h bar) für die Porengröße 0,59 µm und 16,1 l/(h bar) für die Porengröße 1,15 µm abgeleitet werden. Für die Porengröße 2,16 µm wurden je nach Bestückung (1 oder 4 Filter) Durchflüsse zwischen 120 und 165 l/h gemessen (vgl. Abb. 3–3). Für die Durchsatzmessungen mit Wasser ergab sich erwartungsgemäß eine nahezu lineare Abhängigkeit des Durchflusses vom transmembranen Druck [RIPPERGER1992]. Die Messungen wurden in weitgehender Übereinstimmung mit DIN 58355-1 „Membranfilter – Teil 1: Prüfung der spezifischen Durchflussrate von Flüssigkeiten für Flachfilter“ durchgeführt [DIN 2005]. Da die Silizium-Membranfilter gegenüber den in der Norm beschriebenen Filtern abweichende Abmessungen besitzen, war in Details eine Adaption des Versuchsaufbaus und der Versuchsdurchführung erforderlich.

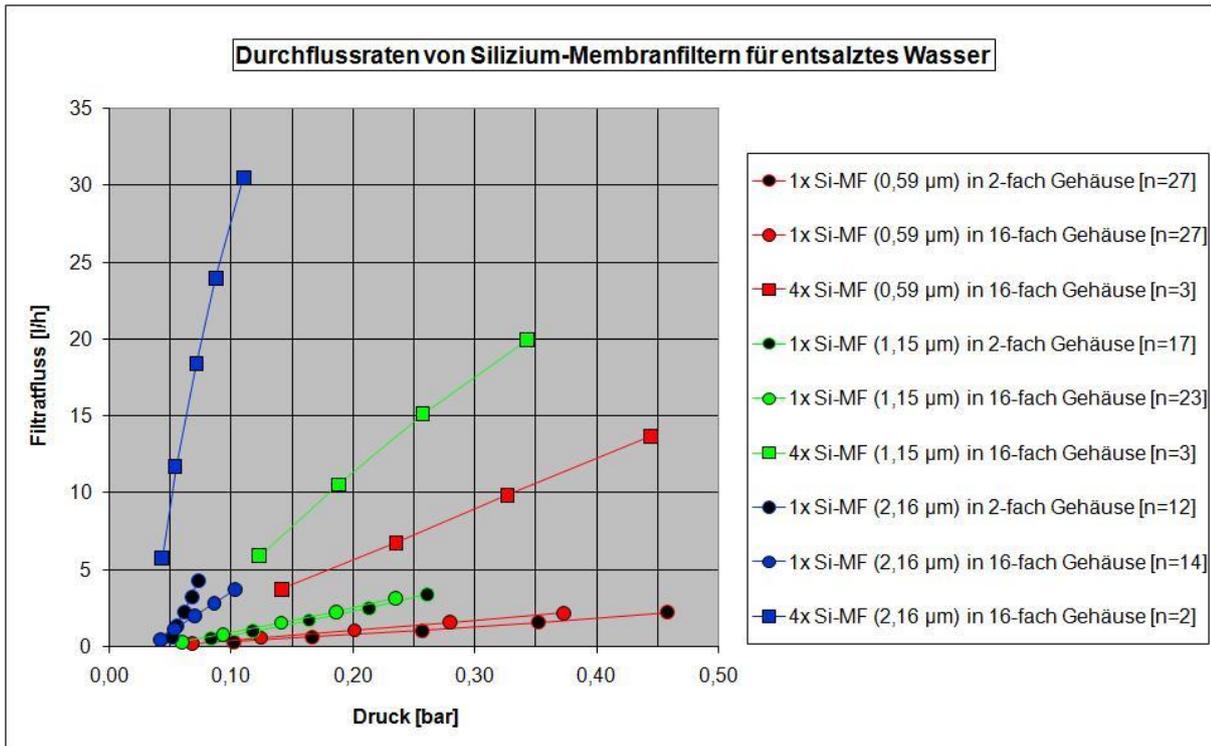


Abb. 3-3: Durchflussraten von Silizium-Membranfiltern für entsalztes Wasser

Die angegebenen Durchflussraten beziehen sich jeweils auf einen Silizium-Membranfilter. Eine flächenbezogene Angabe ist abhängig von der Auslegung des Begriffs der „effektiven Filterfläche“. Wird die gesamte im Filtrationsbetrieb an- bzw. überströmte Fläche (225 mm²) als effektive Filterfläche eines Silizium-Membranfilters angesehen, so ergibt sich für einen Filter der Porengröße 0,59 µm ein mittlerer Durchfluss von ca. 29800 (l/ h m² bar). Wird dagegen nur die filtrationswirksame Fläche der Porenmembran (15,75 mm²) eines Silizium-Membranfilter als „effektive Filterfläche“ angesehen, so ergibt sich für einen Filter der Porengröße 0,59 µm ein mittlerer Durchfluss von ca. 425.000 l/(h m² bar). Für gängige Membranfilter für die kaltsterile Bierfiltration aus unterschiedlichen Polymerwerkstoffen (PES, PVDF, Nylon) mit einer nominalen Porengröße von 0,65 µm schwanken Angaben zwischen 10.000 und 25.000 l/(h m² bar). Für Membranfilter aus Cellulosenitrat für Laboranwendungen werden Werte in Höhe von 78.000 l/(h m² bar) genannt. Der Vergleich der Messwerte für Silizium-Membranfilter mit einem mittleren Porendurchmesser von 0,59 µm macht deutlich, wie bedeutsam die Definition der „filtrationswirksamen Fläche“ ist. Grundsätzlich wird deutlich, dass die Silizium-Membranfilter bereits im aktuellen Layout, das nur einen geringen Anteil an

filtrationswirksamen Flächen berücksichtigt, bereits vergleichbare (effektive Filterfläche = Gesamtfläche) bzw. deutlich höhere Durchflussraten (effektive Filterfläche = filtrationswirksame Fläche) als etablierte Membranfilter aufweisen. Die Ursache dürfte in der geringen Materialstärke der Siliziumnitrid-Porenmembran von nur ca. 800 nm liegen, wodurch die Porenkanäle dem Volumenstrom des Wassers durch die Membrane einen im Vergleich zu gängigen Membranfiltern geringen Widerstand entgegensetzen sollten (vgl. nach Hagen-Poiseuille: $V/t = (\pi r^2 z A r^2 \Delta p) / (8 \eta l)$) [STAUDE 1992, RIPPERGER 1992].

In ersten Versuchen mit vorfiltriertem Verkaufsbier wurde trotz der nur geringen Trübung des Mediums eine deutliche Abnahme der Durchflüsse im Vergleich zu Wasser festgestellt, die einerseits auf die höhere Viskosität des Bieres bei den niedrigen Prozesstemperaturen (< 4°C) während der Filtration zurückzuführen ist, vorrangig aber durch die Verblockung der Membranstruktur durch Bierinhaltsstoffe hervorgerufen wird.

3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

3.2.1 Bestimmung von Trenngrenzen

Geräte und Verbrauchsmaterialien (Rückhaltevermögen – Probenvorbereitung)

- Mikroskop Standard 25, Hellfeld, 160-/640-fache Vergrößerung, Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Jena
- Zählkammern nach Thoma für die Auszählung von Hefen und Bakterien, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
- nominelle Kammertiefe für die Auszählung von Hefen: 0,1 mm
- nominelle Kammertiefe für die Auszählung von Bakterien: 0,02 mm
- Labor-Gasbrenner
- Trockenschrank, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
- Glaswaren, Schott AG, Mainz
- Silikonstopfen, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Zellstoff-Einmal-Stopfen, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Aluminiumfolie
- steriles, demineralisiertes Wasser, hausinterne Versorgung
- Natriumchlorid, 99,5%, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

- Vollpipetten, 10ml, 50 ml, 100 ml, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
- Messpipetten, 10ml, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
- Transferpipetten 25 µl, 250 µl, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
- Pipettenspitzen, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Ethanol, 70% und 96%

Geräte und Verbrauchsmaterialien (Rückhaltevermögen – Probenfiltration)

- Dead-End-Filtergehäuse aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) mit 5 Montageplätzen für Silizium-Membranfilter, NFT GmbH, München (vgl. Abb. 3–4, Abb. 3–5)
- Teflon-FEP-Schlauch, Außen-/Innendurchmesser 6/4 mm, Carls Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Diverse Armaturen (Kugelventile, Rückschlagventil, Verbinder, etc.), Edelstahl (flüssigkeitsseitig) oder Messing, vernickelt (gasseitig), Landefeld Druckluft und Hydraulik GmbH, Kassel
- Labjack U12 USB-Mess- und Steuer-Modul mit externem Relais-Modul ME-UBRE, Meilhaus Electronic GmbH, Puchheim
- Diverse Elektronik-Bauteile (Messverstärker, Trennverstärker, Signalwandler), u.a. Rinck Electronic GmbH, Rotenburg
- Personal-Computer mit Windows Betriebssystem und LabView 6.0 Steuerungssoftware, National Instruments Germany GmbH, München
- Gasfilter Sartorius Midisart 2000, 0,2 µm, PTFE, Sartorius AG, Göttingen
- Dampftopf DDG 40, Guwina-Hoffmann GmbH, Berlin
- Lötlampe Soudogaz X 2000, Caming Gaz GmbH, Hungen-Inheiden.
- Elektronische Präzisionswaage, Sartorius 1213 MP, bis 3000 g, Sartorius AG, Göttingen

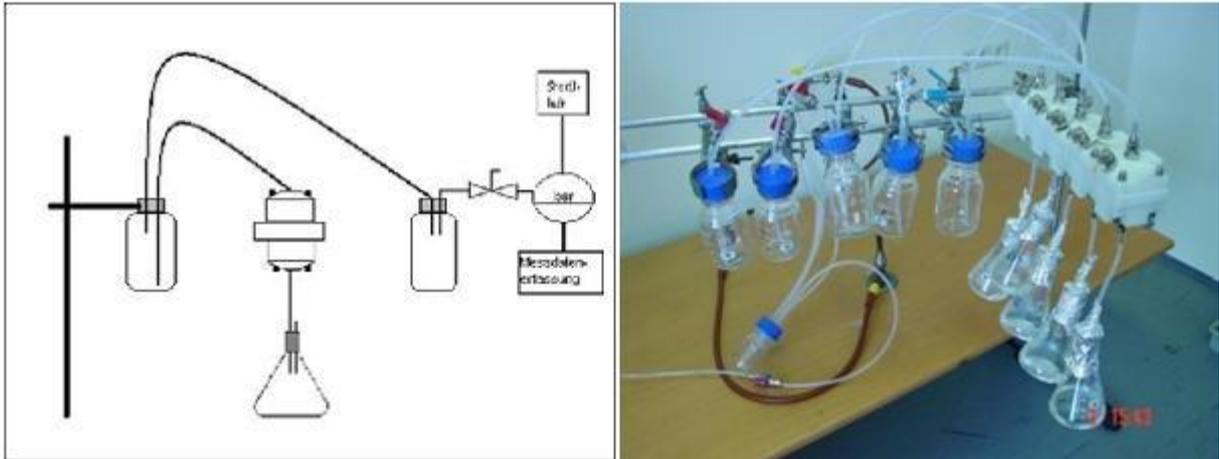


Abb. 3-4: Testfiltrationsanlage zur Bestimmung von Rückhalteraten von Silizium-Membranfiltern

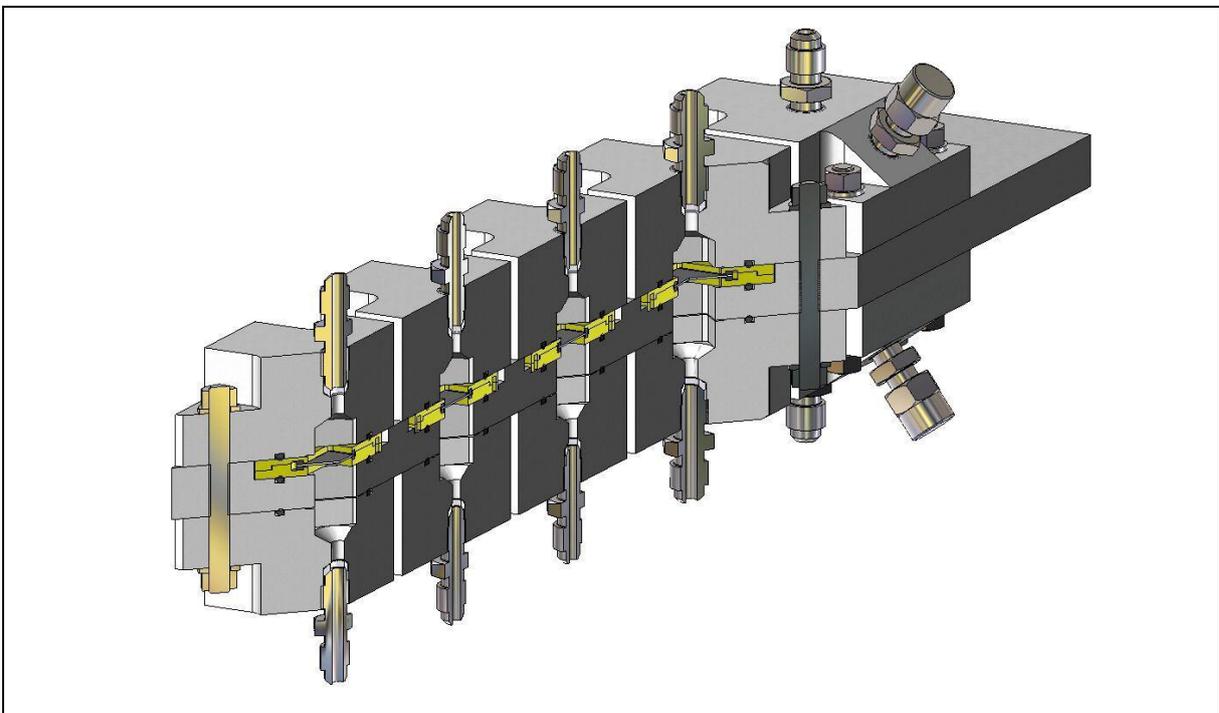


Abb. 3-5: Filtergehäuse der Testfiltrationsanlage für die Bestimmung von Rückhalteraten von Silizium-Membranfiltern

Geräte und Verbrauchsmaterialien (Rückhaltevermögen – Probenverarbeitung)

- Mehrfach-Vakuumfiltrationsgerät, Sartorius AG, Göttingen
- Cellulosenitrat-Membranfilter
- für Hefen: 0,65 μm , Sartorius AG, Göttingen
- für Bakterien: 0,45 μm , Sartorius AG, Göttingen

- Labor-Gasbrenner
- Glaswaren, Schott AG, Mainz
- Pinzette, Watte
- Petrischalen, 92x16 mm, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
- Würzeagar, Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität BLQ, Freising
- NBB-Agar, Döhler Gruppe, Darmstadt
- Diphenyl, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Anaerokult A, Merck KGaA, Darmstadt
- Anaerotest, Merck KGaA, Darmstadt
- Anaeroben-Behälter, Merck KGaA, Darmstadt
- Binokular Wild M7A, Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz
- Koloniezählgerät, Schuett-Biotec GmbH, Göttingen
- Brut- und Trockenschrank, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach

3.2.2 Schnellnachweisverfahren mit Silizium-Membranfiltern

Geräte und Verbrauchsmaterialien (Fluoreszenzfärbung)

- Petrischalen mit Nocken, 35 mm, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Rotilabo Zentrifugenröhrchen, 15 ml und 50 ml, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Rotilabo Spritzenfilter 0,22 µm, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Sterican Kanüle, 0,55 x 25 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- Brutschrank, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
- Digitales Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ 8000, Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg

Geräte und Verbrauchsmaterialien (Fluoreszenzfärbung und PCR – Probenfiltration)

- Dead-End-Filtergehäuse aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) mit 5 Montageplätzen für Silizium-Membranfilter, NFT GmbH, München (vgl. Abb. 3–4, Abb. 3–5)
- Teflon-FEP-Schlauch, Außen-/Innendurchmesser 6/4 mm, Carls Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Diverse Armaturen (Kugelventile, Rückschlagventil, Verbinder, etc.), Edelstahl (flüssigkeitsseitig) oder Messing, vernickelt (gasseitig), Landefeld Druckluft und

Hydraulik GmbH, Kassel

- Gasfilter Sartorius Midisart 2000, 0,2 µm, PTFE, Sartorius AG, Göttingen
- Labjack U12 USB-Mess- und Steuer-Modul mit externem Relais-Modul ME-UBRE, Meilhaus Electronic GmbH, Puchheim
- Diverse Elektronik-Bauteile (Messverstärker, Trennverstärker, Signalwandler), u.a. Rinck Electronic GmbH, Rotenburg
- Personal-Computer mit Windows Betriebssystem und LabView 6.0 Steuerungssoftware, National Instruments Germany GmbH, München
- Elektronische Präzisionswaage, Sartorius 1213 MP, bis 3000 g, Sartorius AG, Göttingen
- Diverse Glaswaren, Schott AG, Mainz

Geräte und Verbrauchsmaterialien (PCR)

- Zentrifuge, Biofuge pico, Heraeus Instruments, Hanau
- Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
- Minishaker für 1,5 und 2,0 ml Safe Lock Tubes, IKA MS-1
- Vortex Genie 2, Scientific Instruments, Bohemia, New York, USA
- Autopipetten 10/20/100/200/1000µl, Gilson, Frankreich
- Pipettenspitzen 10/20/100/200/1000µl, Gilson, Frankreich
- Eppendorf Tubes 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg
- Thermocycler PTC-100; MJ Research, Biozym, Oldendorf
- iCycler IQ, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- PCR Plates Thermo Fast 96-Well, PeqLab, Erlangen
- Optical Sealing Tapes, BioRad, Hercules, Californien, USA
- Autopipetten 10/20/100/200/1000µl, Gilson, Frankreich
- Pipettenspitzen 10/20/100/200/1000µl, Gilson, Frankreich
- Eppendorf Tubes 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg

3.3 Reagenzien und Chemikalien

3.3.1 Bestimmung von Trenngrenzen

- PBS-Puffer, eigener Ansatz
- Ethanol, C₂H₅OH, 96%, reinst, Anwendungskonzentration 70% [V/V], Merck KGaA, Darmstadt
- Diphenyl, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

3.3.2 PCR & Fluoreszenz

Reagenzien und Chemikalien (Fluoreszenzfärbung)

- Phosphat-gepufferte Saline, hausinterner Standard
- iVybant CFDA-SE Cell Tracer Kit, Invitrogen, Paisley, UK
- 4',6-Diamidino-2-phenylindol, DAPI, AppliChem GmbH, Darmstadt
- Propidiumiodid, PI, AppliChem GmbH, Darmstadt

Reagenzien und Chemikalien (Fluoreszenzfärbung und PCR)

- PBS-Puffer, eigener Ansatz
- Kohlendioxid Biogon C, Linde AG, Unterschleißheim
- Druckluft, steril, Hausversorgung

Reagenzien und Chemikalien (PCR)

- GEN-IAL First Beer Magnetic DNA Kit, GEN-IAL GmbH, Troisdorf
- GEN-IAL First-Beer PCR Kit, GEN-IAL GmbH, Troisdorf
- GEN-IAL First-Yeast Primermix H Realtime PCR Kit, GEN-IAL GmbH, Troisdorf
- Ampuwa, Wasser für Injektionszwecke, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg

3.4 Testorganismen

3.4.1 Bestimmung von Trenngrenzen

- *Saccharomyces carlsbergensis* (Kulturhefe)
- *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*
- *Saccharomyces exiguus*
- *Debaryomyces hansenii*
- *Lactobacillus brevis*

- *Pediococcus damnosus*

3.4.2 PCR & Fluoreszenz

- *Saccharomyces carlsbergensis*
- *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*
- *Saccharomyces exiguus*
- *Lactobacillus brevis*
- *Pediococcus damnosus*

3.5 Methodik der Bestimmung des Rückhaltevermögens von Silizium-Membranfiltern

Als Basis für die Durchführung der Prüfung des mikrobiellen Rückhaltevermögens von Silizium-Membranfiltern diene DIN 58355, Teil 3 „Membranfilter – Bakterienrückhaltevermögen für Flachfilter – Anforderungen und Prüfung“.

3.5.1 Prüfung des Rückhaltevermögens mittels Challenge-Test

Für die Prüfung des Rückhaltevermögens von Membranfiltern wurden standardisierte Filtrationstests entwickelt, um für Filter eine Bewertung und einen Vergleich hinsichtlich ihrer Eignung zur Lösung konkreter filtrationstechnischer Problemstellungen zu ermöglichen. Dazu zählt die Vorschrift der Health Industries Manufacturers Association (HIMA) zur Durchführung des Bacteria-Challenge-Tests ebenso wie DIN 58355, Teil 3 „Membranfilter – Bakterienrückhaltevermögen für Flachfilter – Anforderungen und Prüfung“, die der HIMA-Norm weitgehend entspricht [HIMA 1982, DIN 58355 – Teil 3 1990]. Die Anwendung standardisierter Filtrationstest ist erforderlich, weil zahlreiche Versuchsparameter (Art und Zustand der Testkeime, Testkeimdichte, Probemenge, Probenverarbeitung und -auswertung, Medium, Filtrationsparameter) einen wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis des Rückhaltetests haben. Die Trenngrenzenbestimmung durch Filtrationsversuche mit Testkeimsuspensionen nach den genannten Normen ist die einzig praxisnahe und am weitesten verbreitete Vorgehensweise für die Bestimmung von Trenneigenschaften bzw. des Rückhaltevermögens von Filtermembranen. Dazu wird beim Bacteria-Challenge-Test unter definierten Versuchsbedingungen ein definiertes Volumen von Testsuspension mit einer vorgegebenen Konzentration an aktiv wachsenden Testkeimen über den zu untersuchenden Filter filtriert, das Filtrat

aufgefangen und im Anschluss auf Organismenwachstum untersucht, um bewerten zu können, in welchem Maße eine bestimmte Teilchengrößenklasse durch einen Filter zurückgehalten wird.

Sowohl die HIMA-Vorschrift als auch die DIN stellen für die Einstufung als „Sterilfilter“ hohe Anforderungen an das Rückhaltevermögen der Filter. Da die Filtertestverfahren ursprünglich für die pharmazeutische Industrie entwickelt wurden, liegt die Zellkonzentration in den Tests deutlich höher als bei den meisten Anwendungen in der Brau- und Getränkeindustrie. Nach DIN 58355 ist das Rückhaltevermögen eines Filters für eine bestimmte nominale Porenweite dann gegeben, wenn bei der Beaufschlagung einer effektiven Filterfläche von 1 cm^2 mit 1×10^7 KBE der für die betrachtete Porenweite spezifischen Testorganismen ein steriles Filtrat erhalten wird. Die Höhe der Beaufschlagung richtet sich dabei überschlägig nach der Anzahl der Poren im Filtermaterial und der Vorgabe, dass jede Pore mit einem Testkeim beaufschlagt werden soll. Da herkömmliche Membranen etwa 10^6 bis 10^8 Poren auf 1 cm^2 Filterfläche besitzen, wird eine Beaufschlagung mit 10^7 KBE pro cm^2 effektiver Filterfläche angestrebt. Mitunter erfolgt die Kalkulation der Beaufschlagung mit Testkeimen auch flächenbezogen [RIPPERGER 1992].

In der DIN-Vorschrift werden für die nominale Porenweite $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ *Pseudomonas diminuta* und für $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ *Serratia marcescens* als Testorganismen genannt [BACK 1994c, STAUDE 1992]. Da die in der Brauerei auftretenden bierschädlichen Bakterien nicht so kleinzellig sind wie diese gram-negativen Testkeime, sollten für die Überprüfung des Rückhaltevermögens von Filtern für die Bierfiltration Testorganismen verwendet werden, die als repräsentativ für typische Schädlinge im Verkaufsbier angesehen werden können [BACK 1994c]. Dieses trifft z.B. auf *Lactobacillus brevis* und *Saccharomyces cerevisiae* zu, die in der Literatur auch als Testorganismen für die nominalen Porengrößen $0,65 \text{ }\mu\text{m}$ (*L.brevis*), $0,80 \text{ }\mu\text{m}$ und $1,20 \text{ }\mu\text{m}$ (jeweils *S.cerevisiae*) genannt werden [RIPPERGER 1992, CHERYAN 1998]. Neben der Festlegung der Trenngrenze und der nominalen Porengröße anhand der Ergebnisse aus Filtrationstests können weitere Kennzahlen für das Rückhaltevermögen (Keimreduzierung (Logarithmic Reduction Value, LRV), β -Ratio, prozentuale Rückhalterate) aus den Ergebnissen von Filtrationsversuchen berechnet werden [RIPPERGER 1992, GAUB 1993a].

3.5.2 Auswahl von Testorganismen

Primäres Ziel der Versuche zur Bestimmung des Rückhaltevermögens von Silizium-Membranfiltern war es, für die unterschiedlichen Problemstellungen der biologischen Betriebsüberwachung in der Brau- und Getränkeindustrie Silizium-Membranfilter mit einer geeigneten Porengröße zuzuordnen. Daher wurden typische bierschädliche Mikroorganismen als Testkeime eingesetzt: die untergärige Kulturhefe *Saccharomyces carlsbergensis*, die Schadhefen *Saccharomyces cerevisiae varians diastaticus*, *Saccharomyces exiguus* und *Debaryomyces hansenii*, die bierschädlichen Milchsäurebakterien *Lactobacillus brevis* und *Pediococcus damnosus* [BACK 1994c].

Die untergärige Brauereihefe *Saccharomyces carlsbergensis* hat ebenso wie die obergärige Brauereihefe *Saccharomyces cerevisiae* üblicherweise eine Größe von (5 bis 10) x (5 bis 12) μm und eine rundliche bis ovale Zellform. Es treten aber auch Variationen hinsichtlich der Zellform (elliptisch, zylindrisch, gestreckt) und Größe (ab 3,5 μm , bis 20 μm) auf. Die untergärige Brauereihefe liegt ganz überwiegend in Form von Einzelzellen vor, nur sehr selten treten auch Zellverbände auf. Agglomerate sind dagegen häufiger [BACK 1994a, EBC 1999]. *Saccharomyces cerevisiae varians diastaticus* hat im Vergleich zur Kulturhefe überwiegend etwas kleinere Zellen, die gemeinhin eine ovale, elliptische bis zylindrische Form besitzen, aber auch langgestreckt sein können. Sprossverbände sind mehrheitlich geradlinig und bestehen oft nur aus wenigen Zellen. *Saccharomyces cerevisiae varians diastaticus* ist in der Brauerei eine gefürchtete Schadhefe, die unter Brauereibedingungen erfolgreich mit der Kulturhefe konkurrieren kann und als obligater Bierschädling eingestuft wird [JÄHRIG und SCHADE 1993, BACK 1994a]. *Saccharomyces exiguus* ist eine kleinzellige Hefe mit einer Größe von üblicherweise (2,5 bis 5,0) x (3,0 bis 6,5) μm . Die Zellen kommen meist einzeln oder als Zellpaar vor. *Saccharomyces exiguus* selbst ist in Bier ein Latenzkeim, der jedoch wegen seiner häufigen Vergesellschaftung mit Bierschädlingen als Indikatorkeim für biologische Mängel angesehen wird [BACK 1994a, QUEROL und FLEET 2006]. Die als potentieller Bierschädling einzustufende Schadhefe *Debaryomyces hansenii* („Torula“) besitzt verhältnismäßig kleine und runde Zellen mit einem Durchmesser von üblicherweise 3 bis 7 μm . Die Zellen liegen meist einzeln oder als Paare vor [BACK 1994a].

Die Abmessungen des obligaten Bierschädling *Lactobacillus brevis* liegen durchschnittlich bei $0,7 \times 4 \mu\text{m}$, wobei sich die Zellmorphologie bei unterschiedlichen Stämmen von *Lactobacillus brevis* leicht unterscheiden kann und sowohl dünnere als auch dickere Zellen mit einem Durchmesser von $0,5$ bis $0,9 \mu\text{m}$ vorkommen [EBC 1999]. Die Zellen sind gewöhnlich schlank und parallelwandig mit abgerundeten Enden. Ein charakteristisches Merkmal von *Lactobacillus brevis* ist die Neigung zur Ausbildung von Langstäbchen und extrem langen Zellen (bis $50 \mu\text{m}$), Ketten von Zellen kommen dagegen nicht vor [BACK 1994a]. *Pediococcus damnosus* ist das wichtigste kokkenförmige Milchsäurebakterium in der Brauerei und wird ebenfalls als obligater Bierschädling angesehen. Ein charakteristisches Kennzeichen von *Pediococcus damnosus* ist die Bildung von Zell-Tetraden. Zusätzlich kommen auch Mono- und Diplokokken sowie kurze Ketten vor, deren Durchmesser je nach Stamm, Alter und Kultivierungsbedingungen bei $0,5$ bis $1,0 \mu\text{m}$ liegt [EBC 1999, BACK 1994a, JÄHRIG und SCHADE 1993, BRANTLEY und ARANHA 1994].

3.5.3 Kalkulation der Testkeim-Beaufschlagung

Die Kalkulation der erforderlichen Testkeimbeaufschlagung in den Versuchen zur Bestimmung des mikrobiellen Rückhaltevermögens der Silizium-Membranfilter erfolgte anhand der effektiven Filterfläche, als die in der vorliegenden Arbeit die filtrationswirksame Fläche der 75 Siliziumnitrid-Porenmembranen angesehen wird. Die effektive bzw. filtrationswirksame Membranfläche eines Silizium-Membranfilters beträgt somit $15,75 \text{ mm}^2$. Dieses entspricht ca. $4,9 \%$ der Gesamtoberfläche. DIN 58355-3 gibt eine Testkeimbeaufschlagung des zu prüfenden Filters mit 10^7 Keimen pro cm^2 effektiver Filterfläche vor, so dass für Silizium-Membranfilter die Anforderungen an das Bakterienrückhaltevermögen dann erfüllt wären, wenn bei einer Beaufschlagung mit $1,575 \times 10^6$ Organismen ein steriles Filtrat erhalten würde. Andererseits beruht die Kalkulation in der DIN auf dem Ansinnen, jede Pore des Membranfilters mit einem Testkeim zu beaufschlagen. Das würde für die Silizium-Membranfilter unterschiedliche Testkeimbeaufschlagungen in Höhe von $4,56 \times 10^5$ KBE (Porengröße: $3,64 \mu\text{m}$), $1,16 \times 10^6$ KBE (Porengröße: $1,15$ bis $2,20 \mu\text{m}$) und $3,61 \times 10^6$ KBE (Porengröße: $0,50$ bis $0,92 \mu\text{m}$) erforderlich machen. Aus Gründen der Praktikabilität wurde für die Challenge-Tests im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine einheitliche Beaufschlagung in vier Stufen mit 10^4 , 10^5 , 10^6 und 10^7 KBE, in

Summe also mit $1,111 \times 10^7$ KBE angestrebt. In den Versuchen mit Hefen würde somit bereits mit der Filtration der dritten Verdünnungsstufe die geforderte Soll-Zellzahl an Testorganismen erreicht. Aus Gründen der Praktikabilität wurden in den Versuchen mit Bakterien lediglich 50 ml Unfiltratlösung mit gleicher Testkeimkonzentration wie in den Versuchen mit Hefen eingesetzt, so dass die Filter zwar nur noch mit halb so viel Testkeimen beaufschlagt wurden, die Anforderung der DIN mit einer berechneten Gesamtestkeimbeaufschlagung von $5,555 \times 10^6$ KBE nach der Filtration der vierten Verdünnungsstufe problemlos einzuhalten war.

3.5.4 Herstellung der Unfiltrat-Suspensionen

Die als Testkeime eingesetzten Hefen wurden aerob bei 27°C in Würze kultiviert, die Bakterien bei gleicher Temperatur anaerob in NBB-Bouillon. Für die Herstellung der Unfiltrat-Suspensionen der 4 Verdünnungsstufen wurde eine Stammlösung mit 10^6 KBE/ml aus der Kulturlösung mit isotonischer Natriumchloridlösung als Lösungsmittel bei zweistufiger Kontrolle der Zellkonzentration mittels Thoma-Zählkammer präpariert [BAST 1999]. Aus der Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe mit Verdünnungsstufen (VS) von 10^5 KBE/ml (VS4), 10^4 KBE/ml (VS3), 10^3 KBE/ml (VS2) und 10^2 KBE/ml (VS1) hergestellt. Aus den Ansätzen der vier Verdünnungsstufen wurden danach jeweils Teilmengen von 50 ml (Bakterien) bzw. 100 ml (Hefen) für die Beaufschlagung der Silizium-Membranfilter im Challenge-Test eingesetzt.

3.5.5 Filtration der Testkeim-Suspensionen

Die Versuche zur Bestimmung des Rückhaltevermögens von Silizium-Membranfiltern erfolgten ausschließlich nach dem Single-Pass-Prinzip, d.h. die Testsuspension wurde im Dead-End-Verfahren (statische Filtration) nur einmalig über die Filter filtriert. Der verwendete Filtrationsteststand bestand aus dem eigentlichen Filtergehäuse, in dem bis zu fünf Silizium-Membranfiltern montiert werden konnten, jeweils einem Unfiltratvorrat- und Filtratsammelbehältnis für jede der fünf Einbaupositionen sowie einem Behältnis mit separater 5-facher Druckabriegelung für die Verteilung der Druckluft auf die Unfiltratvorratsbehälter (vgl. Abb. 3–4). In die Druckluftversorgung waren ein Regelventil für die Einstellung des Vordrucks, ein Drucksensor sowie ein Sterilluftfilter integriert. Der transmembrane Druck (TMD) wurde während der Filtrationen gemäß der Vorgaben durch DIN 58355-3 auf

ca. 0,80 bar (0,7 bis 0,9 bar) Überdruck geregelt. Während des Versuchsablaufs variierte der TMD mitunter leicht, weil der Vordruck der Druckluftversorgung systembedingt leichten Schwankungen unterlag. Insbesondere in den Versuchen mit Hefen konnte bei der Verarbeitung der ersten Verdünnungsstufe mit der nur niedrigen Konzentration an Testkeimen in der Unfiltratsuspension und des folglich schnellen Filtratablaufs nicht immer oder oft nur kurzfristig der angestrebte transmembrane Druck (TMD) von 0,8 bar erreicht werden (vgl. Abb. 3–6). Vor der vollständigen Erschöpfung der Unfiltratsuspensionen wurde der TMD reduziert, um Beschädigungen infolge des schlagartigen Wechsels von flüssigem auf gasförmigen Volumenstrom zu vermeiden.

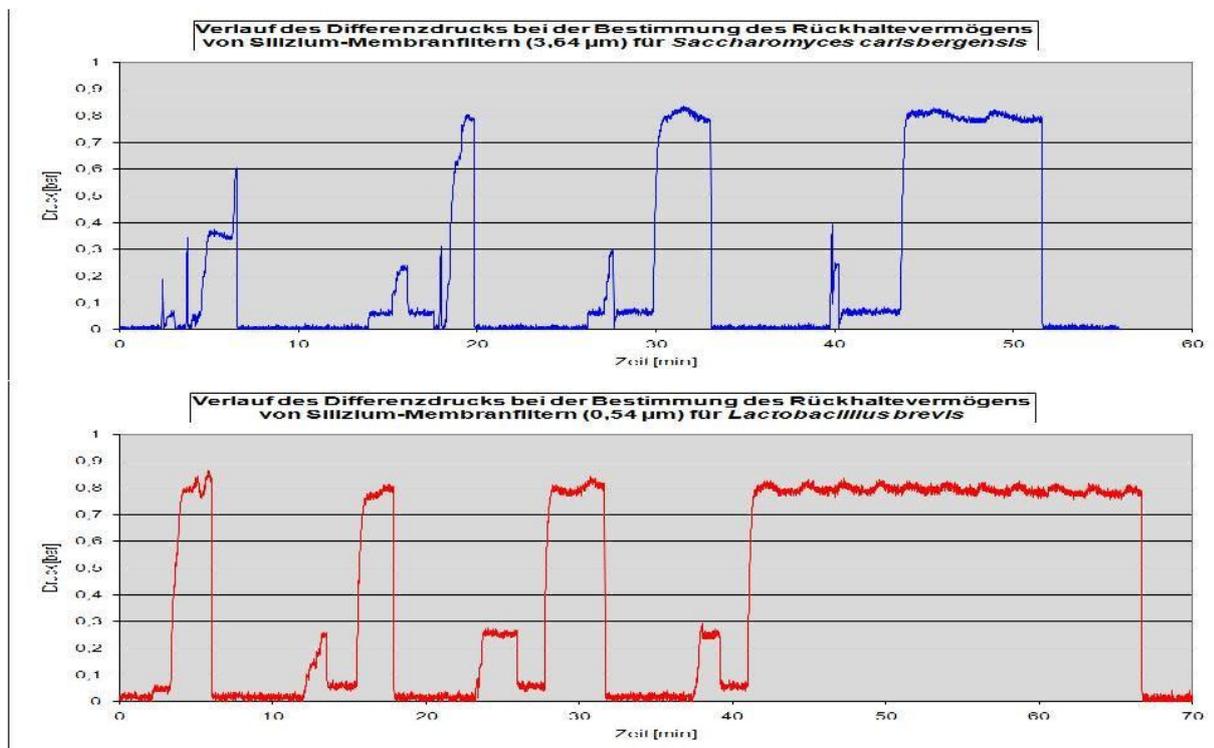


Abb. 3-6: Regelung des transmembranen Druckes bei der Bestimmung von Rückhalteraten für Silizium-Membranfiltern

Die Filterapparatur wurde vor jedem Einsatz in montiertem Zustand dampfsterilisiert (Dampftopf, ≥ 2 h, $\geq 100^\circ\text{C}$). Zu Versuchsbeginn wurden die vorbereiteten Unfiltratsuspensionen unter Wahrung steriler Verhältnisse in die Unfiltratbehältnisse der Filterapparatur umgefüllt. Im Anschluss wurde das Filtergehäuse entlüftet und so präpariert, dass eine vollständige Beaufschlagung der Filteroberfläche mit Unfiltratsuspension und ein vollständiger Ablauf des Filtrats gewährleistet waren. Die

vier Unfiltrat-Suspensionen mit zunehmender Konzentration an Testkeimen (Verdünnungsstufen 1 bis 4) wurden jeweils nacheinander über einen Filter filtriert. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden jeweils parallel bei einheitlichem Vordruck an den fünf Einbaupositionen des Filtergehäuses verarbeitet, d.h. es wurden zeitgleich immer nur Proben derselben Verdünnungsstufe filtriert. Dabei erfolgte jeweils das Befüllen mit der nachfolgenden Verdünnungsstufe nach der vollständigen Verarbeitung der Proben aus der vorhergehenden Verdünnungsstufe an allen Einbaupositionen. Die Filtrate der Verdünnungsstufen wurden separat aufgefangen und der Weiterverarbeitung zugeführt. Das Filtratvolumen wurde für die spätere Berechnung der Gesamtkeimbeaufschlagung im Rahmen der Bestimmung der Kennzahlen für das Rückhaltevermögen gravimetrisch bestimmt. Proben, bei denen weniger als 80% des Ausgangsvolumens als Filtrat gewonnen werden konnten, wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Die eingesetzten Silizium-Membranfilter wurden nach der Demontage im Mikroskop auf Unversehrtheit kontrolliert.

3.5.6 Kontrolle der Zellkonzentration in Unfiltrat und Filtrat

Die Keimzahlbestimmung für die Unfiltratlösungen und die gewonnenen Filtrate erfolgte durch Filtration über Cellulosenitrat-Membranfilter mit einem nominalen Porendurchmesser von 0,45 µm (Bakterien) oder 0,65 µm (Hefen), Inkubation der Filter auf Agarplatten (Hefen: aerob, Würzeagar, 27°C, 2-5 Tage; Bakterien: anaerob, NBB-Agar, 27°C, 8-15 Tage) und anschließende Kontrolle auf Koloniebildung sowie Auszählung bei positivem Befund [BAST 2001]. Für Unfiltratlösungen von *Lactobacillus brevis* und *Pediococcus damnosus* trat phasenweise das Problem von sehr niedrigen Zellkonzentrationen auf. Versuche, für deren Unfiltratlösungen weniger als 20% der Sollkonzentration in den Kontrollproben wiedergefunden wurden, wurden von der Auswertung ausgeschlossen (*Lactobacillus brevis*: 11 x 5 Einzelversuche, *Pediococcus damnosus*: 2 x 5 Einzelversuche). Auf Basis der ermittelten Lebendkeimzahlen für Unfiltrat und Filtrate erfolgte die Berechnung von Kennzahlen für das Rückhaltevermögen der Silizium-Membranfilter. Dabei wurde die Aufsummierung der Testorganismen der Verdünnungsstufen berücksichtigt.

3.5.7 Kennzahlen des Rückhaltevermögen

In der Praxis sind unterschiedliche Maßzahlen zur Quantifizierung des Rückhaltevermögens von Filtern etabliert. Dazu zählen prozentuale Rückhalterate, β -Ratio,

Keimreduzierung (LRV) und Belastungsgrenze [GAUB 1993a, BACK 1994b, BACK 1995]. Die Darstellung der Ergebnisse aus den Versuchen zum Rückhaltevermögen von Silizium-Membranfiltern erfolgte im Rahmen dieser Arbeit in Form von prozentualen Rückhalteraten und als LRV.

- Prozentuale Rückhalterate

Die prozentuale Rückhalterate ist das prozentuale Verhältnis von gesamter Keimbeaufschlagung eines Filters ($KBE_{\text{Unfiltrat}}$) und Gesamtanzahl der Keime im Filtrat (KBE_{Filtrat}) [BACK 1995, GAUB 1993a].

$$\text{Rückhalterate [\%]} = 100 - (KBE_{\text{Filtrat}} / KBE_{\text{Unfiltrat}} \times 100)$$

- β -Ratio

Das β -Ratio ergibt sich aus dem Verhältnis der Konzentrationen von Partikeln der Größe x im Unfiltrat und im Filtrat. Die Durchführung zur Bestimmung des β -Ratios ist in ISO-Norm 4572 beschrieben [GAUB 1993a].

$$\beta\text{-Ratio} = KBE_{\text{Unfiltrat}} / KBE_{\text{Filtrat}}$$

- Logarithmische Rückhalterate, LRV

Da sich bei weitgehender Abscheidung der mit dem Unfiltrat zugeführten Partikel für das β -Ratio (β_x) sehr große Zahlenwerte ergeben, wird häufig eine logarithmische Form der Ergebnisdarstellung als „logarithmische Rückhalterate“ (Logarithmic Retention Value, LRV) bzw. „Keimreduzierung“ oder „Titerreduktion“ bevorzugt [LUCKERT 2004, GAUB 1993a]. Die LRV gibt an, um wie viele Zehnerpotenzen die Keimzahl im Filtrat gegenüber dem Unfiltrat reduziert wurde. Die Bestimmung der LRV ist in HIMA-Dokument, Nr. 3, Vol. 4 und DIN 58355-3 „Membranfilter – Bakterienrückhaltevermögen für Flachfilter“ beschrieben [GAUB 1993a].

$$\text{LRV} = \text{Titerreduktion} = \lg(\beta\text{-Ratio}) = \lg(KBE_{\text{Unfiltrat}}/KBE_{\text{Filtrat}})$$

3.5.8 Statistische Auswertung der Messdaten zum Rückhaltevermögen

Um die Belastbarkeit der Ergebnisse aus den Versuchen zur Bestimmung des Rückhaltevermögens zu erhöhen, wurde sie einer statistischen Kontrolle auf

Ausreißer unterzogen. Da der Stichprobenumfang pro betrachteter Kombination von Testorganismus und Porengröße oft unter 10 Einzelmesswerten lag, wurde mit einem Test zur Prüfung von Extremwerten einer Zufallsstichprobe aus einer normalverteilten Grundgesamtheit gearbeitet (einseitige Fragestellung, Signifikanzniveau 5% ($\alpha = 0,05$)), der anders als der Test nach dem „4-Sigma-Bereich“ berücksichtigt, dass Ausreißer bei kleinerer Stichprobe unwahrscheinlicher werden, und angepasste Signifikanzschranken für Stichprobenumfänge zwischen 3 und 25 Messwerten nutzt [SACHS 1997].

3.6 Methodik des kombinierten Einsatz von Silizium-Membranfiltern und Fluoreszenzmarkierung

3.6.1 Prozeduren zur Fluoreszenzmarkierung von Testkeimen

Bei der ersten Variante der Färbeprozedur erfolgte die Färbung der abgeschiedenen Mikroorganismen im Anschluss an die Demontage der Silizium-Membranfilter aus dem Filtergehäuse. Nach dem Aufbringen der Fluorochromlösung auf die Filteroberfläche wurden die Probestücke in einer temperierten Dunkelkammer inkubiert. Nach dem anschließenden Entfernen der Farbstofflösung folgte die Auswertung der Probestücke im Fluoreszenzmikroskop.

Bei der zweiten Variante der Färbeprozedur wurden die Mikroorganismen nach der Filtration auf den noch im Filtergehäuse montierten Silizium-Membranfilter gefärbt. Nach einer Spülung mit PBS-Puffer (Phosphatgepufferte Saline) wurde die Fluoreszenzmarkierung der zuvor auf der Filteroberfläche abgeschiedenen Mikroorganismen durch Aufgabe der Fluoreszenzfarbstoffe in das Filtergehäuse vorgenommen. Eine Temperierung der Farbstofflösungen im Filtergehäuse war nicht möglich. Nach der Inkubation mit den Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte eine nochmalige Waschung der Zellen mit PBS-Puffer, die Demontage der Filter aus dem Filtergehäuse und die Auswertung der Präparate im Fluoreszenzmikroskop.

Bei der dritten Variante der Färbeprozedur erfolgte die Fluoreszenzmarkierung der Mikroorganismen vor der Filtration durch Zugabe der Fluoreszenzfarbstoffe in die Unfiltratlösungen. Nach geeigneter Inkubation und Präparation von Verdünnungen aus den konzentrierten Unfiltratansätzen folgte die Filtration über die Silizium-

Membranfilter. Nach der anschließenden Demontage wurden die Filter mit einem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert.

Bei den beiden erstgenannten Färbeprozeduren wurden jeweils die Arbeitslösungen der Fluoreszenzfarbstoffe für die Markierung der Mikroorganismen eingesetzt. Für die Färbung der Mikroorganismen noch vor der Filtration in der Organismensuspension wurde dieser ein Aliquot der Farbstoff-Stammlösung zugesetzt. Dabei wurden für die Färbung von 1 ml Organismensuspension 100 µl DAPI, 20 µl CFDA-SE und 800 µl PI verwendet (vgl. Tab. 3–1).

Tab. 3-1: Prozessparameter bei der Färbung von Mikroorganismen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Farbstoff	Inkubation		Stammlösung	Arbeitslösung	Medium
	Dauer	Temperatur	Konzentration	Konzentration	
	[min]	[°C]	[mg/ml]	[µg/ml]	
CFDA-SE	60	37	5,6	56	DMSO
DAPI	60	37	5,5	1	DMSO
PI	5	37	5	0,005	PBS

3.7 Methodik des kombinierten Einsatz von Silizium-Membranfiltern und Real-Time-PCR

3.7.1 Verfahren zur DNA-Isolierung

Um im Versuchsbetrieb eine optimale DNA-Isolierung gewährleisten zu können, wurden alle Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit standardmäßig mit einem kommerziellen DNA-Isolierungskit (GEN-IAL First-Beer Magnetic DNA Kit) durchgeführt, dessen Trennwirkung auf einer biomagnetischen Separation durch Magnetpartikel mit DNA-Bindungspotential beruht. Da die Standardprozedur (nachfolgend bezeichnet als: „Standard“) für die Anwendung dieses DNA-Isolierungskits nicht den Einsatz von Silizium-Membranfiltern zur Konzentrierung der nachzuweisenden Mikroorganismen vorsieht, musste für diese Verfahrensweise eine alternative Prozedur für die DNA-Isolierung entwickelt werden (nachfolgend bezeichnet als: „Direktlyse“). Zusätzlich wurde eine abgewandelte Form des Standardverfahrens (nachfolgend bezeichnet als: „variiertes Standardverfahren“) in die Untersuchungen einbezogen, um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen dem

Standardverfahren und dem Verfahren mit Silizium-Membranfiltern zu erreichen.

Das Standardverfahren im Rahmen der durchgeführten Versuche stellt die vom Hersteller GEN-IAL GmbH empfohlene Vorgehensweise für die Anwendung des GEN-IAL First-Beer Magnetic DNA Kit zur DNA-Isolierung dar. Bei diesem Verfahren erfolgt die DNA-Isolierung nach folgendem Ablauf:

1. 1 ml der Probe wird in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und für 2 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert
2. Der Überstand wird verworfen.
3. Das Hefepellet am Boden des Eppendorf-Reaktionsgefäßes wird in 400 µl Beadssuspension resuspendiert.
4. Der Suspension werden 14 µl Lytikase zugegeben.
5. Die Suspension wird bei 37°C für 15 bis 30 Minuten inkubiert.
6. Es werden 100 µl Enzymlösung zugegeben.
7. Es folgt eine weitere Inkubation für 10 Minuten bei 65° C.
8. Es werden 200 µl 100%-iger Ethanol zugegeben und mit einem Vortexer gut durchmischt.
9. Das Reaktionsgefäß wird in einem Magnethalter abgestellt, so dass sich die DNA-Magnetpartikel-Komplexe an der dem Magneten des Halters zugewandten Innenseite des Gefäßes anlagern.
10. Der Überstand wird nach 1 Minute abpipettiert.
11. Die DNA-Magnetpartikel-Komplexe werden mit 800 µl Waschpuffer gewaschen.
12. Der Waschpuffer wird wieder abgezogen und verworfen.
13. Es werden 50 µl steriles AMPUWA hinzugegeben.
14. Es folgt eine Inkubation für 10 Minuten bei 65° C.
15. Das Reaktionsgefäß wird wieder in den Magnethalter gestellt und der Überstand mit der DNA in ein neues Gefäß überführt.
16. Von der DNA-Suspension werden 1 bis 5 µl in die PCR eingesetzt.

Anders als beim Standardverfahren der DNA-Isolierung erfolgt die Isolierung der in einer Probe enthaltenen Mikroorganismen bei Anwendung von Silizium-Membranfiltern nicht durch Zentrifugation, sondern durch Abscheidung auf der Filteroberfläche. Für die beabsichtigte PCR-Analytik ist es nachfolgend erforderlich, die DNA der auf den Filtern abgeschiedenen Keime zu isolieren. Das beschriebene

Standardverfahren zur DNA-Isolierung ist wegen des prinzipiell anderen Trennprozesses für die Prozedur mit Silizium-Membranfiltern nicht geeignet und kann allenfalls als Orientierung bei der Entwicklung eines geeigneten Verfahrens dienen.

Nachdem sich bereits in ersten vorgelagerten Versuchen in Kooperation mit dem mikrobiologischen Betriebslabor einer deutschen Großbrauerei ein Abwaschen der auf den Silizium-Membranfiltern abgeschiedenen Mikroorganismen mit anschließender Standard-DNA-Isolierung als nicht praxisgerecht erwiesen hatte, wurde ein Verfahren zur Gewinnung der Organismen-DNA unmittelbar auf der Filteroberfläche entwickelt. Für eine solche Direktlyse muss mindestens 1 ml Lysepuffer eingesetzt werden, um eine vollständige Benetzung der Filteroberfläche zu gewährleisten. Entsprechend wurde das eingesetzte Volumen an Lysepuffer im Vergleich zum Standardverfahren von 400 µl auf 1000 µl angepasst. Um eine Wechselwirkung der Magnetpartikel mit dem Filter grundsätzlich ausschließen zu können, wurden die im späteren Verlauf der Aufbereitung noch erforderlichen Magnetpartikel vor der Lyse aus der Beadssuspension durch Zentrifugation abgeschieden. Der gewonnene Überstand an Lysepuffer wurde auf das erforderliche Gesamtvolumen von 1000 µl aufgefüllt. Durch diese Vorgehensweise war zwar das Verhältnis der Anzahl von Testkeimen zu Magnetpartikeln bei beiden betrachteten Verfahren gleich, die absolute Konzentration von Magnetpartikel im Verfahren mit Direktlyse jedoch niedriger als beim Standardverfahren. Die Mengen an Ethanol, der Lytikase und Enzymlösung wurden beim Verfahren der Direktlyse entsprechend des von 400 µl auf 1000 µl geänderten Gesamtvolumens jeweils um den Faktor 2,5 angepasst, so dass während der DNA-Isolierung nach beiden Verfahren jeweils gleiche Konzentrationen vorlagen.

Die DNA-Isolierung mit Direktlyse der auf den Silizium-Membranfiltern zurückgehaltenen Mikroorganismen erfolgte nach folgendem Schema:

1. 400 µl Beadssuspension werden in einem Eppendorf-Gefäß für 2 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert.
2. Der Überstand wird abgezogen und zusammen mit weiteren 600 µl Lysepuffer in einer kleinen Petrischale auf den Silizium-Membranfilter mit den auf dessen Oberfläche abgeschiedenen Mikroorganismen gegeben.
3. Zusätzlich werden 35 µl Lytikase zu der Lösung in der Petrischale gegeben.

4. Der Ansatz wird für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Dabei erfolgt ein 3-maliges (Beginn/Mitte/Ende) Umschwenken des Ansatzes und am Ende der Inkubation eine Spülung der Filteroberfläche mit der Lösung mittels einer Pipette.
5. Die etwa 1000 µl Lysepuffer werden abgezogen und in ein unbenutztes Eppendorf-Gefäß geben.
6. In das Gefäß werden 250 µl Enzymlösung gegeben.
7. Es folgt eine Inkubation für 10 Minuten bei 65° C.
8. Das Reaktionsgemisch wird mit einer Pipette aufgenommen und in das Eppendorf-Gefäß mit den abzentrifugierten Magnetpartikeln gegeben.
9. Es folgt eine weitere Inkubation für 10 Minuten bei 65° C.
10. Es werden 500 µl 100%-iger Ethanol zugegeben und der Ansatz wird mit einem Vortexer gut durchmischt.
11. Anschließend wird mit der DNA-Isolierung, wie ab Schritt 9 im Standardverfahren beschrieben, fortgefahren.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen dem Standardverfahren zur DNA-Isolierung von GEN-IAL und dem Verfahren mit Direktlyse zu erreichen, wurden auch Versuche mit einem „variiertes Standardverfahren“ durchgeführt, in denen das Augenmerk auf der Prüfung einer nachteiligen Wirkung durch die geringere Konzentration an Magnetpartikeln bei der Direktlyse lag. Beim variierten Standardverfahren erfolgten der Zellaufschluss und die DNA-Isolierung weitestgehend nach den Vorgaben des Herstellers der Kits. Es erfolgte lediglich eine Anpassung des Volumens bzw. der Beadskonzentration analog zur Direktlyse durch Zugabe von 600 µl Lysepuffer zu 400 µl Beadssuspension bei der Resuspendierung der niedergeschlagenen Zellen (vgl. Standardprotokoll, Schritt 3).

3.7.2 PCR-Protokolle

Die in den PCR-Analysen angewendeten PCR-Protokolle entsprachen weitestgehend den Vorgaben des Herstellers GEN-IAL GmbH. Die Probenansätze wurden unverändert übernommen: 5 µl des DNA-Isolats, 5 µl doppelt-destilliertes Wasser, 1,5 µl Primermix, 13,5 µl SYBR-Green. Die Temperatur-Zeit-Protokolle wurden dagegen entsprechend der etwas geringeren Heizraten des iCyclers (Bio-Rad) gegenüber dem LightCycler (Roche) durch leicht verlängerte Aufheizphasen und Heisshaltezeiten angepasst (vgl. Tab. 3–2 und Tab. 3–3).

Tab. 3-2: Temperaturprotokoll für die Real-Time-PCR von Hefen

Schritt	Status	Wiederholungen [n]	Zeit [mm:ss]	Temperatur [°C]
1	Aktivierung der Polymerase	1	05:00	95
2.1	Denaturierung	40	00:10	95
2.2	Annealing		00:35	60
2.3	Elongation		00:20	72
3	Denaturierung	1	00:10	95
4	Annealing/Elongation	1	00:20	60
5	Temperaturerhöhung +0,5°C	70	00:08	60
6		1		15

Tab. 3-3: Temperaturprotokoll für die Real-Time-PCR von Bakterien

Schritt	Status	Wiederholungen [n]	Zeit [mm:ss]	Temperatur [°C]
1	Aktivierung der Polymerase	1	05:00	95
2.1	Denaturierung	40	00:15	95
2.2	Annealing		00:30	63
2.3	Elongation		00:30	72
3	Denaturierung	1	00:10	95
4	Annealing/Elongation	1	00:20	63
5	Temperaturerhöhung +0,5°C	70	00:08	63
6		1		15

3.8 Methodik des kombinierten Einsatz von Silizium-Membranfiltern mit Fluoreszenzmarkierung sowie Real-Time-PCR

In den Versuchen zum kombinierten Einsatz von Silizium-Membranfiltern mit Fluoreszenzmarkierung und Real-Time-PCR erfolgte die Markierung der isolierten Testkeime mit Fluoreszenz-Farbstoffen wie in Kapitel 3.6 beschrieben. Im Anschluss wurden die Proben wie in Kapitel 3.7 beschrieben mittels Real-Time-PCR ausgewertet. Als Referenz wurden in den Versuchen ungefärbte Proben parallel zu den fluoreszenzmarkierten Mustern ausgewertet.

3.8.1 Filtration mit Silizium-Membranfiltern

Die Filtrationen im Rahmen der Versuche zur Kombination von Silizium-Membranfiltern mit Fluoreszenzmarkierung und Real-Time-PCR erfolgten nach dem in Kapitel 3.5.4 beschriebenen Prinzip, wobei hier pro Filter stets nur eine Verdünnungslösung filtriert wurde.

3.9 Methodik des kombinierten Einsatz von Silizium-Membranfiltern und Real-Time-PCR im mikrobiologischen Betriebslabor einer Großbrauerei

Für die Versuche in der mikrobiologischen Abteilung des Betriebslabors einer deutschen Großbrauerei wurden die Silizium-Membranfilter in speziell angepassten Rahmen fixiert (vgl. Abb. 3–7). Die Rahmen ermöglichen die Einbringung der Filter in die standardmäßig in der Laborpraxis eingesetzte Vakuum-Membranfiltrationsapparatur. Die montierten Trichtereinheiten mit den eingesetzten Filtern werden vor Versuchsbeginn für 90 min in einem Dampftopf (Typ GD T460, Fa. Fritz Gössner GmbH) bei 100 °C sterilisiert. Nach dem Abkühlen erfolgt die Filtration der Testkeimlösungen durch Aufgabe in die Trichter der Membranfiltrationsapparatur.

Die Versuche mit Hefen erfolgen mit den Testkeimen der Species *Dekkera anomala*, *Dekkera bruxellensis* und *Saccharomyces diastaticus*. Es werden Silizium-Membranfilter mit mittleren Porengrößen von 1,15 bis 2,0 µm verwendet. Die Konzentration der Testkeime liegt bei 2×10^1 , 5×10^1 , 10^2 oder 10^3 KbE in 100 ml alkoholfreiem, nicht karbonisiertem Bier. In den Versuchen mit dem Testkeim *Lactobacillus brevis* erfolgte die Filtration der Unfiltratlösungen mit 5×10^1 , 10^2 und 10^3 KbE in 50 ml Ringerlösung über Silizium-Membranfilter mit den mittleren Porengrößen 0,52 oder 0,55 µm. Die Filtration und die Aufarbeitung erfolgten wie in den Versuchen mit Hefen.

Nach der Demontage der Silizium-Membranfilter aus den Rahmen werden diese in Petrischalen (Ø 35 mm, Fa. Sarstedt) verbracht, mit 1 ml Lysepuffer aus dem First Beer Magnetic Kit (Fa. GEN-IAL) beaufschlagt und für 10 min bei 37 °C unter aerober Atmosphäre in einem Brutschrank (Typ M, Fa. Melag) inkubiert. Zu Beginn der Inkubation, nach 5 min und am Ende werden die Petrischalen kurz geschwenkt. Nach der Inkubation erfolgt die weitere Aufbereitung der Lysate mittels MagNA-Pure-Aufreinigungssystem (Fa. Roche). Für einen besseren und schnelleren Zellaufschluss erhalten die Proben noch vor Beginn der automatischen Aufarbeitung eine Zugabe von 8 µl Lyticase (Fa. Sigma-Aldrich). Im Anschluss an die Aufbereitung erfolgt der eigentliche PCR-Nachweis mittels LightCycler (Fa. Roche) und abgestimmter PCR-Nachweis-Kits. Dabei kommen für den Nachweis von Schadhafen das First-Yeast Primermix H Kit (Fa. GEN-IAL), für den Nachweis von *Lactobacillus brevis* das First Beer Magnetic Kit (Fa. GEN-IAL) oder das Foodproof Beer Screening Kit (Fa. BIOTECON Diagnostics) zum Einsatz.

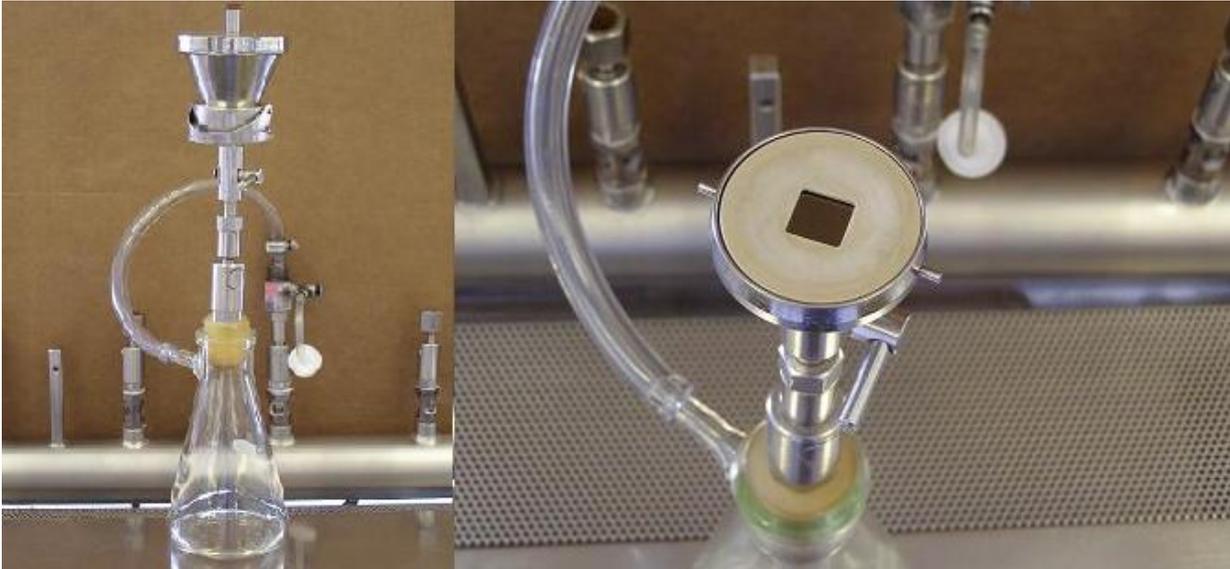


Abb. 3-7: Saugflasche mit aufgesetztem Trichter; Rahmen mit fixiertem Silizium-Membranfiltern

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zum Rückhaltevermögen von Silizium-Membranfiltern gegenüber Kultur- und Schadhefen sowie bierschädlichen Bakterien

4.1.1 Rückhaltevermögen für *Saccharomyces carlsbergensis* (Kulturhefe)

Mit dem Testorganismus *Saccharomyces carlsbergensis* wurden Versuche mit Silizium-Membranfiltern mit mittleren Porendurchmessern von 3,64 µm, 2,20 µm, 2,12 µm und 1,72 µm durchgeführt. Alle 10 Versuche für die Porengröße 1,72 µm blieben bei einer mittleren Gesamttestkeimbeaufschlagung von $6,0 \times 10^6$ KBE aus 2-tägiger Vorkultivierung ohne Befund (vgl. Tab. 4–1, Abb. 4–1, Tab. 9-1 (Anhang)). Somit konnte für die untergärige Kulturhefe *Saccharomyces carlsbergensis* die Porengröße 1,72 µm als Trenngrenze ermittelt werden. In den Versuchen mit dem Testorganismus *Saccharomyces carlsbergensis* und Silizium-Membranfiltern mit einem mittleren Porendurchmesser von 2,12 µm wurde bei einer mittleren Testkeimbeaufschlagung von $7,5 \times 10^6$ KBE (Alter der Testkeime: 1 x 1d, 8 x 2d, 1 x 4d) lediglich in einem von 10 Versuchen (Alter der Testkeime: 1d) ein einzelner positiver Befund für das Filtrat der dritten Verdünnungsstufe festgestellt (durchschnittliche Rückhalterate: 99,99999672%). Für die Porengröße 2,20 µm ergaben sich bei einer mittleren Gesamttestkeimbeaufschlagung von $5,3 \times 10^6$ KBE (3 x 2d, 1 x 4d) Befunde in Höhe von 1,8/0,5/0,3/0 KBE (durchschnittliche Rückhalterate: 99,99267067%). In den Versuchen mit *Saccharomyces carlsbergensis* und Silizium-Membranfiltern mit einem mittleren Porendurchmesser von 3,64 µm lag das Alter der Testkeime zwischen einem und vier Tagen (3x 1d, 9 x 2d, 6 x 4d). Bei einer durchschnittlichen Gesamttestkeimbeaufschlagung von $5,9 \times 10^6$ KBE ergaben sich Befunde von durchschnittlich 8,6/115/478/526 KBE (durchschnittliche Rückhalterate: 99,90849838%). Dabei zeigten sich jedoch deutliche Schwankungen des Rückhaltevermögens in Abhängigkeit vom Alter der eingesetzten Testkeime (vgl. Kap. 5–1). Insbesondere bei 2-tägiger, aber auch bei 1-tägiger Vorkultivierung wurden deutlich schlechtere Ergebnisse erzielt als bei Verwendung von Testkeimen mit einem Alter von 4 Tagen (durchschnittliche Rückhalteraten: 99,93476240% (1d), 99,85864914% (2d), 99,97014021% (4d)). Auch im Ausreißertest wurden – abgesehen von zwei Ausnahmen – sämtliche Ergebnisse aus Versuchen mit jungen Testkeimkulturen als Ausreißer eingestuft. Die Ursache für das schlechtere Rückhaltevermögen der Silizium-Membranfilter

gegenüber Testkeimen aus jungen Organismenkulturen dürfte in dem gehäuftem Vorkommen von kleineren Organismenzellen liegen.

Tab. 4-1: Bestimmung des Rückhaltevermögens von Silizium-Membranfiltern für brauerei-relevante Hefen

Silizium-Membranfilter	Saccharomyces carlsbergensis (untergärige Kulturhefe)				Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus (Schadhefe)				Saccharomyces exiguus (Schadhefe)				Debaryomyces hansenii (Schadhefe)			
	mittlere Rückhalterate [%]	mittlere Standardabweichung	Messwerte [n]	Ausreißer [n]	mittlere Rückhalterate [%]	mittlere Standardabweichung	Messwerte [n]	Ausreißer [n]	mittlere Rückhalterate [%]	mittlere Standardabweichung	Messwerte [n]	Ausreißer [n]	mittlere Rückhalterate [%]	mittlere Standardabweichung	Messwerte [n]	Ausreißer [n]
3,64	99,90849838	0,08253	18	0												
2,20	99,99267067	0,01466	4	1	99,99992650	0,00013	8	3								
2,17					99,99957719	0,00065	4	1								
2,12	99,99999672	0,00001	10	2	99,99999226	0,00002	22	7								
1,72	100,00000000	0	10	0	99,99999127	0,00002	13	2	99,46429587	0,36100	4	2	94,84985210	2,41953	11	1
1,64													99,89211400	0,11784	10	0
1,45									99,99918062	0,00157	5	0	99,98916625	0,01091	5	5
1,25									99,99967101	0,00144	22	0	99,98883548	0,01777	9	1
1,20													99,99999703	0,00001	3	2
1,15									99,99999928	0,00000	9	1	99,99999522	0,00001	12	0
0,92													100,00000000	0	10	0

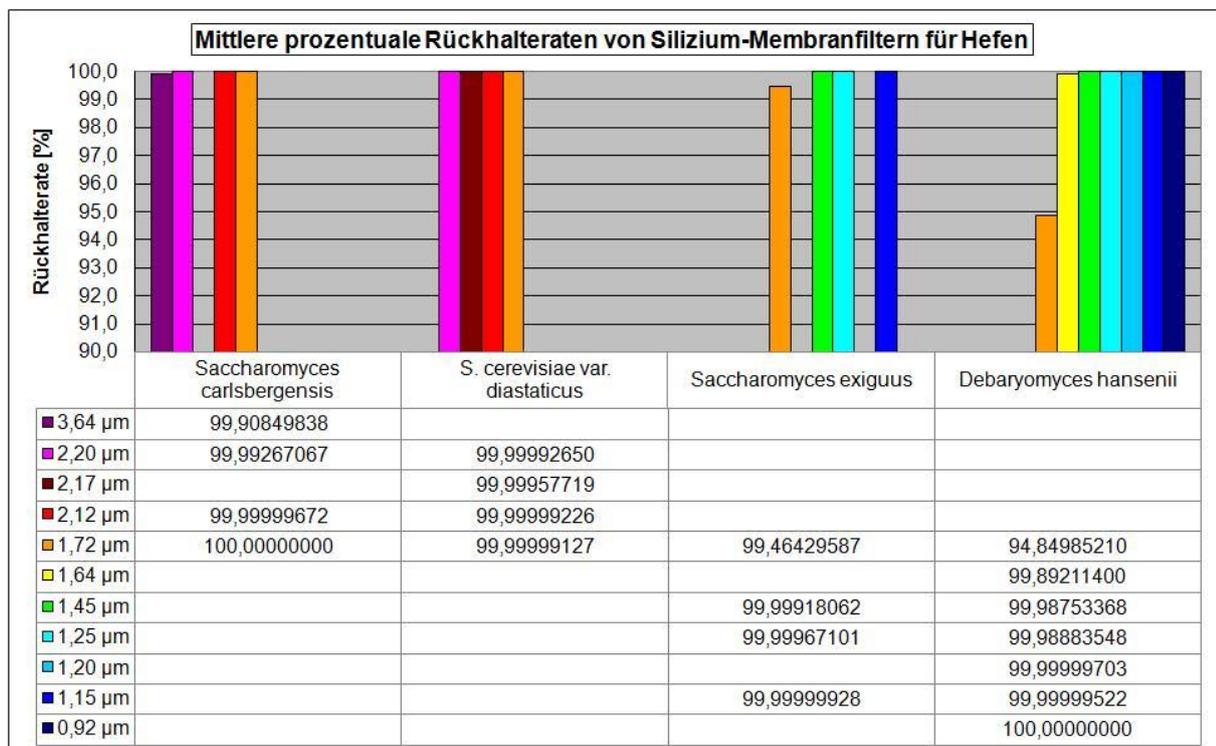


Abb. 4-1: Mittlere prozentuale Rückhalteraten von Silizium-Membranfiltern für brauerei-relevante Hefen

In der logarithmischen Darstellung der Ergebnisse für untergärrige Kulturhefe (*Saccharomyces carlsbergensis*) zeigte sich für Silizium-Membranfilter mit einem mittleren Porendurchmesser von 3,64 µm ab dem Übertreffen der Porenanzahl durch die Anzahl eingebrachten Testkeime ein überproportionaler Anstieg des Rückhaltevermögens (vgl. Abb. 4–2). Die Kurve für die Porengröße 1,72 µm liegt auf dem idealen Kurvenverlauf der vollständigen Abtrennung, die Kurve der Porengröße 2,12 µm weicht mit dem einen positiven Befund in Verdünnungsstufe 3 nur minimal ab. Augenfällig ist das Ergebnis in Verdünnungsstufe 1 für den mittleren Porendurchmesser 2,20 µm. In einem der vier Versuche für diese Porengröße gelangten in der ersten Verdünnungsstufe 7 KBE in das Filtrat, in den drei folgenden Verdünnungsstufen ergaben sich dann jedoch keine weiteren Befunde.

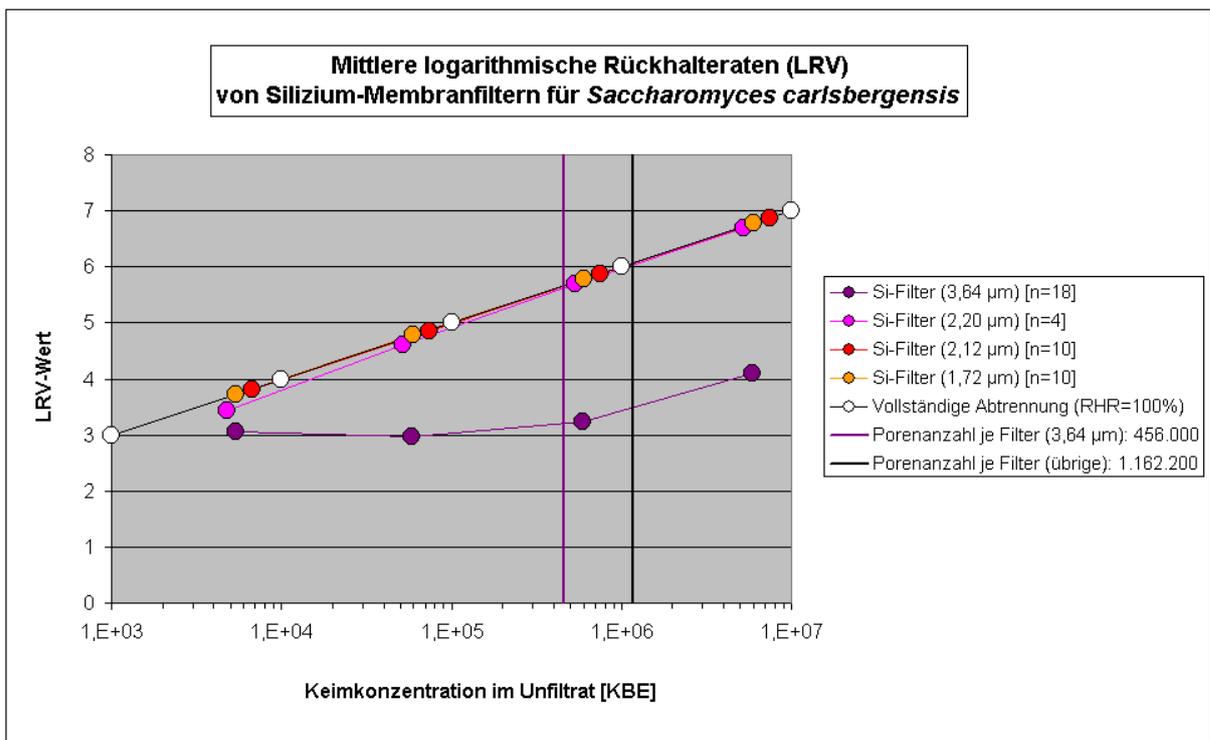


Abb. 4-2: Mittlere logarithmische Rückhalteraten (LRV) von Silizium-Membranfiltern für *Saccharomyces carlsbergensis*

4.1.2 Rückhaltevermögen für *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*

In allen 13 ausgewerteten Versuchen mit Silizium-Membranfiltern mit dem mittleren Porendurchmesser 1,72 µm und dem Testorganismus *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* lag das Alter der Testkeime bei 2 Tagen. Bei einer mittleren Gesamttestkeimbeaufschlagung von $7,6 \times 10^6$ KBE waren 10 Versuche ohne Befund,

im Mittel wurden in den Verdünnungsstufen 1 bis 4 0/0/0,2/0,4 KBE nachgewiesen (durchschnittliche Rückhalterate: 99,99999127%) (vgl. Tab. 4–1, Abb. 4–1, , Tab. 9-2 (Anhang)). In 22 Versuchen mit der Porengröße 2,12, μm ergaben sich bei einer mittleren Gesamttestkeimbeaufschlagung von $6,9 \times 10^6$ KBE (Alter der Testkeime: 2 x 1d, 1 x 2d, 5 x 3d, 4 x 4d, 5 x 8d, 5 x 14d) im Mittel Befunde in Höhe von 0/0/0,1/0,5 KBE (durchschnittliche Rückhalterate: 99,99999226%). Eine nach dem Alter der Testorganismen differenzierte Betrachtung zeigte mit einer durchschnittlichen Rückhalterate von 99,99997043% für 1- und 2-tägige Vorkultivierung (3 Versuche; \emptyset Testkeime: $8,8 \times 10^6$ KBE; \emptyset Befunde: 0/0/0,7/3,3 KBE) gegenüber 99,99999575% bei 3-/4-/8-/14-tägiger Vorkultivierung (19 Versuche; 16 Versuche ohne Befund; \emptyset Testkeime: $6,7 \times 10^6$ KBE; \emptyset Befunde: 0/0/0,1/0,1 KBE) wiederum den Einfluss des Alters auf das Rückhaltevermögen. In den Versuchen mit Silizium-Membranfiltern mit der Porengröße 2,20 μm und dem Testorganismus *Saccharomyces cerevisiae varians diastaticus* ergaben sich im Mittel bei einer Gesamttestkeimbeaufschlagung mit $7,0 \times 10^6$ KBE (Alter der Testkeime: 5 x 4d, 3 x 1d) Befunde in Höhe von 0/0,1/1,5/2,8 KBE (durchschnittliche Rückhalterate: 99,99992650%). In den Versuchen mit 1-tägiger Vorkultur ergab sich dabei mit einer durchschnittlichen Rückhalterate von 99,99984401% (3 Versuche; \emptyset Testkeime: $11,4 \times 10^6$ KBE; \emptyset Befunde: 0/0,3/3,3/7,0 KBE) im Vergleich zu 99,99997599% (5 Versuche; \emptyset Testkeime: $4,4 \times 10^6$ KBE; \emptyset Befunde: 0/0/0,4/0,2 KBE) bei 4-tägiger Vorkultivierung ein schlechteres Ergebnis. Die Ergebnisse für die Porengröße 2,17 μm sollen nur ergänzend erwähnt sein, da das Alter der Vorkulturen in den Versuchen sehr uneinheitlich war. Im Mittel ergaben sich bei einer mittleren Gesamttestkeimbeaufschlagung von $4,3 \times 10^6$ KBE im Filtrat Befunde von 0/0,3/3,5/8,0 KBE (durchschnittliche Rückhalterate: 99,99957719%). Dabei differierten jedoch die Ergebnisse in einem von 4 Versuche mit 2-tägigen Testkeimen (Befunde im Filtrat: 0/0/9/30 KBE) und den übrigen drei Versuchen mit 15-tägiger Vorkultur (Befunde im Filtrat: 0/0,5/1,7/0,7 KBE) deutlich.

Die Darstellung der logarithmischen Rückhalteraten von Silizium-Membranfiltern gegenüber dem Testorganismus *Saccharomyces cerevisiae varians diastaticus* zeigt, dass verstärkte Auftreten von Testkeimen im Filtrat der Verdünnungsstufen 3 und 4 (vgl. Abb. 4–3).

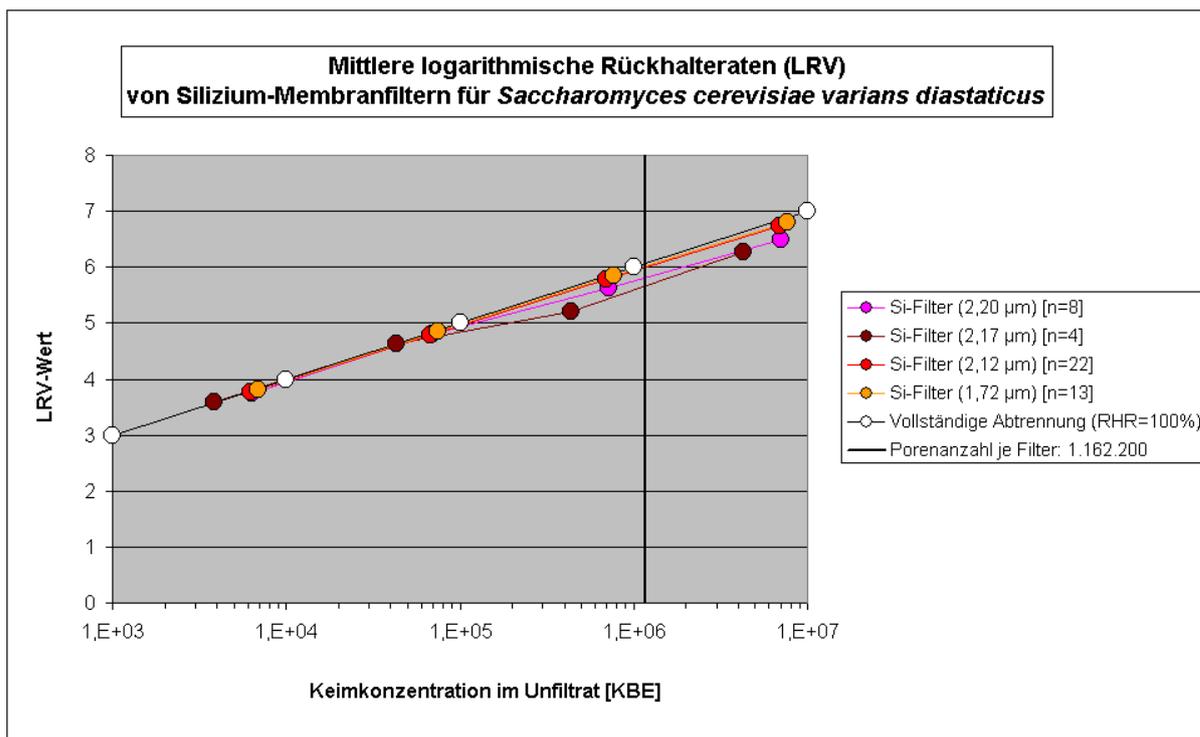


Abb. 4-3: Mittlere logarithmische Rückhalteraten (LRV) von Silizium-Membranfiltern für *Saccharomyces cerevisiae varians diastaticus*

4.1.3 Rückhaltevermögen für *Saccharomyces exiguus*

Wegen der deutlich kleineren Abmessungen des Testorganismus *Saccharomyces exiguus* gegenüber Kulturhefe wurden in den Versuchen mit diesem Testkeim Silizium-Membranfilter mit kleineren mittleren Porendurchmessern (1,72 µm, 1,45 µm, 1,25 µm, 1,15 µm) eingesetzt. Für *Saccharomyces exiguus* konnte in den Versuchen keine Trenngrenze validiert werden. Für die mittlere Porengröße 1,15 µm wurde aber eine nahezu vollständige Abtrennung der Testorganismen nachgewiesen. Nur in einem von neun Versuchen wurde ein einzelner positiver Befund (1 KBE) in Verdünnungsstufe 4 festgestellt. Daraus ergibt sich bei einer mittleren Gesamttestkeimbeaufschlagung von $4,6 \times 10^6$ KBE (Alter der Vorkultur: Tage) eine durchschnittliche Rückhalterate von 99,99999946% (vgl. Tab. 4–1, Abb. 4–1, Tab. 9-3 (Anhang)). In den 22 Versuchen mit der Porengröße 1,25 µm lag die Anzahl der Befunde im Filtrat für die Verdünnungsstufen 1 bis 4 bei einer mittleren Gesamttestkeimbeaufschlagung von $6,6 \times 10^6$ KBE (Alter der Vorkultur: 5 x 2d, 3 x 3d, 7 x 5d, 4 x 6d, 3 x 7d) bei 0/0/1,0/1,4 KBE (durchschnittliche Rückhalterate: 99,99967101%). Für die Porengröße 1,45 µm im Filtrat im Mittel

0/0,2/10/34 KBE bei einer Gesamttestkeimbeaufschlagung von $5,4 \times 10^6$ KBE gemessen (durchschnittliche Rückhalterate: 99,99918062%). Dabei ergaben sich jedoch für 2- und 3-tägige Vorkultivierung mit Befunden in Höhe von 0/1/4/43 KBE bzw. 0/0/46/122 KBE deutlich ungünstigere Ergebnisse als bei 5-/6-/7-tägiger Vorkultivierung mit 0/0/0/2 KBE, 0/0/0/1 KBE und 0/0/0/0 KBE. In den 6 Versuchen mit dem Testorganismus *Saccharomyces exiguus* und der Porengröße 1,72 μm wurden ein deutlicher Anstieg der Befunde (VS 1-4: 102/744/2178/flächig KBE) bei einer mittleren Gesamttestkeimbeaufschlagung von $5,5 \times 10^6$ KBE festgestellt (durchschnittliche Rückhalterate: 98,56564022%).

In der Darstellung der logarithmischen Rückhalteraten (LRV) von Silizium-Membranfiltern für *Saccharomyces exiguus* ist die nahezu vollständige Abtrennung der Testkeime bei der Porengröße 1,15 μm erkennbar (vgl. Abb. 4–4). Für Filter der Porengrößen 1,25 μm und 1,45 μm wird in der logarithmischen Darstellung das nachlassende Rückhaltevermögen bei logarithmisch zunehmender Testkeimbeaufschlagung in den Verdünnungsstufen 3 und 4 offensichtlich. Bei Silizium-Membranfiltern mit einem mittleren Porendurchmesser von 1,72 μm ist für die Verdünnungsstufen 3 und 4 eine deutliche Zunahme des Rückhaltevermögens erkennbar. Dieses dürfte durch den Aufbau einer filtrationswirksamen Deckschicht durch die Abscheidung von Testkeimen auf der Filteroberfläche nach dem Prinzip der Kuchenfiltration bedingt sein.

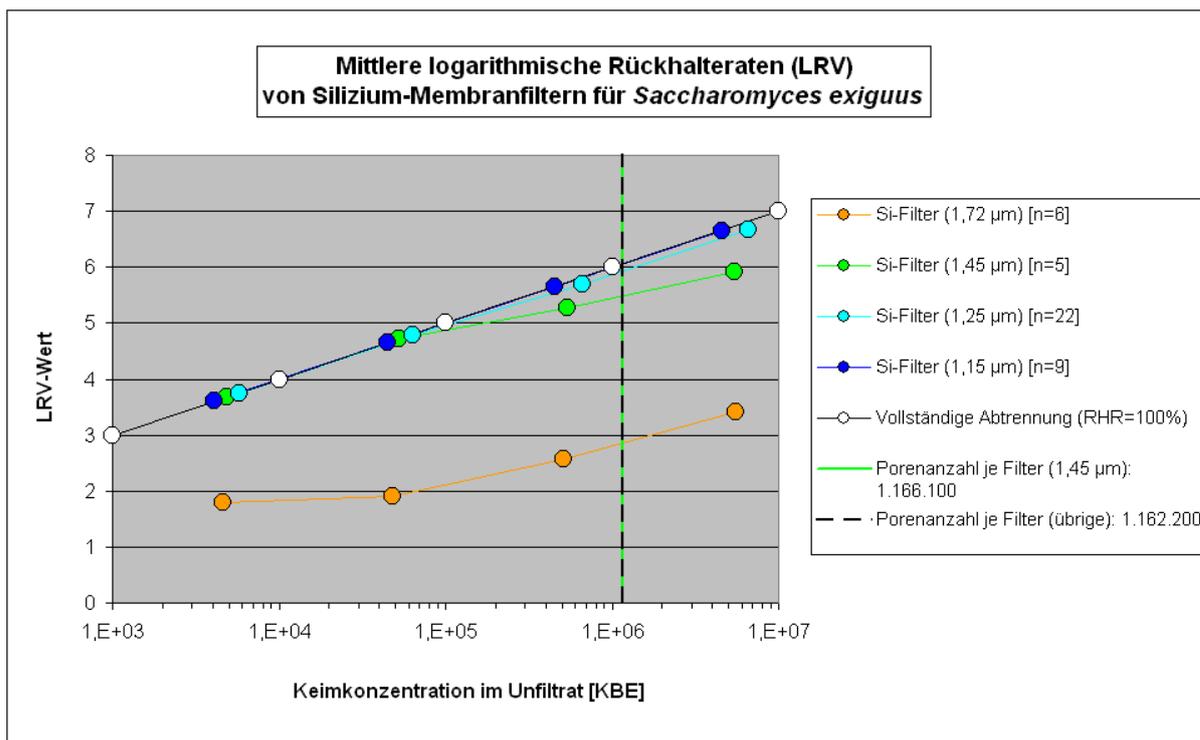


Abb. 4-4: Mittlere logarithmische Rückhalteraten (LRV) von Silizium-Membranfiltern für *Saccharomyces exiguus*

4.1.4 Rückhaltevermögen für *Debaryomyces hansenii*

Die Trenngrenze für den Testkeim *Debaryomyces hansenii* wurde durch Silizium-Membranfilter mit einer mittleren Porengröße von 0,92 µm erreicht. Bei einer mittleren Gesamttestkeimbeaufschlagung von $4,3 \times 10^6$ KBE wurde in keiner der Filtratproben ein positiver Befund festgestellt (vgl. Tab. 4–1, Abb. 4–1, Tab. 9-4 (Anhang)). Das Alter der Testorganismen lag bei 4 bzw. 5 Tagen (7 x 4d, 3 x 5d). Bereits mit den Porengrößen 1,20 µm und 1,15 µm war eine weitgehende Abtrennung der Testkeime erreicht worden. Bei Verwendung von Filtern mit einer Porengröße von 1,15 µm wurde in 10 Versuchen (Alter der Vorkultur: 5 x 3d, 5 x 4d) keinerlei Befund festgestellt, in zwei Versuchen mit 3-tägiger Vorkultivierung ergab sich jeweils in der dritten Verdünnungsstufe ein positiver Befund (1 KBE). Daraus ergibt sich eine durchschnittliche Befund-Anzahl von 0/0/0,2/0 KBE in den Verdünnungsstufen 1 bis 4 bzw. eine mittlere Rückhalterate von 99,99999522% bei einer durchschnittlichen Gesamttestkeimbeaufschlagung von $7,4 \times 10^6$ KBE. Für die Porengröße 1,20 µm wurde in 3 Versuchen bei einer mittleren durchschnittlichen Gesamttestkeimbeaufschlagung von $2,8 \times 10^6$ KBE lediglich einmalig ein positiver

Befund (1 KBE) in der vierten Verdünnungsstufe festgestellt (durchschnittliche Rückhalterate: 99,99999703%).

In den 9 Versuchen mit Filtern der Porengröße 1,25 µm zeigte sich für den Testorganismus *Debaryomyces hansenii* eine Abhängigkeit des - vom Alter der Testorganismen (5 x 3d, 4 x 5d) (vgl. Abb. 4–22). In den Versuchen mit Testorganismen aus einer 3-tägigen Vorkultur wurden bei einer durchschnittlichen Gesamttestkeimbeaufschlagung von $2,0 \times 10^6$ KBE im Mittel 0,5/5,5/59/256 KBE im Filtrat gefunden (durchschnittliche Rückhalterate: 99,97606146%). Dagegen wurden bei Beaufschlagung mit durchschnittlich $4,6 \times 10^6$ Keimen (KBE) aus einer 5-tägigen Kultur im Mittel nur 0/0,8/6,2/31 KBE im Filtrat der Verdünnungsstufen 1 bis 4 gefunden (durchschnittliche Rückhalterate: 99,99905470%). Im Mittel lag die Gesamttestkeimbeaufschlagung bei $3,5 \times 10^6$ KBE, die Anzahl der Befunde im Filtrat der Verdünnungsstufen 1 bis 4 bei 0,2/2,9/30/131 KBE und die Rückhalterate bei 99,98883548%.

Für die Porengrößen 1,45 µm, 1,64 µm und 1,72 µm wurden dagegen deutlich schlechtere Rückhalteraten ermittelt. Die mittlere Rückhalterate lag für die Porengröße 1,45 µm bei 99,98961305% (5 Versuche; Ø Testkeime: $5,7 \times 10^6$ KBE; Ø Befunde: 0,8/6,4/81/227 KBE), für die Porengröße 1,64 µm bei 99,89211400% (10 Versuche; Ø $5,8 \times 10^6$ KBE; Ø Befund 9,9/76/722/2022 KBE) und für die Porengröße 1,72 µm bei 94,84985210% (5 Versuche; Ø $5,7 \times 10^6$ KBE; Ø Befund: 285/2107/flächig/flächig KBE).

Die logarithmierte Ergebnisdarstellung (LRV) der Titerreduktion für *Debaryomyces hansenii* verdeutlicht die vollständige bzw. weitgehende Trennwirkung für die Porengrößen 0,92 µm, 1,15 µm und 1,20 µm durch die Deckung mit dem idealen Kurvenverlauf einer vollständigen Abtrennung (vgl. Abb. 4–5). Die Kurven der übrigen Porengrößen fallen dagegen deutlich ab. Für die Porengröße 1,64 µm sind die mittleren LRVs in den Verdünnungsstufen 1, 2 und 3 nahezu konstant (VS1: 3,1475; VS2: 3,2203; VS3: 3,0099), mit der vierten Verdünnungsstufe steigt der mittlere LRV erkennbar an (VS4: 3,5055). Ähnlich stellt sich der LRV-Kurvenverlauf (VS1: 3,5513; VS2: 4,0522; VS3: 3,9277; VS4: 4,6551) für die Porengröße 1,45 µm dar.

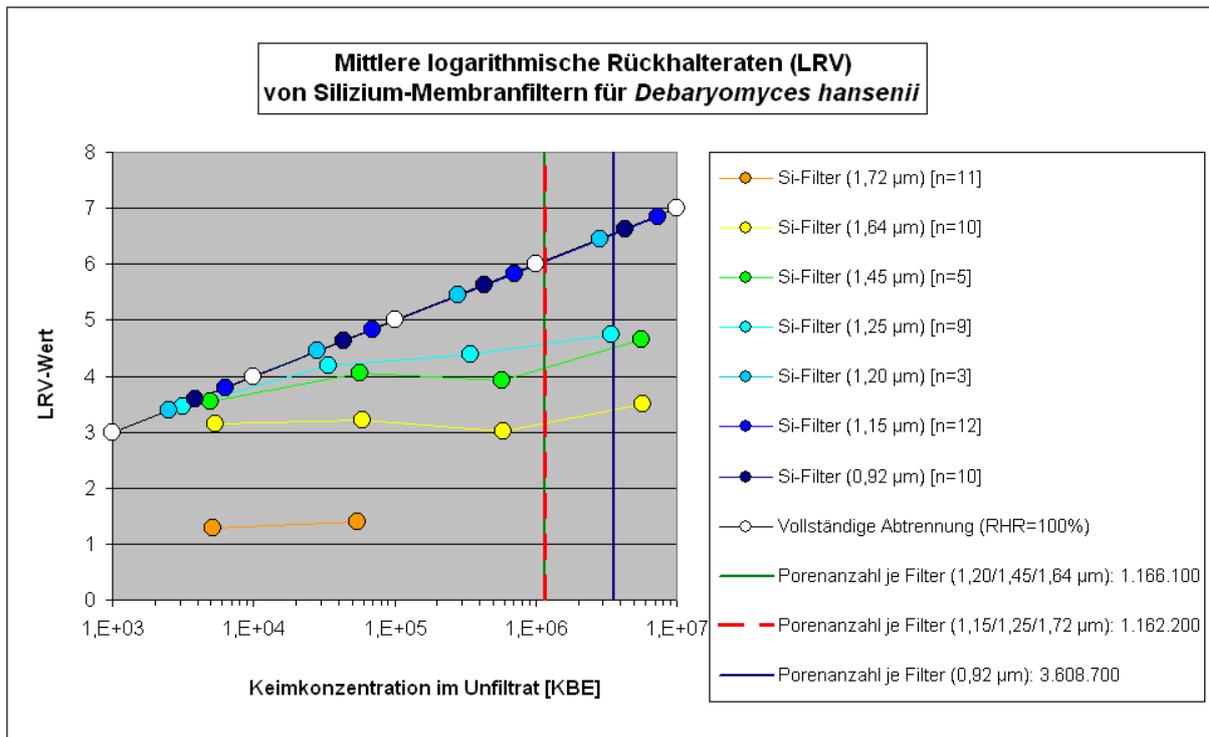


Abb. 4-5: Mittlere logarithmische Rückhalteraten (LRV) von Silizium-Membranfiltern für *Debaryomyces hansenii*

4.1.5 Rückhaltevermögen von Silizium-Membranfiltern für *Lactobacillus brevis*

Auch die Ergebnisse aus den Versuchen zum Rückhaltevermögen von Silizium-Membranfiltern gegenüber dem Testorganismus *Lactobacillus brevis* wurden vor der Auswertung einer statistischen Kontrolle auf Ausreißer unterzogen. Bei der Kontrolle der Ergebnisse aus den 48 Versuchen mit Filtern mit einem mittleren Porendurchmesser von 0,4985 μm wurden die Ergebnisse aus einem Einzelversuch wegen Nicht-Erreichens des geforderten Filtratvolumens von 40 ml (90% des eingesetzten Unfiltratvolumens) und aus weiteren 36 Einzelversuchen wegen der Einstufung als Ausreißer in der statistischen Kontrolle von der Auswertung ausgeschlossen (vgl. Tab. 4–2). Der Grund für das insgesamt sehr uneinheitliche Ergebnisbild bei dieser Porengröße könnte in der Nutzung von instandgesetzten Filtern in 46 Versuchen liegen, da nach der Regeneration der Filter im Anschluss an die Versuchsläufe gehäuft fehlende Versiegelungen an defekten Membrankammern festgestellt wurden. Möglicherweise lagen hier schon Undichtigkeiten während des Versuchs zur Prüfung des Rückhaltevermögens vor. Da mittels mikroskopischer Begutachtung keine verlässliche Bewertung der Filter möglich war, wurde hier allein

der Ausreißertest als Maßstab für die Berücksichtigung von Ergebnissen herangezogen und folglich alle Versuche mit einer Einstufung als „Ausreißer“ von der Auswertung ausgeschlossen.

Bei Verwendung von Silizium-Membranfiltern mit einem nominalen Porendurchmesser von 0,5005 μm traten Probleme hinsichtlich der erzielbaren Filtratvolumina auf. Hier wurden die Ergebnisse aus 14 der 20 Versuche wegen Filtratmengen von weniger als 40 ml in der vierten Verdünnungsstufe nicht in der Auswertung berücksichtigt (vgl. Tab. 4–2). Die Ursache für das Auftreten der ungenügenden Durchsätze bei Filtern aus der Charge mit einem mittleren Porendurchmesser von 0,5005 μm konnte nicht abschließend geklärt werden. Für die übrigen Versuche wurden durch die statistische Kontrolle für die Porengröße 0,52 μm in 5 von 12, für 0,54 μm in 2 von 10, für 0,59 μm in 1 von 8 und für 0,65 μm in 2 von 10 Fällen die Ergebnisse als Ausreißer eingestuft und von der Auswertung ausgeschlossen (vgl. Tab. 4–2). Bis auf eine Ausnahme wurde für alle als Ausreißer eingestuften Ergebnisse auch in der mikroskopischen Kontrolle ein Defekt oder wenigstens der Verdacht auf einen solchen festgestellt.

In den zwei Versuchen mit Silizium-Membranfiltern der Porengröße 0,81 μm und dem Testorganismus *Lactobacillus brevis* wurde für die Verdünnungsstufen 3 und 4 eine massive Keimpassage in Form eines flächigen Organismenwachstums festgestellt. Die durchschnittliche Rückhalterate für die Verdünnungsstufen 1 und 2 lag bei 92,84712268% bei einer mittleren Gesamttestkeimbeaufschlagung von $4,10 \times 10^5$ KBE. Für die Porengrößen 0,65 μm und 0,59 μm wurde eine deutliche Steigerung der durchschnittlichen Rückhalteraten auf 99,47209052% (8 Versuche; \emptyset Testkeime: $4,90 \times 10^5$ KBE; \emptyset Befunde: 33/296/1439/3354 KBE) und 99,82646037% (7 Versuche; \emptyset Testkeime: $4,47 \times 10^5$ KBE; \emptyset Befunde: 11/87/613/2327 KBE) ermittelt. Silizium-Membranfilter mit mittleren Porendurchmessern von 0,54 μm , 0,52 μm , 0,5005 μm und 0,4985 μm zeigten eine nochmalige Verbesserung des Rückhaltevermögens auf durchschnittlich 99,99891917% (8 Versuche; \emptyset Testkeime: $4,13 \times 10^5$ KBE; \emptyset Befunde: 0/0,5/8,6/44 KBE), 99,99722678% (7 Versuche; \emptyset Testkeime: $2,90 \times 10^5$ KBE; \emptyset Befunde: 0,3/0,1/1,1/16 KBE), 99,99877499% (6 Versuche; \emptyset Testkeime: $4,94 \times 10^5$ KBE; \emptyset Befunde: 0,2/0/0,5/0,7 KBE) und 99,99792213% (11 Versuche; \emptyset Testkeime:

$5,23 \times 10^5$ KBE; Ø Befunde: 0/2,2/12/79 KBE), ohne dass eine vollständige Abtrennung aller Testkeime erreicht wurde. Somit konnte für den Testorganismus *Lactobacillus brevis* noch keine Porengröße als Trenngrenze ermittelt werden (vgl. Tab. 4–2, Abb. 4–6).

Tab. 4-2: Übersicht – Bestimmung des Rückhaltevermögens von Silizium-Membranfiltern für bierschädliche Bakterien

Silizium-Membranfilter	Lactobacillus brevis				Pediococcus damnosus			
	mittlere Rückhalterate [%]	mittlere Standardabweichung	Messwerte [n]	Ausreißer [n]	mittlere Rückhalterate [%]	mittlere Standardabweichung	Messwerte [n]	Ausreißer [n]
0,92					99,35060946	0,59699	4	0
0,81	92,84712268	0,59642	2	0	99,96275121	0,04048	5	3
0,65	99,47209052	0,62470	8	2	99,99839142	0,00179	4	0
0,59	99,82646037	0,13621	7	1	99,99892567	0,00282	7	1
0,54	99,99891917	0,00078	8	2				
0,52	99,99722678	0,00692	7	5	99,99992475	0,00013	3	0
0,50	99,99877499	0,00396	6	14				
0,50	99,99792213	0,00254	11	37	100,00000000	0,00000	5	3

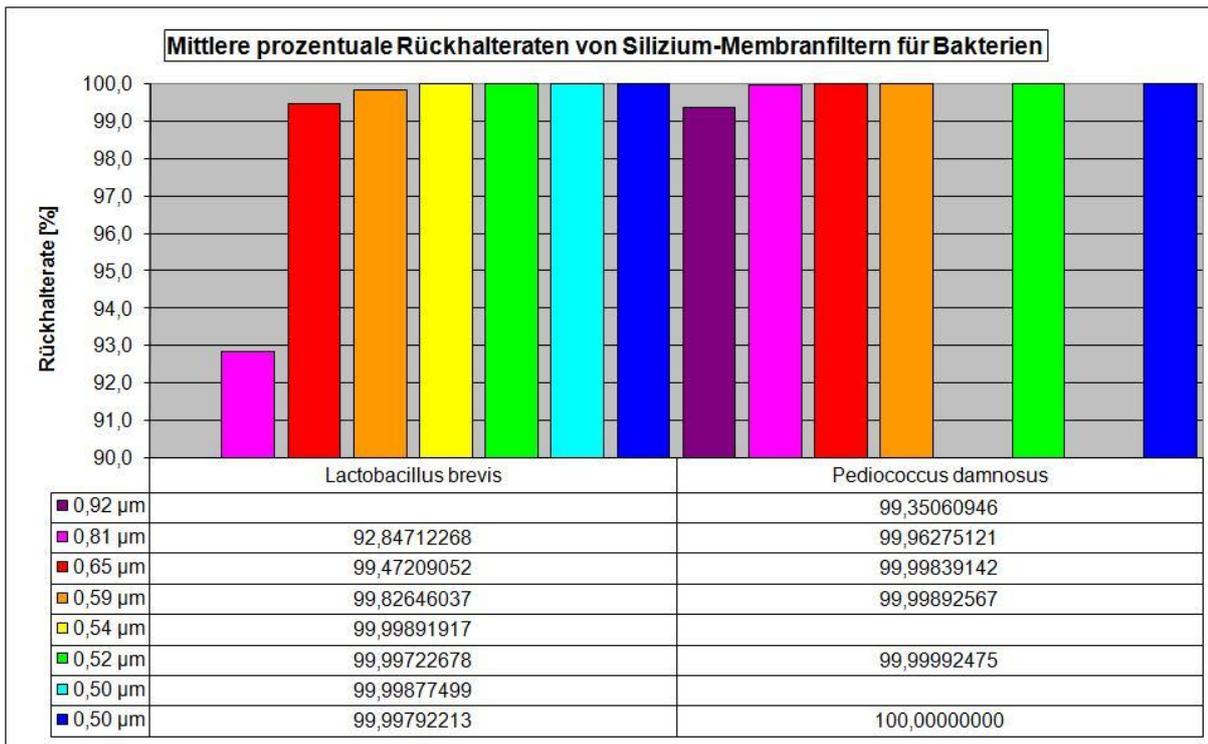


Abb. 4-6: Mittlere prozentuale Rückhalteraten von Silizium-Membranfiltern für Bakterien (*Lactobacillus brevis*, *Pediococcus damnosus*)

Durch die graphische Darstellung der logarithmischen Rückhalteraten (LRV) wird ersichtlich, dass für die Porengröße 0,5005 µm das deutlich günstigste Rückhaltevermögen gegenüber dem Testkeim *Lactobacillus brevis* nachgewiesen wurde (vgl. Abb. 4–7). Die LRV-Kurve für die Porengröße 0,5005 µm liegt entsprechend der mit diesen Filtern erzielten weitgehenden Abtrennung der Testkeime nahezu auf dem idealen Kurvenverlauf der vollständigen Abscheidung. Für Filter mit mittleren Porendurchmessern von 0,4985 µm, 0,52 µm und 0,54 µm zeigte sich dagegen ab der zweiten (0,4985 µm) bzw. dritten Verdünnungsstufe (0,52 µm, 0,54 µm) ein Abweichen vom idealen Kurvenverlauf und ein Übergang zu konstanten LRVs. Die LRVs für Filter der Porengrößen 0,59 µm und 0,65 µm liegen gegenüber den kleineren Porengrößen deutlich niedriger. Ihr Verlauf deutet einen minimalen Anstieg der LRVs ab der dritten bzw. vierten Verdünnungsstufe an, der durch eine zunehmende Trennwirkung infolge des Aufbaus einer filtrationswirksamen Deckschicht nach dem Prinzip der Kuchenfiltration auf der Oberfläche der Silizium-Membranfilter bedingt sein sollte.

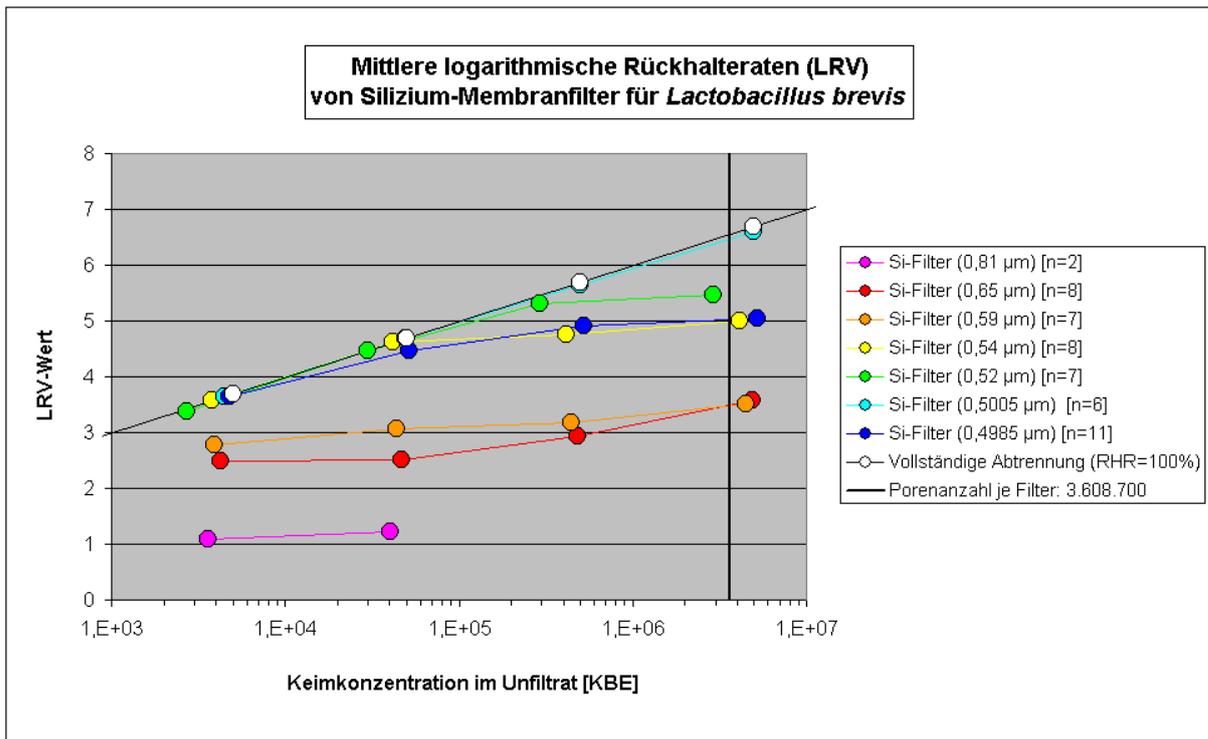


Abb. 4-7: Mittlere logarithmische Rückhalteraten (LRV) von Silizium-Membranfiltern für *Lactobacillus brevis*

4.1.6 Rückhaltevermögen von Silizium-Membranfiltern für *Pediococcus damnosus*

Bei der Bestimmung des Rückhaltevermögens von Silizium-Membranfiltern für das bierschädliche Bakterium *Pediococcus damnosus* ergab sich in den Versuchen mit kleinen Porengrößen das grundsätzliche Problem, dass die Durchsatzraten und die gewonnenen Filtratvolumina deutlich niedriger als bei allen übrigen Kombinationen von Filtern und Testorganismen lagen. So konnte nur in 4 von 29 Versuchen in der maximalen Verdünnungsstufe 4 das geforderte Filtratvolumen von 45 ml erzielt werden; in vielen Fällen wurde das Volumen dagegen sogar deutlich verfehlt. Daher wurden die Ergebnisse für die vierte Verdünnungsstufe 4 nicht in der Auswertung berücksichtigt. Auch die Angaben zur durchschnittlichen prozentualen Rückhalterate beruhen entsprechend nur auf den Ergebnissen für die Verdünnungsstufen 1 bis 3.

Durch den Einsatz von Silizium-Membranfiltern mit einer mittleren Porengröße von 0,50 µm (0,4985 µm) konnte in 5 Einzelversuchen eine vollständige Abscheidung der im Mittel $2,9 \times 10^5$ eingesetzten Testkeime realisiert werden. Wegen der ungenügenden Keimbeaufschlagung mit der dritten Verdünnungsstufe ist diese

Porengröße jedoch noch nicht als Trenngrenze bestätigt. Auch in 3 Versuchen mit der Porengröße 0,52 µm wurde bei einer mittleren Rückhalterate von 99,999977424% bereits eine nahezu vollständige Abscheidung der Testkeime erreicht. Lediglich in einem Versuch wurde ein einzelner Befund in der dritten Verdünnungsstufe festgestellt (\emptyset Testkeime: $5,3 \times 10^5$ KBE; \emptyset Befunde: 0/0/0,3 KBE). In den sieben Versuchen mit Silizium-Membranfiltern mit einem mittleren Porendurchmesser von 0,59 µm wurden bei einer mittleren Gesamttestkeimbeaufschlagung von $3,4 \times 10^5$ KBE im Mittel Befunde in Höhe von 0/0,4/0,4 KBE entsprechend einer durchschnittlichen Rückhalterate von 99,99892567% festgestellt. Für die Porengrößen 0,65 µm, 0,81 µm und 0,92 µm wurden dagegen deutlich ungünstigere Rückhalteraten ermittelt. Die mittlere Rückhalterate lag für die Porengröße 0,65 µm bei 99,99839142%. (4 Versuche; \emptyset Testkeime: $4,9 \times 10^5$ KBE; \emptyset Befunde: 0/1,5/6,8 KBE), für die Porengröße 0,81 µm bei 99,96275121% (5 Versuche; \emptyset Testkeime: $5,1 \times 10^5$ KBE; \emptyset Befunde: 1,8/5,6/265 KBE) und für die Porengröße 0,92 µm bei 99,35060946% (4 Versuche; \emptyset Testkeime: $4,8 \times 10^5$ KBE; \emptyset Befunde: 27/326/3218 KBE) (vgl. Tab. 4–2, Abb. 4–6).

Aus der graphischen Darstellung der logarithmischen Rückhalteraten (LRV) von Silizium-Membranfiltern für den Testorganismus *Pediococcus damnosus* wird ersichtlich, dass die Ergebnisse für die vierte Verdünnungsstufe fehlen und mit der dritten Verdünnungsstufe noch nicht die nach DIN 58355-3 anzustrebende Testkeimbeaufschlagung der Filter erreicht wurde. Dadurch ist eine abschließende Bewertung zum Rückhaltevermögen der Filter gegenüber diesem Testkeim noch nicht möglich (vgl. Abb. 4–8). In der graphischen Darstellung der logarithmischen Rückhalteraten (LRV) von Silizium-Membranfiltern mit Porendurchmessern von 0,50 µm, 0,52 µm und 0,59 µm wird die vollständige (0,50 µm) bzw. weitgehende Abscheidung der Testkeime verdeutlicht. Die Ergebnisse für die übrigen drei Porengrößen zeigen dagegen ein deutlich nachlassendes Rückhaltevermögen. Die für die Porengröße 0,65 µm ermittelten LRVs steigen mit den Verdünnungsstufen 1 bis 3 leicht an (LRV-VS1: 3,5802; LRV-VS2: 4,4509; LRV-VS3: 4,9413), d.h. die prozentuale Rückhalterate stieg mit jeder Verdünnungsstufe weiter an, was auf eine verringerte Verfügbarkeit von Poren mit relativ großem Durchmesser durch Verstopfung mit größeren Testkeimen zurückzuführen sein könnte. Dagegen sind die LRV-Werte in den Kurvenverläufen für die Porengrößen 0,81 µm (LRV-VS1: 3,4142;

LRV-VS2: 4,0638; LRV-VS3: 3,7094) und 0,92 μm (LRV-VS1: 2,6089; LRV-VS2: 2,5266; LRV-VS3: 2,1657) nahezu konstant, d.h. in den Versuchen wurden in allen Verdünnungsstufen gleiche prozentuale Anteile an Testkeimen entfernt und die Keimpassage stieg mit jeder Verdünnungsstufe im gleichen Verhältnis wie die Testkeimbeaufschlagung mit dem Unfiltrat.

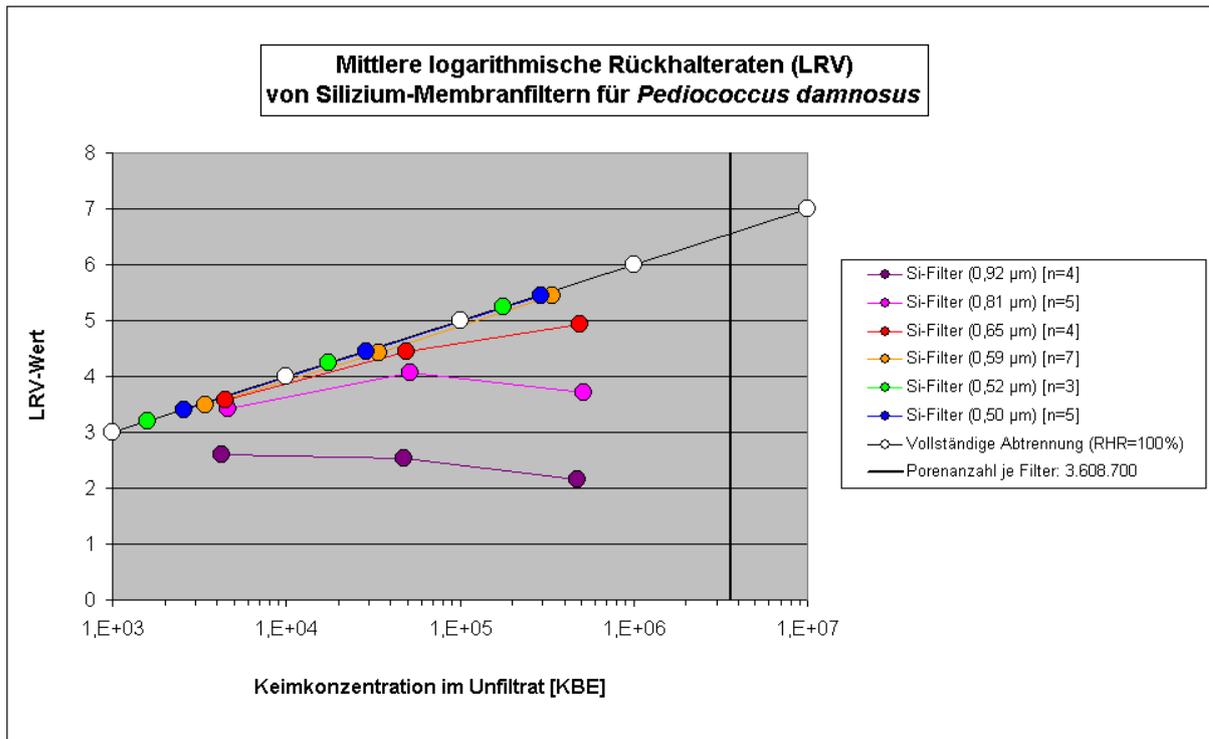


Abb. 4-8: Mittlere logarithmische Rückhalteraten (LRV) von Silizium-Membranfiltern für *Pedococcus damnosus*

4.2 PCR & Fluoreszenz

4.2.1 Eignung von Fluoreszenzfarbstoffen

- **5,6-Carboxyfluoresceindiacetat-succinimidylester (CFDA,SE)**

Mit 5,6-Carboxyfluoresceindiacetat-succinimidylester (CFDA,SE) als Vitalfarbstoff konnten bei der Färbung der auf den Silizium-Membranfiltern aus isotonischer Kochsalzlösung zurückgehaltenen Zellen noch im Filtergehäuse oder im demontierten Zustand zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden. Lebende Zellen mit einer Esterase-Aktivität zeigten eine intensive grüne Fluoreszenz, die bei der Beobachtung im Mikroskop im Vergleich zu den anderen Farbstoffen deutlich kürzere Belichtungszeiten erforderte. Auch Versuche zur Differenzierung von lebenden

Zellen und toten Zellen, die zuvor mit Propidiumiodid (PI) rot markiert wurden, zeigten günstige Ergebnisse (vgl. Abb. 4–9, oben).

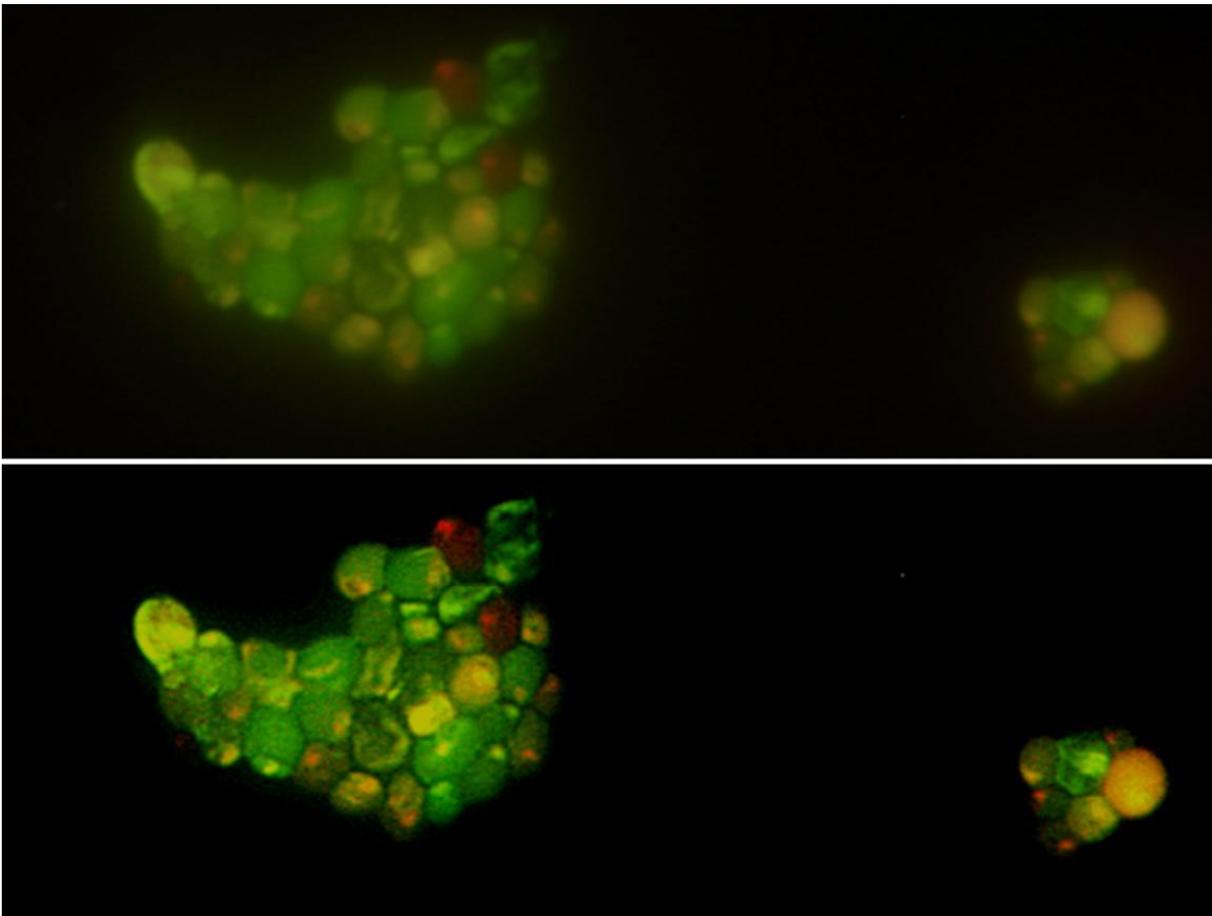


Abb. 4-9: Lebend-Tot-Differenzierung von Hefezellen (*S.carlsbergensis*) durch Fluoreszenzmarkierung mit CFDA,SE und PI (oben); Verbesserung der Differenzierbarkeit durch Bildbearbeitung (unten)

Nach Optimierung der Darstellungsqualität durch die Bildbearbeitungssoftware des Fluoreszenzmikroskops ergab sich eine nochmals erleichterte strukturelle und farbliche Differenzierung von Zellen (vgl. Abb. 4–9, unten). So zeigten lebende Zellen eine weitestgehend grüne Färbung, tote Zellen dagegen eine rote Färbung. Gelbe Bereiche sind das Ergebnis einer Überlagerung der beiden Fluoreszenzen. Zahlreiche Zellen besaßen eine intensive grüne Grundfarbe, die auf eine hohe Esterase-Aktivität bei lebenden Zellen schließen lässt, und zusätzlich eine gelbe bis orange-rote Färbung in der Kernregion.

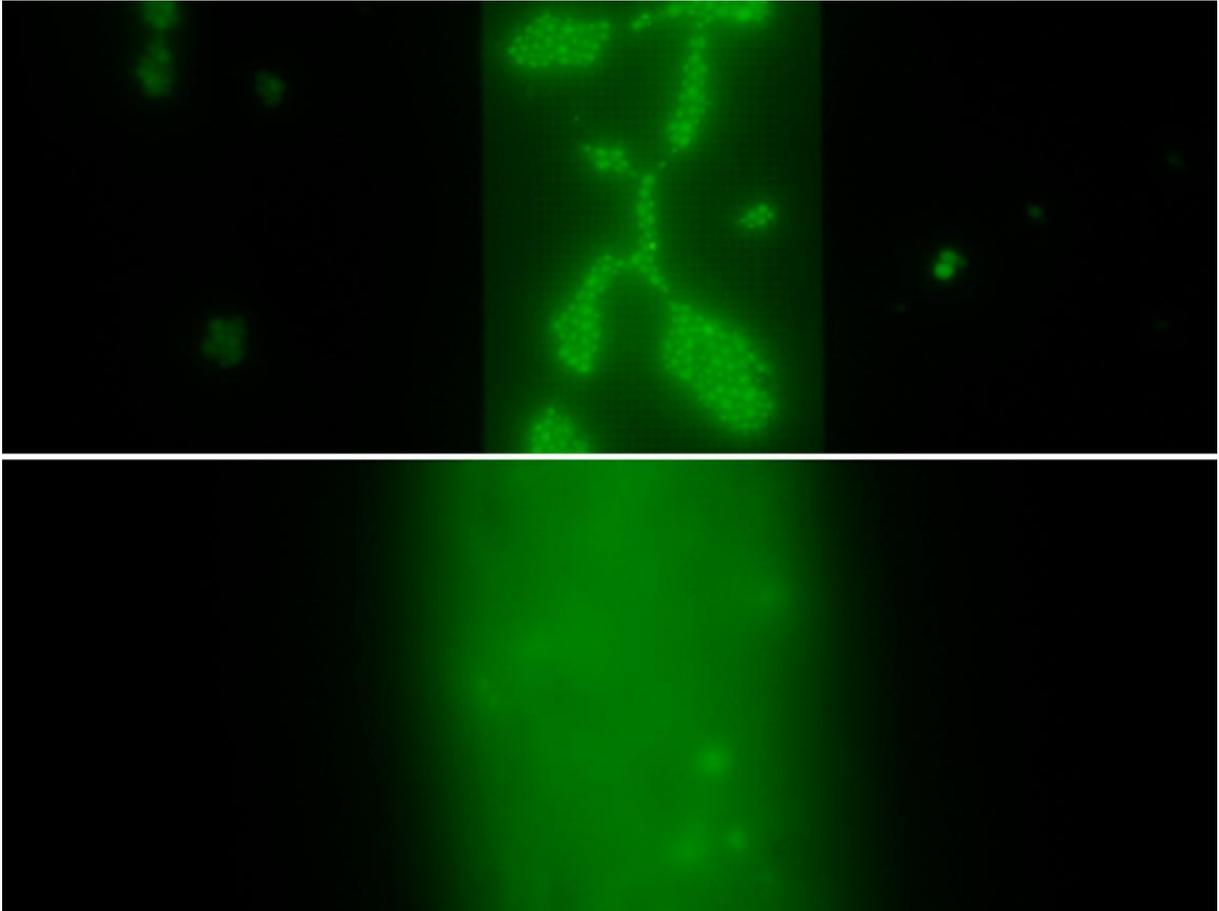


Abb. 4-10: Fluoreszenzmarkierung mit CFDA,SE bei Hefezellen (*S.carlsbergensis*) durch Färbung der Zellen auf dem Silizium-Membranfilter (oben) oder in der Unfiltratlösung (unten)

Ein massives Problem ergab sich bei der Färbung der Mikroorganismen mit CFDA,SE vor der Filtration in der Unfiltratlösung. Die Lösungen mit den Testorganismen zeigten nach der Zugabe des Farbstoffs eine grüne Färbung und partikuläre Ausfällungen. In den Versuchen ergab sich eine massive Verblockung der Silizium-Membranfilter, so dass nur minimale Aliquote des Unfiltratvolumens filtriert werden konnten. Eine Versuchsdurchführung war so nicht möglich. Nach der Demontage der Filter waren bereits visuell deutlich Ablagerungen auf der Filteroberfläche erkennbar. Im mikroskopischen Bild zeigte sich eine massive unstrukturierte Deckschicht mit grüner Färbung, die die Porenstruktur der Silizium-Membranfilter und ggf. auf dieser zurückgehaltene Zellen weitgehend bis vollständig bedeckte (vgl. Abb. 4–10, unten).

- **4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)**

Die Färbung von Zellen mit DAPI ergab gemeinhin eine intensive blaue Fluoreszenz. Sowohl Hefe- als auch Bakterienzellen in isotonischer Kochsalzlösung konnten bereits ohne Bildbearbeitung sehr gut erkannt und differenziert werden (vgl. Abb. 4–11).

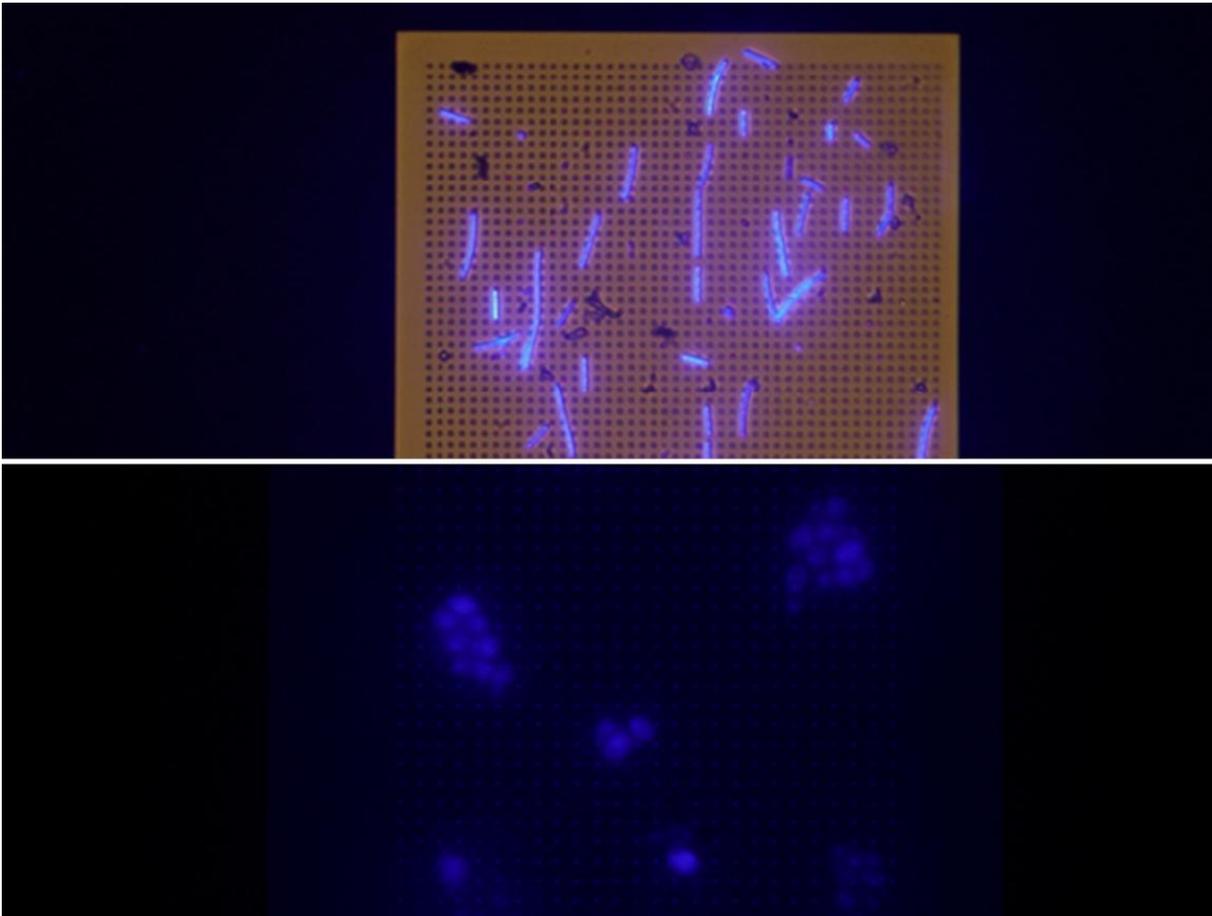


Abb. 4-11: Fluoreszenzmarkierung von Bakterienzellen (*L.brevis*) mit DAPI (oben); Fluoreszenzmarkierung von Hefezellen (*S.carlsbergensis*) DAPI (unten)

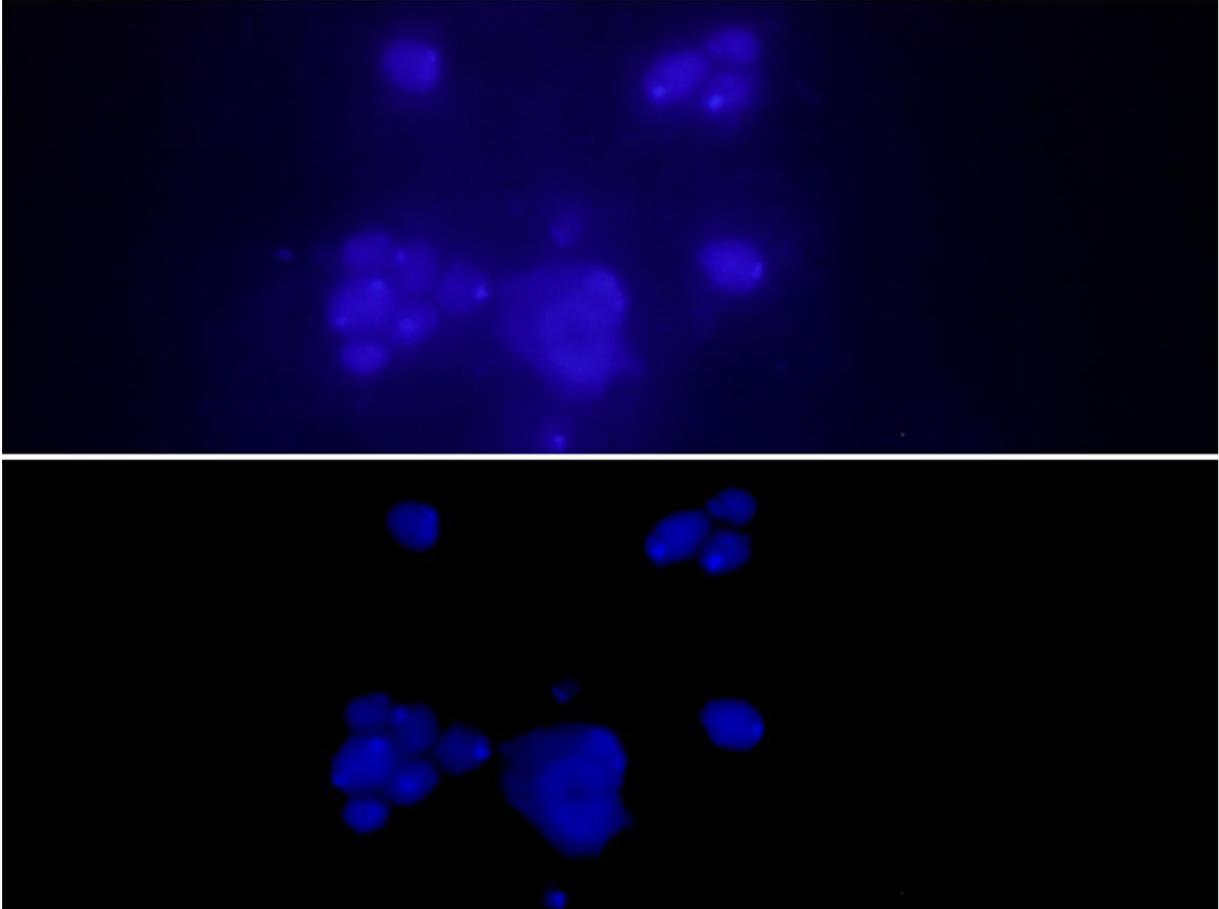


Abb. 4-12: Beeinträchtigung der optischen Auswertung nach DAPI-Markierung von Hefezellen (*S.carlsbergensis*) aus Bierproben durch Sekundärfärbungen (oben); Verbesserung der Differenzierbarkeit bei Bierproben durch Bildbearbeitung (unten)

Auch die Lokalisierung der Zellkerne, in denen eine Konzentrierung des DAPI wegen des hohen Gehalts an DNA erwartet werden konnte, war innerhalb der Zellen meist problemlos möglich. Eine Einschränkung hinsichtlich der Anwendung von DAPI für die Färbung von Mikroorganismen ergab sich, wenn die Zellen im Probemedium Bier vor der Filtration durch Zugabe des Fluorochroms in die Unfiltratlösung markiert wurden. In diesen Versuchen trat eine Behinderung der Auswertung durch das Auftreten von sekundären Färbungen auf. Zum einen zeigten einzelne nicht definierbare Partikel eine besonders helle und ausgeprägte Fluoreszenz, die die benachbarten Objekte im Bildausschnitt mitunter überstrahlte und eine Auswertung unmöglich machte. Zum anderen kam es zur Ablagerung einer diffus gefärbten Deckschicht auf der Oberfläche der Silizium-Membranfilter, die die Differenzierung der Mikroorganismen gegen die Umgebung und gegeneinander deutlich erschwerte

(vgl. Abb. 4–12, oben). Durch den Einsatz der Bildbearbeitungssoftware des eingesetzten Fluoreszenzmikroskops konnte dieses Problem aber meist ausgeglichen werden (vgl. Abb. 4–12, unten). Das Auftreten der gefärbten Deckschicht ging üblicherweise mit einer Abnahme der Durchsatzraten einher, so dass entsprechend bei der Dead-End-Filtration von Bierproben für den Nachweis von bakteriellen Kontaminanten bei mittleren Porengrößen von 0,5 bis 0,6 μm das Probevolumen von 50 ml auf 20 ml reduziert wurde.

- **Propidiumiodid (PI)**

Die Markierung von Mikroorganismen auf der Oberfläche von Silizium-Membranfiltern mit Propidiumiodid (PI) führte bei toten Zellen zu einer intensiven roten Fluoreszenz, die bereits bei einer Anwendungskonzentration von 0,005 $\mu\text{g/ml}$ und einer Inkubation für 5 Minuten bei 37°C erzielt wurde (vgl. Abb. 4–13, oben).

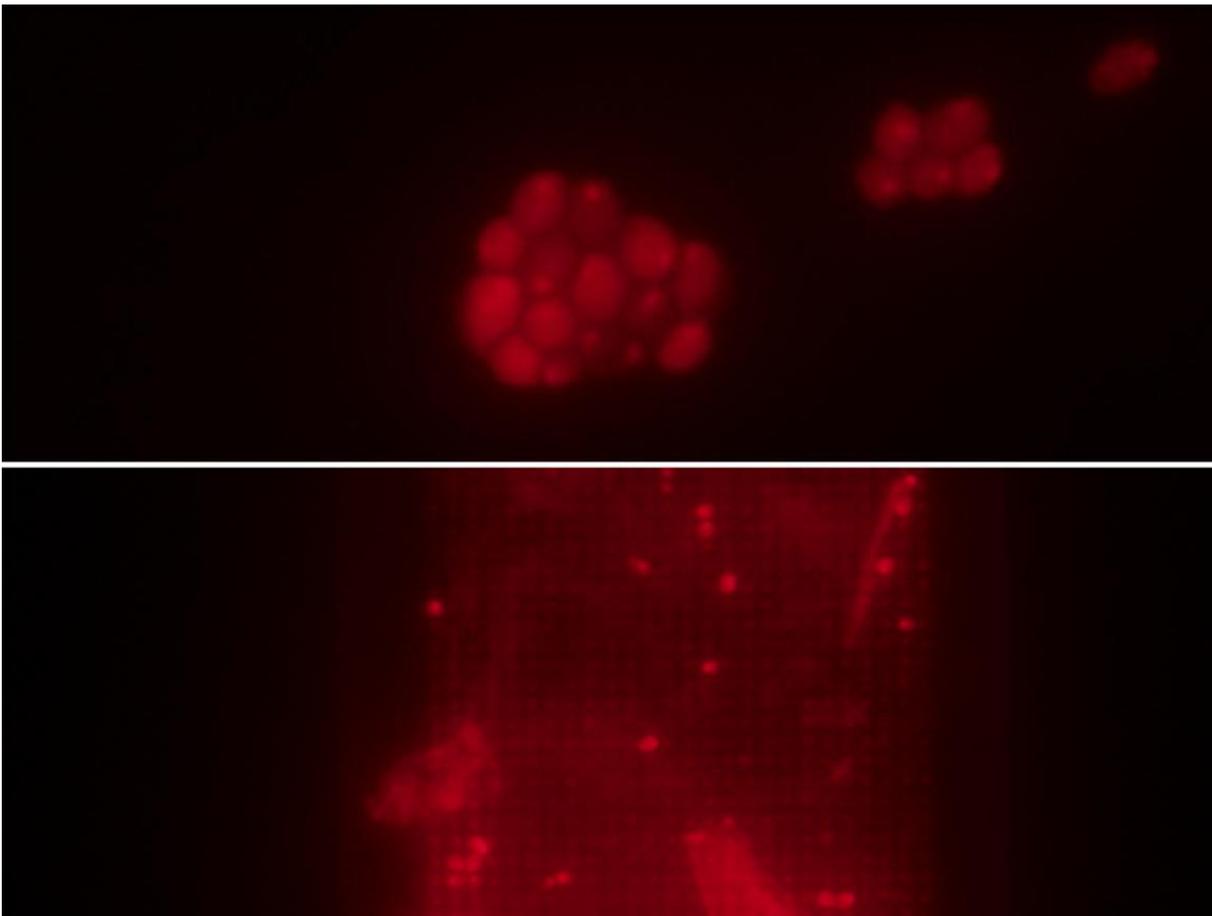


Abb. 4-13: Fluoreszenzmarkierung mit PI bei Hefezellen (*S.carlsbergensis*) aus isotonischer Kochsalzlösung (oben) und Bier (unten)

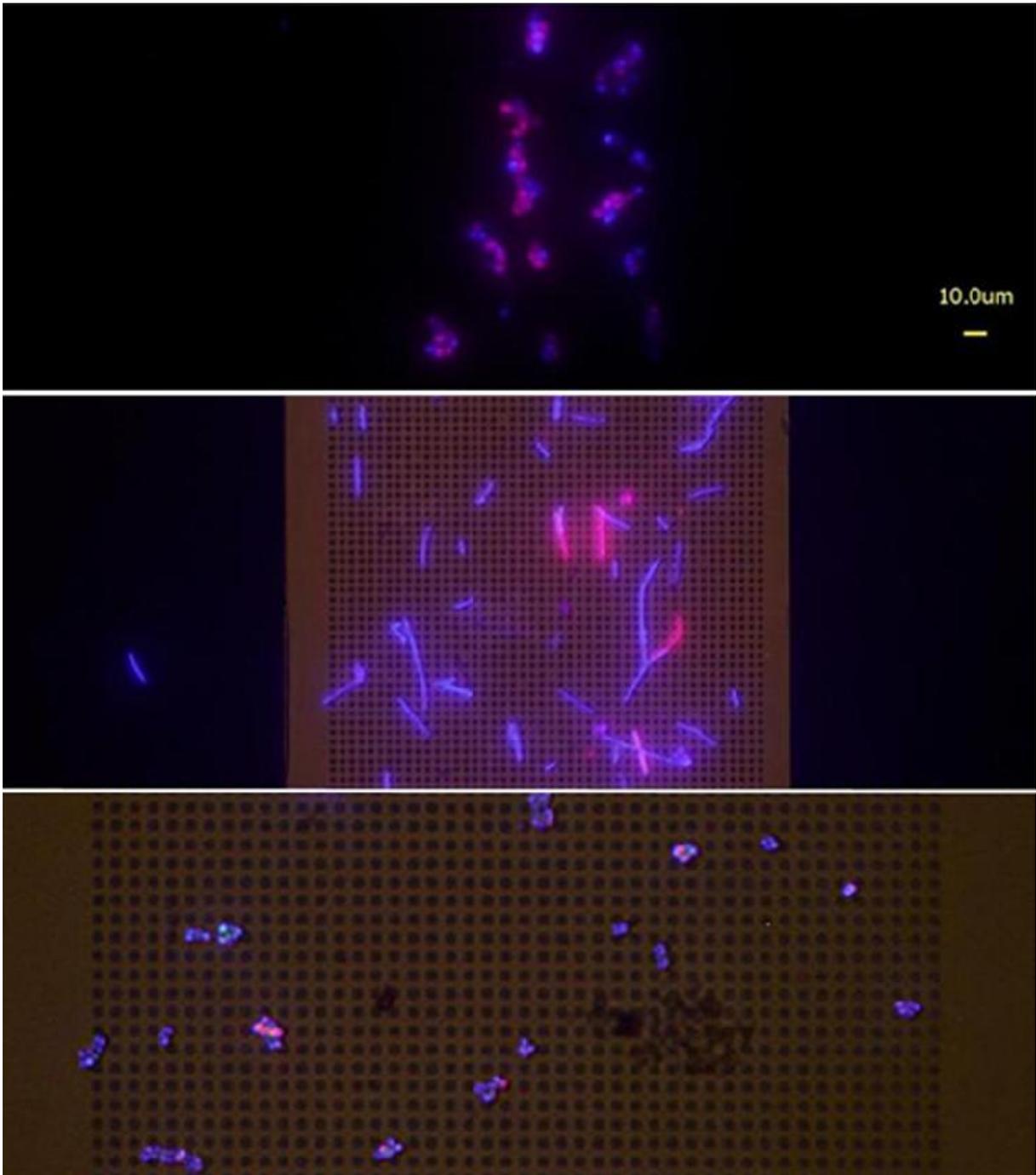


Abb. 4-14: Differenzierung von lebenden und toten Zellen durch Fluoreszenz-Markierung mit DAPI und PI bei *S.carlsbergensis* (oben), *L.brevis* (Mitte) und *P.damnokus* (unten)

Bei Proben aus dem Medium Bier ergaben sich bei der Anwendung von PI vergleichbare Probleme wie bei DAPI (vgl. Abb. 4–13, unten). Auch bei diesem Farbstoff trat eine starke sekundäre Färbung auf, die auf eine Interaktion zwischen dem Fluorochrom und Bierinhaltsstoffen zurückzuführen sein dürfte. Dabei

erschwerten sowohl angefärbte Partikel als auch flächige, unstrukturierte und vermutlich kolloidale Strukturen die Auswertung. Propidiumiodid (PI) wurde in den Versuchen insbesondere bei der Lebend-Tot-Differenzierung zur Gegenfärbung bei Vital-Färbungen eingesetzt. Besonders gute Ergebnisse wurden dabei durch die kombinierte Anwendung von PI und DAPI erreicht. Es zeigte sich jedoch neben der blauen Markierung von lebenden Zellen durch DAPI nur selten die für PI typische intensiv rote Markierung von toten Zellen. Stattdessen wurden zahlreiche Abstufungen von Mischönen aus den Grundfarben Rot und Blau festgestellt (vgl. Abb. 4–14). Diese Beobachtung bestätigt, dass DAPI grundsätzlich in alle Zellen eindringt, während PI nur in Zellen mit beschädigter Zellmembran eindringen kann.

4.2.2 Prozeduren zur Markierung von Mikroorganismen mit Fluoreszenz-Farbstoffen

- **Markierung der Mikroorganismen auf demontierten Silizium-Membranfiltern**

Die Färbung von Mikroorganismen auf Silizium-Membranfiltern nach der Demontage der Filter aus dem Filtergehäuse erwies sich in der Handhabung als die kontrollierteste, aber auch aufwendigste Vorgehensweise. Die Färbeprozedur auf den ausgebauten Filtern zeigte im Vergleich zu den anderen angewendeten Vorgehensweisen einen leicht erhöhten Arbeits- und Zeitaufwand, weil zahlreiche Arbeitsschritte manuell ausgeführt werden mussten. Als ein besonderer Vorteil dieses Verfahrens erwies sich die direkte visuelle Kontrolle der Färbeprozedur. So konnte die vollständige und gleichmäßige Beaufschlagung der Filteroberfläche mit Farbstofflösung unmittelbar kontrolliert werden. Dennoch ergaben sich bei der Dosierung der Farbstoffe Probleme, weil die verabreichte Farbstofflösung wiederholt unkontrolliert seitlich vom Filter oder bei Silizium-Membranfiltern mit größeren Porendurchmessern auch durch den Filter ablief. Die Inkubation der Mikroorganismen konnte dagegen bei dieser Färbeprozedur optimal dargestellt werden, weil eine genaue Temperierung durch das Verbringen der lichtgeschützten Petrischalen in einen Wärmeschrank problemlos realisiert werden konnte. Bei der Färbung von Mikroorganismen auf der Oberfläche von Silizium-Membranfiltern nach deren Demontage aus dem Filtergehäuse wurden hinsichtlich der Qualität der Fluoreszenzmarkierung mit den drei verwendeten Farbstoffen (CFDA, SE, DAPI, PI) gute Ergebnisse erzielt.

Allerdings ergaben sich bei der Färbung der Mikroorganismen auf den ausgebauten Silizium-Membranfiltern zwei andere wesentliche Probleme. Zum einen zeigte sich in den Versuchen mit Bakterien, dass sich das Verfahren offensichtlich abträglich auf die Vitalität der anzufärbenden Keime auswirkt. Vor allem in den Versuchen zur Lebend-Tot-Differenzierung von *L.brevis* durch kombinierte Färbung mit DAPI und PI zeigte sich bei fast allen Zellen eine deutlich Markierung mit PI, wie sie nur bei Zellen mit beschädigter Zellmembran auftreten kann (vgl. Abb. 4–15, unten). Zum anderen kam es bei der Aufgabe der Farbstofflösung auf die Filteroberfläche zu einer umfangreichen Ablösung von Zellen. So wurde bei der Auswertung im Fluoreszenzmikroskop festgestellt, dass sich im Zuge der Färbeprozedur zahlreiche Zellen in die Bereiche zwischen den 75 Porenmembranen umgelagert hatten (vgl. Abb. 4–15, oben).

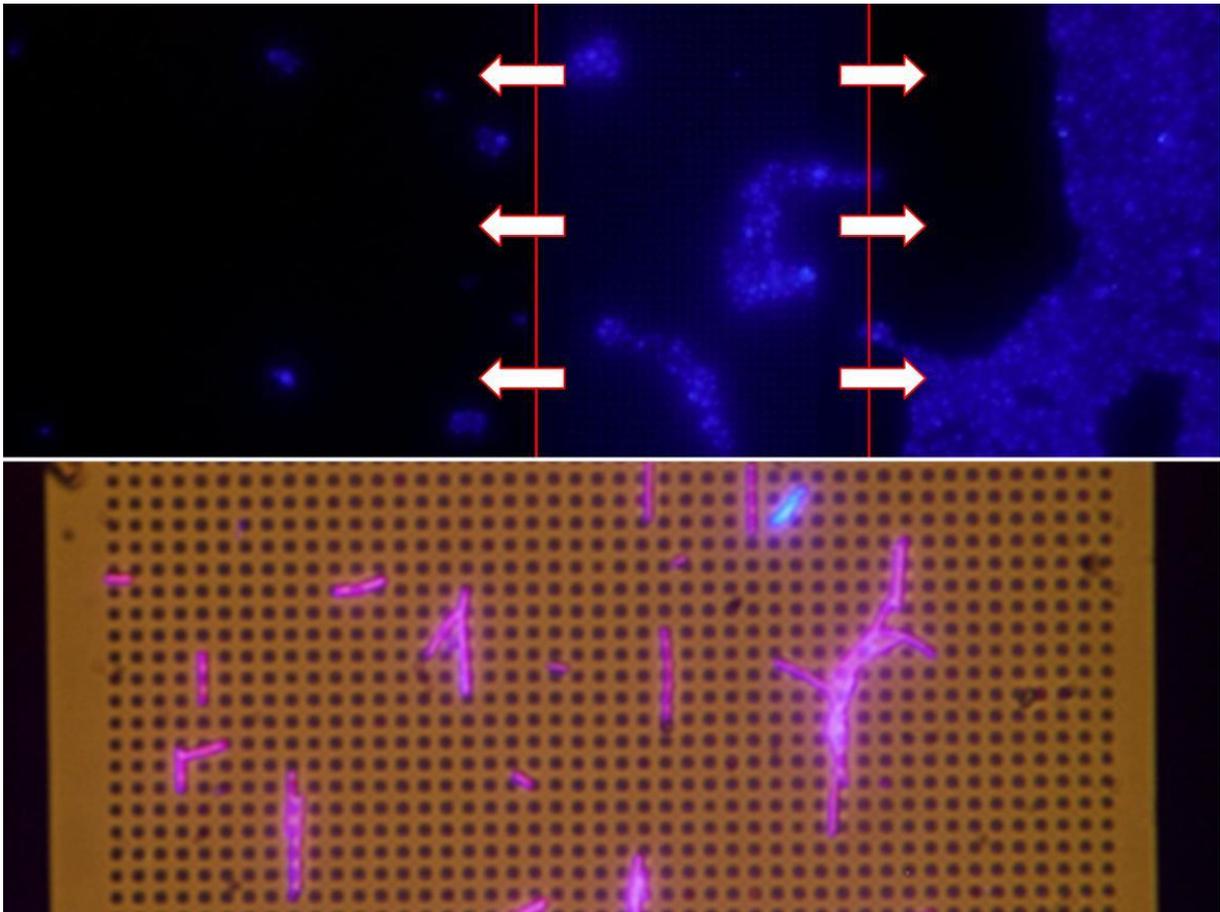


Abb. 4-15: Verlagerung von abgeschiedenen Mikroorganismen aus Bereichen mit filtrationswirksamer Porenmembran in periphere Bereiche (oben); Schädigung von Testkeimen bei Färbung auf demontierten Silizium-Membranfiltern (unten)

- **Färbung von Mikroorganismen auf im Filtergehäuse montierten Silizium-Membranfiltern**

Wegen des geringen Versuchsumfanges für diese Form der Färbeprozedur [n=3] kommt den nachfolgend dargelegten Erkenntnissen orientierender Charakter zu, wobei grundlegende Problemstellungen eindeutig differenziert werden konnten. In den Versuchen ergaben sich Schwierigkeiten durch die noch nicht für die spezielle Anwendung der Fluoreszenzmarkierung angepasste Bauform des Filtergehäuses. So konnte nicht die gleichmäßige Beaufschlagung der Filteroberfläche mit Farbstofflösung kontrolliert werden. Zudem wurde insbesondere bei Silizium-Membranfiltern mit mittleren Porengrößen $> 1,0 \mu\text{m}$ ein unkontrolliertes Ablaufen von Farbstofflösung beobachtet, so dass hier eine ausreichende Inkubation der anzufärbenden Mikroorganismen nicht garantiert ist. Zudem war bei der eingesetzten technischen Ausstattung während der Färbeprozedur keine Temperierung möglich, so dass die Versuche mit CFDA,SE nicht im optimalen Temperaturbereich für die Esterase-katalysierte Umwandlung des fluorogenen Substrats erfolgen konnte.

- **Färbung von Mikroorganismen vor der Filtration mit Silizium-Membranfiltern**

Die Fluoreszenzmarkierung der Mikroorganismen schon im Unfiltrat und vor der Filtration über die Silizium-Membranfilter erwies sich als die praktikabelste Färbeprozedur bei gleichzeitig geringstem Arbeits- und Zeitaufwand. Die Zugabe der Farbstoffe erfolgte einfach in die Unfiltratlösung, die anschließend inkubiert wurde. Bei der nachfolgenden Filtration wurden die markierten Mikroorganismen definiert in den filtrationswirksamen Bereichen der Silizium-Membranfilter abgeschieden.

In isotonischer Kochsalzlösung wurde eine sehr gute Markierung der Zellen mit den Farbstoffen DAPI und PI erzielt. Sowohl bei Hefen als auch bei Bakterien ergab sich eine gleichmäßige und intensive Färbung. Auch für die Färbung von Mikroorganismen in Bierproben wurden trotz des Auftretens von sekundären Färbungen nach Optimierung mit der Bildbearbeitungsfunktion des Fluoreszenzmikroskops noch zufriedenstellende Ergebnisse erzielt (vgl. Abb. 4–12, oben). Das Fluorochrom CFDA,SE erwies sich für die Färbung der Mikroorganismenzellen in der Unfiltratlösung als ungeeignet, da der Farbstoff bei dieser Färbeprozedur ausfiel und

die Bildung von komplexartigen Strukturen bewirkte, die im Anschluss eine Filtration der Lösung über die Silizium-Membranfilter unmöglich machte (vgl. Kap. 4.2.1).

4.2.3 Kombinierte Anwendung von Silizium-Membranfiltern und Real-Time-PCR

In den Versuchen zur Prüfung einer kombinierten Anwendung von Silizium-Membranfiltern und quantitativer Real-Time-Polymerasekettenreaktion (Real-Time-PCR) zum Nachweis von Schadhefen wurde in einem ersten Schritt untersucht, ob mit diesem neuen Verfahren vergleichbare Ergebnisse wie mit dem bis dato angewendeten Standardverfahren erzielt werden können und wo die Nachweisgrenzen für diese beiden Verfahren liegen.

In den Untersuchungen wurden für das Standardverfahren nach Herstellerprotokoll und für die kombinierte Anwendung von Silizium-Membranfiltern und Real-Time-PCR mit Direktlyse vergleichbare Ct-Werte erzielt (vgl. Abb. 4–16, Abb. 4–17, Tab. 9–7 (Anhang)). Hinsichtlich der Nachweisgrenze für Hefen konnten 10^1 KBE von *Saccharomyces exiguus* aus isotonischer Kochsalzlösung sowohl mit dem Standardverfahren gemäß Herstellerprotokoll aus 1 ml Probelösung als auch aus 100 ml Probelösung durch Filtration über Silizium-Membranfilter und nachfolgende Direktlyse nachgewiesen werden (vgl. Tab. 9–7 (Anhang)). Diese Nachweisgrenze wurde auch in den Untersuchungen mit Bier als Probemedium bestätigt. Es zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Ct-Werten für das Standardverfahren und die Direktlyse. Dabei wurde in den Versuchen mit Bier eine Nachweisgrenze bei 10^1 KBE nicht nur für *Saccharomyces exiguus*, sondern auch für *Saccharomyces cerevisiae varians diastaticus* nachgewiesen. In den Versuchen zeigte sich zudem eine gute Reproduzierbarkeit. Bei gleicher Organismenanzahl lagen die Ct-Werte trotz unterschiedlicher Medien und Isolierungsverfahren weitgehend auf einheitlichem Niveau (vgl. Tab. 9–7 (Anhang)).

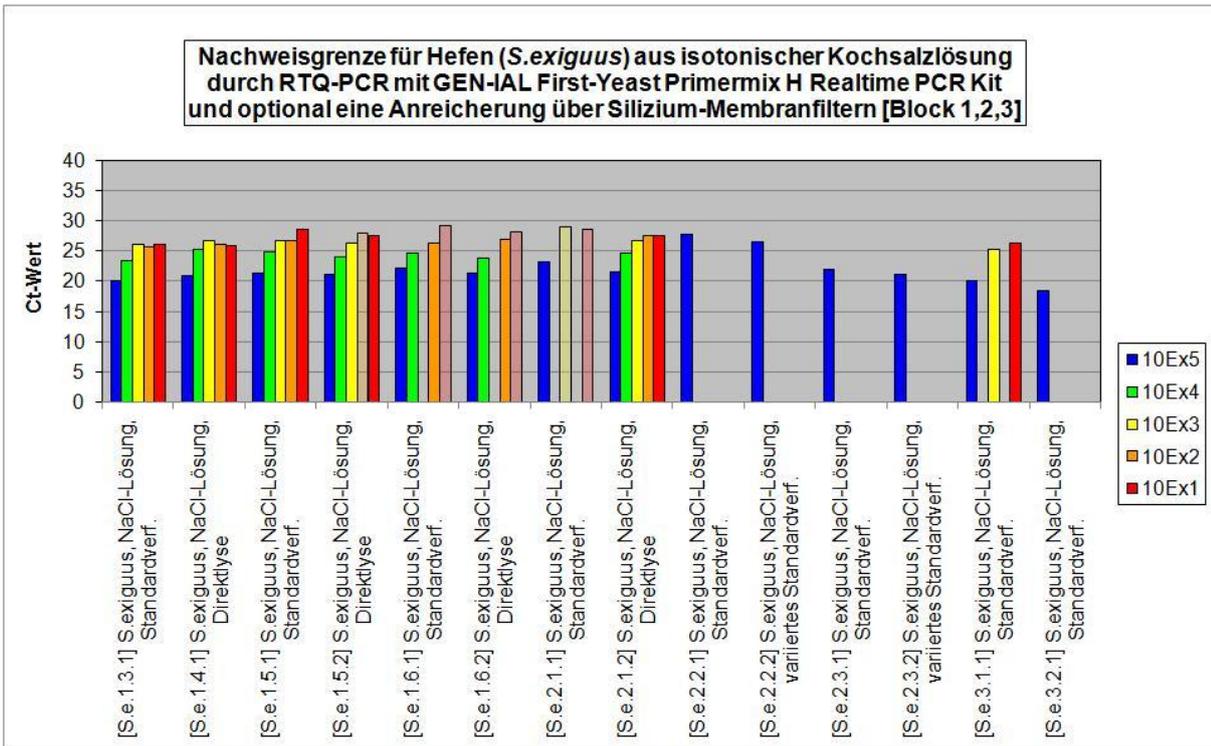


Abb. 4-16: Nachweisgrenzen für den PCR-Nachweis von Schadhefen in isotonischer Kochsalzlösung [transparente Darstellung – Messwerte mit negativer Schmelzkurvenanalyse]

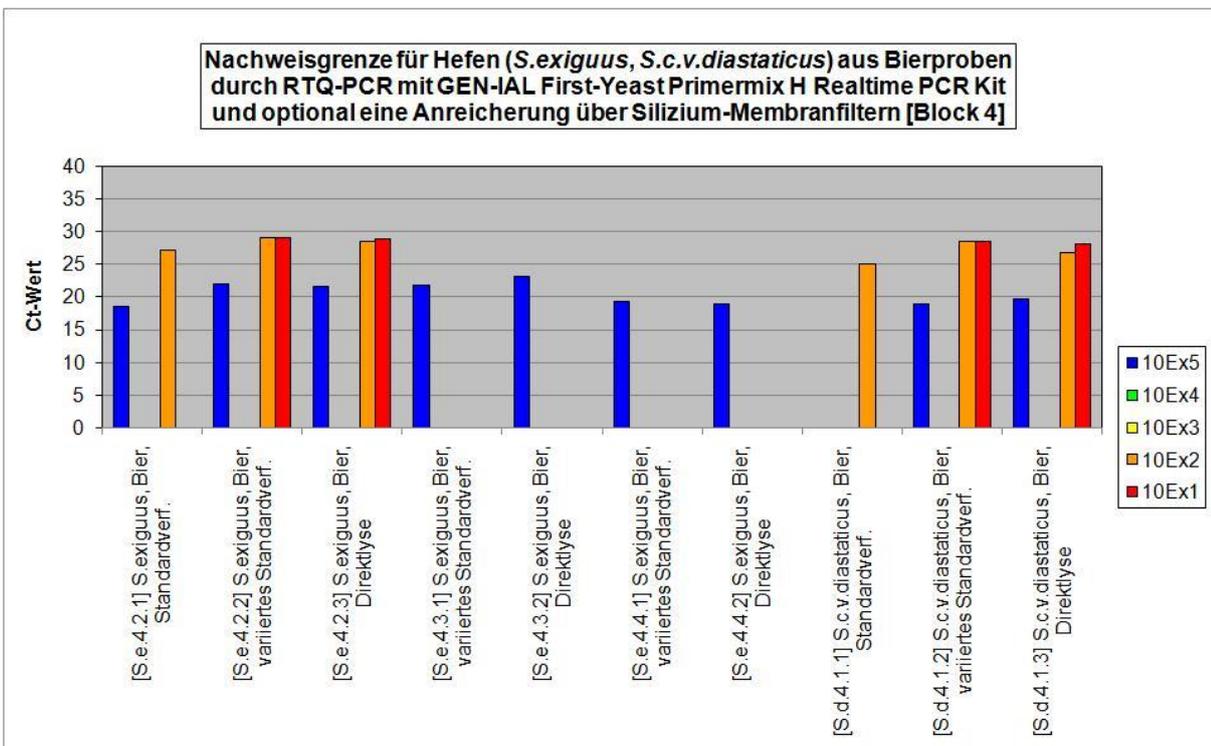


Abb. 4-17: Nachweisgrenzen für den PCR-Nachweis von Schadhefen in Bier

Die Untersuchungen zum Nachweis von bierschädlichen Bakterien mittels kombinierter Anwendung von Silizium-Membranfiltern und Real-Time-PCR wurden mit dem Testorganismus *Lactobacillus brevis* durchgeführt. Der Fokus der Analysen lag wie beim Nachweis von Hefen auf der Untersuchung der grundsätzlichen Eignung des Verfahrens im Vergleich zum Standardverfahren nach Herstellerprotokoll sowie in der Bestimmung der Nachweisgrenze.

Ein Vergleich der Verfahren ist lediglich anhand von Ergebnissen aus drei Versuchen bei einer Organismenanzahl von 10^6 KBE möglich. In diesen Untersuchungen lagen die Ct-Werte für die Direktlyse der mit Silizium-Membranfiltern aus einer Probe isolierten und konzentrierten Mikroorganismen leicht oberhalb der Ergebnisse aus den Analysen nach Standardverfahren. Lediglich in einem Fall (vgl. Abb. 4–18, Versuch L.b.4.4.X) zeigt sich dabei eine nennenswerte Abweichung mit Ct-Werten von 18,8 für das Standardverfahren bzw. 21,9 das Verfahren mit Direktlyse nach Isolierung und Konzentrierung durch Silizium-Membranfilter (vgl. Tab. 9–8 (Anhang)).

Hinsichtlich der Nachweisgrenzen für bierschädliche Bakterien konnte weder für den Nachweis von Keimen aus isotonischer Kochsalzlösung noch aus Bier mit den drei Isolierungsverfahren (Standardverfahren, variiertes Standardverfahren, Direktlyse) ein reproduzierbarer Nachweis für Organismenzahlen $< 10^4$ KBE geführt werden. Nur in einem einzelnen Versuch wurden mit dem Standardverfahren nach Herstellervorschrift (GEN-IAL) 10^2 und 10^3 KBE nachgewiesen (vgl. Tab. 9–9 (Anhang)). Damit konnte die Herstellerangabe, die eine Nachweisgrenze von 10^2 KBE für das eingesetzte PCR-Kit nennt, in den Versuchen nicht bestätigt werden. Die Reproduzierbarkeit war in den Versuchen mit Bakterien vergleichbar mit den Versuchen mit Hefen. So lagen die Ct-Werte in den Versuchen mit isotonischer Kochsalzlösung und dem Standardverfahren zwischen 18,4 und 23,5 (Anzahl der Versuche, $n = 4$; Mittelwert, $\bar{x} = 21,5$; Standardabweichung, $s = 2,44$), beim Standardverfahren und Bier zwischen 18,8 und 25,0 ($n = 5$; $\bar{x} = 22,2$; $s = 2,30$) sowie bei dem Verfahren mit Direktlyse nach Filtration über Silizium-Membranfiltern und Bier zwischen 21,9 und 27,4 ($n = 5$; $\bar{x} = 24,8$; $s = 2,01$).

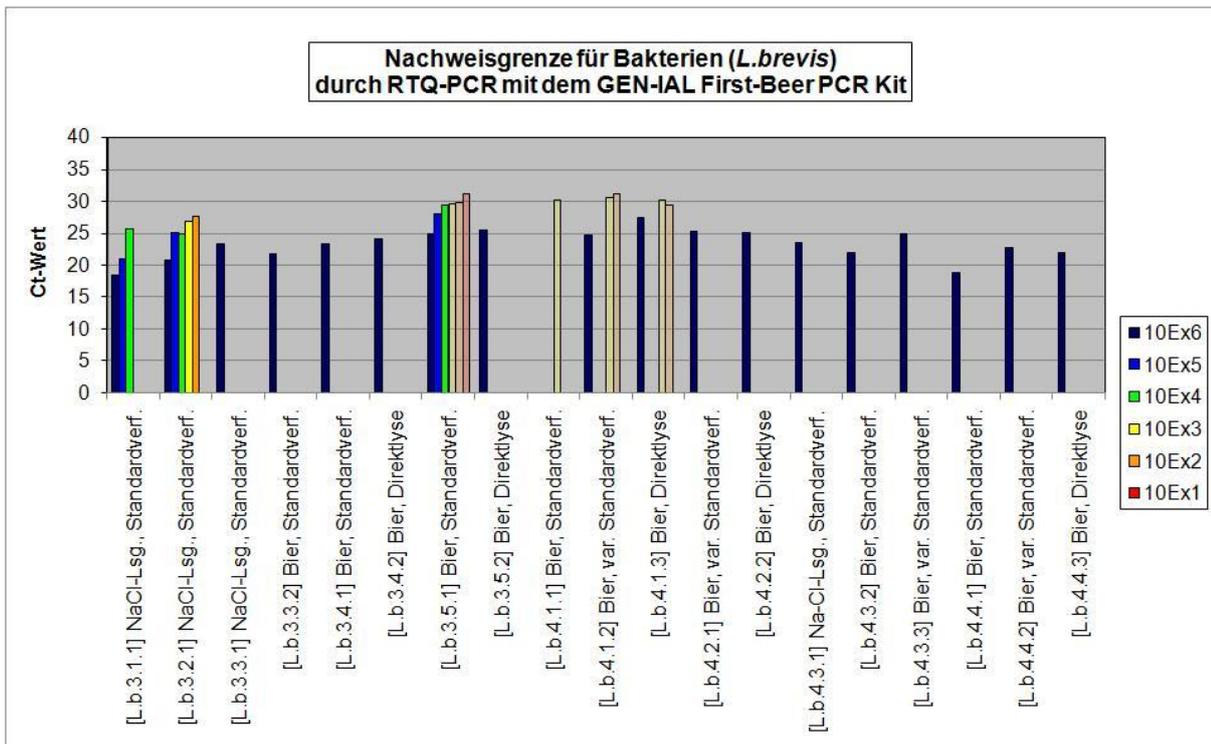


Abb. 4-18: Nachweisgrenzen für den PCR-Nachweis von *L. brevis* [transparente Darstellung – Messwerte mit negativer Schmelzkurvenanalyse]

4.2.4 Kombinierte Anwendung von Silizium-Membranfiltern, Fluoreszenzmarkierung und Real-Time-PCR

Während in den Versuchen zur Prüfung des Einflusses einer vorhergehenden Fluoreszenzmarkierung von Hefezellen auf eine nachfolgende Real-Time-PCR anfänglich noch eine Abweichung zwischen einerseits den Ct-Werten für die ungefärbte Kontrollprobe und nur mit DAPI gefärbten Zellen und andererseits mit PI bzw. DAPI und PI markierten Zellen aufwies (vgl. Abb. 4–19, Versuch S.c.2.1.1), lagen die Ct-Werte in den nachfolgenden Versuchen sowohl für die Kontrollproben als auch für die zuvor mit Fluorochromen markierten Proben an den einzelnen Versuchstagen (vgl. Abb. 4–19, Versuche S.c.2.2.X, S.c.2.3.X, S.c.4.3.X) etwa auf vergleichbarem Niveau (Tab. 9–9 (Anhang)). Im bis dato abschließenden Versuch (vgl. Abb. 4–19, S.c.4.3.X) wurde ein maximales Maß an Übereinstimmung zwischen den Ct-Werten der Kontrollproben und den mit Fluorochromen markierten Proben sowohl im Teilversuch mit Direktlyse als auch in einem Vergleichsversuch mit variiertem Standardisolation der DNA nachgewiesen.

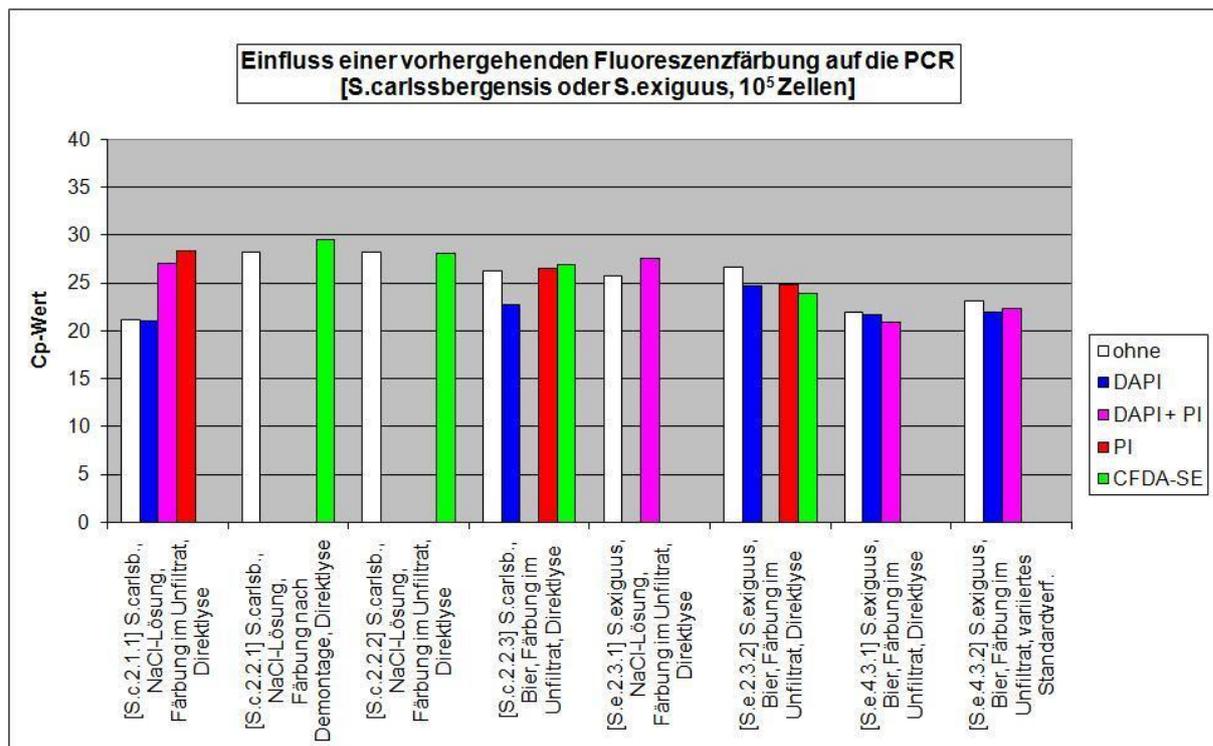


Abb. 4-19: Einfluss einer vorhergehenden Fluoreszenzmarkierung auf den PCR-Nachweis von Kultur- und Schadhefen

Die Versuche mit bierschädlichen Bakterien im Rahmen der Untersuchungen zum Einfluss einer vorhergehenden Fluoreszenzmarkierung von Mikroorganismen auf den Verlauf einer nachfolgenden Real-Time-PCR schlossen sich an die ersten Versuche mit Hefen zu dieser Thematik an. Entsprechend erfolgte zu diesem Zeitpunkt bereits eine optimierte und routinierte Versuchsdurchführung. Die Ct-Werte aus den Versuchen mit Bakterien zeigten ein weitgehend einheitliches Bild und eine sehr gute Reproduzierbarkeit. Unter Berücksichtigung der nicht sehr genauen Quantifizierung von PCR-Ergebnissen in Form von Ct-Werten wurden bis auf zwei Einzelergebnisse praktisch keine Unterschiede zwischen den Ct-Werten der ungefärbten Kontrollproben und den mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Proben nachgewiesen. In den genannten Einzelfällen lag der Ct-Wert der gefärbten Probe jeweils leicht oberhalb der Kontrollprobe (vgl. Abb. 4–20, Versuch L.b.3.3.1 (CFDA,SE), Versuch L.b.4.2.1 (DAPI + PI), Tab. 9–10 (Anhang)).

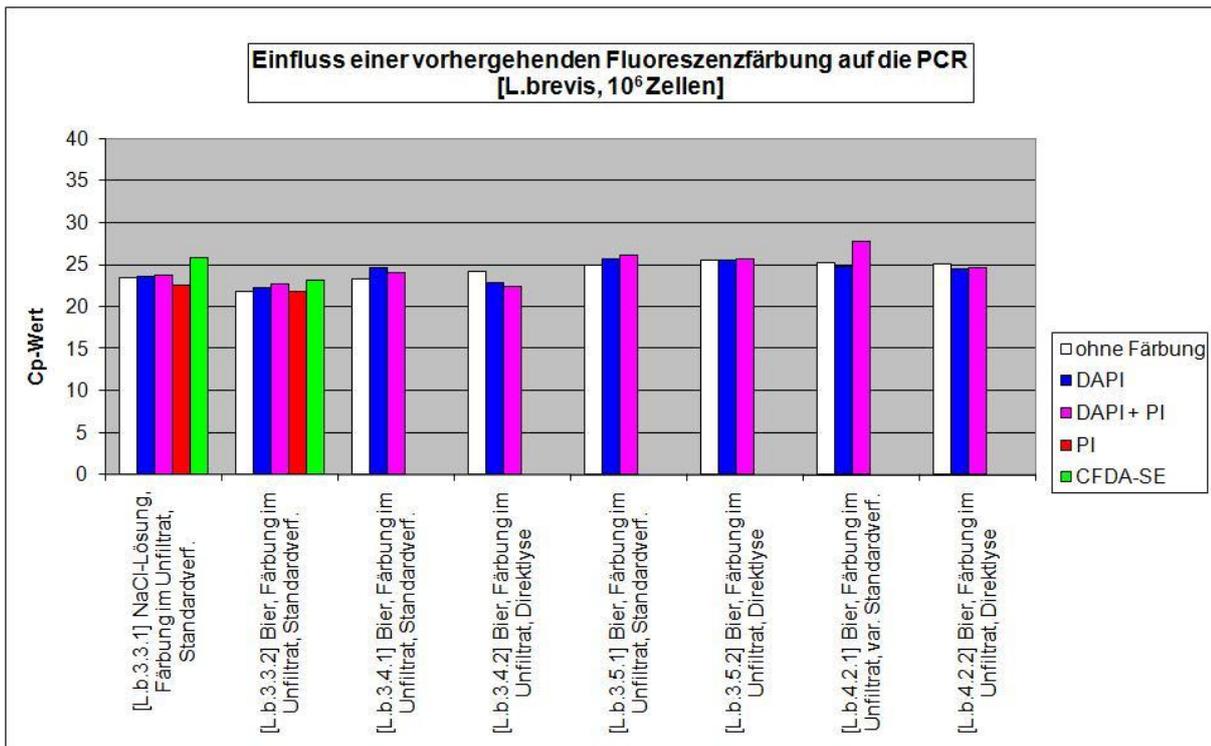


Abb. 4-20: Einfluss einer vorhergehenden Fluoreszenzmarkierung auf den PCR-Nachweis von bierschädlichen Bakterien

4.2.5 Validierung des kombinierten Einsatzes von Silizium-Membranfiltern und Real-Time-PCR durch Versuche in einer Großbrauerei

Parallel zu den Untersuchungen an der Technischen Universität München wurde im mikrobiologischen Betriebslabor einer deutschen Großbrauerei das Verfahren zum kombinierten Einsatz von Silizium-Membranfiltern und RTQ-PCR mit DNA-Isolierung durch Direktlyse validiert.

Es konnten Schadhefen (*Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*, *Dekkera bruxellensis* oder *Dekkera anomala*) bei Aufbringung von 10^3 KBE in 50 ml Probelösung (20 KBE/ml) eindeutig nachgewiesen werden. Auch für Keimbeaufschlagungen von *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* in Höhe von 50 KBE in 100 ml Probelösung (0,5 KBE/ml) und 20 KBE in 100 ml Probelösung (0,2 KBE/ml) wurden positive Befunde festgestellt. Dabei lagen die Messwerte für das Verfahren mit Direktlyse im Durchschnitt nahezu auf dem Niveau der jeweiligen Vergleichsprobe, bei der eine PCR-Analyse nach dem Standardverfahren mit gleicher Anzahl von Keimen aus der Mikroorganismen-Stammlösung durchgeführt wurde. Dabei ist zu berücksichtigen, dass beim Verfahren mit Silizium-

Membranfiltern und Direktlyse die Testorganismen aus einem 50- bzw. 100-fach größeren Volumen nachgewiesen wurden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass trotz der 50- bzw. 100-fachen Verdünnung der Testlösung und der anschließenden Wiederanreicherung durch Filtration über die Silizium-Membranfiltern nahezu alle Keime erfasst wurden und auch bei der anschließenden DNA-Isolierung durch Direktlyse kein nennenswerter Verlust an DNA auftrat.

Für die Versuche mit dem Testkeim *Lactobacillus brevis* wurden Testkeimlösungen mit 10^3 , 10^2 , 50 KBE in 50 ml Ringerlösung (20 KBE/ml, 2 KBE/ml, 1 KBE/ml) verwendet. Hier wurden beim Verfahren mit Direktlyse deutliche Verluste an DNA im Vergleich zum Standardverfahren festgestellt. In den PCR-Analysen wurden zwar sowohl mit dem First Beer Magnetic Kit der Firma GEN-IAL als auch mit dem Foodproof Beer Screening Kit der Firma BIOTECON Diagnostics für 10^3 und 10^2 KBE im Unfiltrat positive Befunde erzielt, die PCR-Signale fielen dabei aber nur schwach positiv aus. Bei einer weiteren Absenkung der Anzahl der eingebrachten Testkeime auf 50 KBE ergab sich dagegen in zwei Einzelversuchen kein positiver Befund. Diese Organismenanzahl liegt somit offensichtlich unterhalb der Nachweisgrenze des Verfahrens. Ob das schlechtere Ergebnis gegenüber dem Standardverfahren durch den Verlust von Zellmaterial bei der Filtration der Testorganismen-Suspensionen über die Silizium-Membranfilter verursacht wurde oder im Zuge der DNA-Isolierung auftraten, konnte noch nicht abschließend geklärt werden.

Die Ergebnisse aus den externen Untersuchungen zum Nachweis von bierschädlichen Mikroorganismen durch kombinierten Einsatz von Silizium-Membranfiltern und RTQ-PCR decken sich mit den Erkenntnissen aus den eigenen Analysen. Beim PCR-Nachweis von Hefen wurden Nachweisgrenzen in vergleichbarer Größenordnung (intern: 10 KBE/100 ml, extern: 20 KBE/100 ml) nachgewiesen. In den externen Versuchen mit dem Testorganismus *Lactobacillus brevis* wurde wie auch in eigenen Versuchen eine noch nicht zufriedenstellende Sensitivität des Verfahrens nachgewiesen, wobei die Ergebnisse in den externen Versuchen noch günstiger als in den eigenen Tests ausfielen. Dieses ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens im Betriebslabor durch eine bessere anlagentechnische Ausstattung und einen insgesamt besser angepassten Prozess höher lag.

Im Rahmen der Versuche in der Brauerei wurde stichprobenartig auch das Rückhaltevermögen der Silizium-Membranfilter getestet. Dabei wurde festgestellt, dass 10^3 KBE von *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* oder *D. bruxellensis* durch Silizium-Membranfilter mit einem mittleren Porendurchmesser von $2,0\ \mu\text{m}$ nicht vollständig zurückgehalten werden. Bei Anwendung von Silizium-Membranfiltern mit einem mittleren Porendurchmesser von $1,25\ \mu\text{m}$ wurden für 10^3 KBE von *Dekkera bruxellensis* im Filtrat keine Befunde festgestellt. Für Silizium-Membranfiltern mit einem mittleren Porendurchmesser von $0,52\ \mu\text{m}$ und den Testorganismus *Lactobacillus brevis* wurden im Filtrat ebenfalls keine Befunde festgestellt. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse aus den eigenen Versuchen zum Rückhaltevermögen von Silizium-Membranfiltern gegenüber bierrelevanten Mikroorganismen.

Abschließend bleibt als weiteres wichtiges Ergebnis der Versuche im Rahmen der Kooperation mit der Brauerei festzuhalten, dass das bis dato maximal realisierbare Probevolumen von 50 bis 100 ml noch nicht die Anforderung der Brauerei in Höhe von mindestens einem Liter Probevolumen erfüllt. Dass eine solche Forderung nicht auf einem universellen Wunsch nach einer subjektiven Verbesserung der Nachweissicherheit beruht, sondern aus statistischer Sicht obligatorisch ist, verdeutlicht die nachfolgende Betrachtung. In den Versuchen wurde eine Nachweisgrenze von 100 KBE ermittelt. Unter der Annahme, dass mindestens 1 KBE in 100 ml Probevolumen nachgewiesen werden können muss, um im Fall eines negativen Befundes von einer einwandfreien Produktqualität ausgehen zu können, ist es erforderlich, mindestens 10 l Probevolumen zu filtrieren. Für Keimkonzentrationen von 2 KBE/100 ml und 5 KBE/100 ml ergeben sich entsprechend Mindestvolumina von 5 l und 2 l, um unter Beachtung der Nachweisgrenze einen sicheren Nachweis führen zu können.

5 Diskussion

5.1 Rückhaltevermögen von Silizium-Membranfiltern

Die Ergebnisse aus den Versuchen zur Bestimmung des Rückhaltevermögens von Silizium-Membranfiltern gegenüber Hefen zeigten insgesamt ein stimmiges Gesamtbild. Im Vergleich zu konventionellen Filtern weisen die Silizium-Membranfiltern ein abweichendes Trennverhalten auf. Die überwiegend oberflächliche Abscheidung durch Siebwirkung, wie sie für die einheitliche geometrische Struktur der Filter zu erwarten ist, bedingt ein deutlich schärferes Trennverhalten, das sich durch Auswahl geringerer Porendurchmesser gezielt bis zur absoluten Trennwirkung forcieren lässt.

So wurden sämtliche Testkeime der Kulturhefe *Saccharomyces carlsbergensis* ((5-10) x (5-12) μm) bei Filtration über Filter mit einer mittleren Porengröße von 1,72 μm aus dem Unfiltrat abgeschieden. Hier wurde somit eine absolute Abtrennung realisiert und die Trenngrenze für den Organismus ermittelt. Diese wurde zuvor bereits bei der Porengröße 2,12 μm mit nur einem einzelnen positiven Befund in 10 Versuchen (mittlere Testkeimbeaufschlagung: $7,5 \times 10^6$ KBE) nahezu erreicht. Da *Saccharomyces cerevisiae* in der Literatur als Testkeim für die Festlegung der nominalen Porengrößen 0,80 μm und 1,20 μm beschrieben ist, und *Saccharomyces carlsbergensis* dieser Spezies hinsichtlich der Morphologie der Einzelzellen sehr ähnelt, wäre es somit der gängigen Praxis folgend angezeigt, die Silizium-Membranfilter aus der Charge mit einem Porendurchmesser von 1,72 μm mit einem nominalen Porendurchmesser von 0,80 μm oder 1,20 μm zu versehen [EBC 1999, CHERYAN 1998].

Für den Testkeim *Saccharomyces cerevisiae varians diastaticus* konnte bis dato noch keine Trenngrenze ermittelt werden. In Versuchen mit Filtern der mittleren Porengröße 1,72 μm wurden bei einer mittleren Gesamttestkeimbeaufschlagung von $7,6 \times 10^6$ KBE in einem Versuch wenige positive Befunde in der dritten bzw. vierten Verdünnungsstufe festgestellt. Offensichtlich befanden sich unter den Testkeimen von *Saccharomyces cerevisiae varians diastaticus* einzelne kleinere Zellen als in den Versuchen mit *Saccharomyces carlsbergensis*, so dass hier eine weitere geringfügige Reduzierung des mittleren Porendurchmessers erforderlich ist, um eine absolute Abtrennung zu realisieren und die Trenngrenze zu definieren. Die aus der

Darstellung der logarithmischen Rückhalteraten für den Testorganismus *Saccharomyces cerevisiae varians diastaticus* für die Porengrößen 2,17 µm und 2,20 µm ersichtliche verstärkte Keimpassage in den Verdünnungsstufen 3 und 4 (vgl. Abb. 4–3) dürfte durch die zunehmende Verblockung der Membranoberfläche im Zuge der fortschreitenden Testkeimbeaufschlagung und die resultierende Konzentrierung des Filtratflusses auf wenige noch freie Porenöffnungen mit größerem Durchmesser bedingt sein. Zusätzlich forciert werden dürfte dieser Vorgang durch die höheren und länger anliegenden transmembranen Drücke in der dritten und vor allem in der vierten Verdünnungsstufe (vgl. Abb. 3–6).

Die Ergebnisse für die kleinzelligen Hefen fügen sich in das Gesamtbild. Mit entsprechend kleineren Porengrößen wurde ebenfalls eine scharfe bzw. absolute Trennwirkung realisiert. Während für *Saccharomyces exiguus* ((2,5-5,0) x (3,0-6,5) µm) mit Filtern der mittleren Porengröße 1,15 µm bei nur einem einzelnen positiven Befund in 9 Versuchen (mittlere Testkeimbeaufschlagung: $4,6 \times 10^6$ KBE) eine absolute Abtrennung nur denkbar knapp verfehlt wurde, konnte für *Debaryomyces hansenii* (Durchmesser: 3 bis 7 µm) mit Filter der mittleren Porengröße 0,92 µm die Trenngrenze bestimmt werden. Bereits mit der Porengröße 1,15 µm war diese bei nur einem einzelnen positiven Befund in 12 Versuchen (mittlere Testkeimbeaufschlagung: $7,4 \times 10^6$ KBE) nahezu erreicht worden.

Für die sichere Abtrennung von Hefezellen durch Silizium-Membranfilter sind somit auf Basis der aktuellen Ergebnislage Silizium-Membranfilter mit einem mittleren Porendurchmesser von 0,92 µm geeignet. Die Ergebnisse aus den Versuchen zum Rückhaltevermögen der Silizium-Membranfilter bestätigen auch grundsätzlich, dass die Filter eine sehr scharfe Trenncharakteristik und eine absolute Trennwirkung aufweisen. So zeigt sich für Hefen in der graphischen Auswertung der Ergebnisse, dass für die Filter mit absoluter Trennwirkung und eine Zellkultur mit normalverteilten Zellgrößen die erwartet scharf einsetzende und exponentielle Zunahme der Keimpassage mit größer werdenden Porengrößen eintritt (vgl. Abb. 4–21).

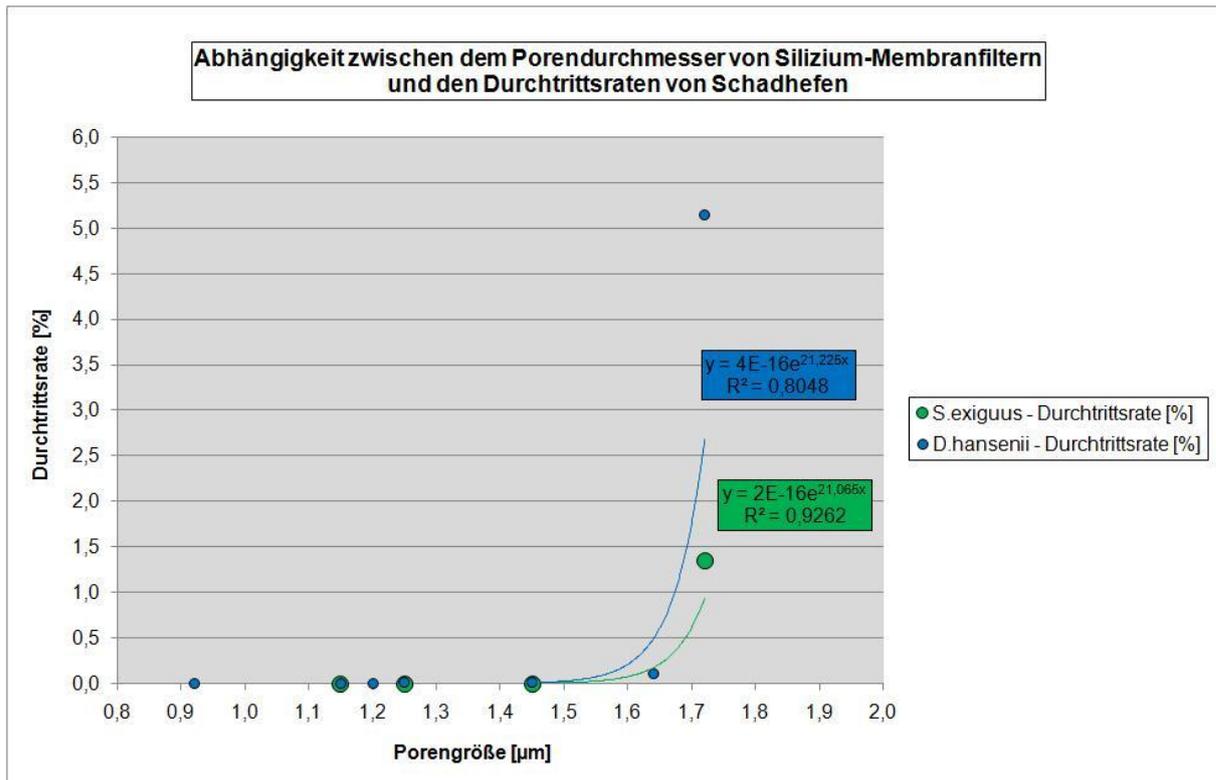


Abb. 5-1: Abhängigkeit zwischen dem Porendurchmesser von Silizium-Membranfiltern und den Durchtrittsraten von Schadhefen

Ebenfalls bedingt durch das scharfe Trennverhalten der Silizium-Membranfilter konnte im Versuchsbetrieb sogar wiederholt eine Abhängigkeit des Rückhaltevermögens vom Alter der eingesetzten Testorganismen aufgezeigt werden. So ergaben sich für jüngere Testorganismenkulturen schlechtere Rückhalteraten. Diese dürften dadurch bedingt sein, dass sich die jüngeren Kulturen noch nicht in einem statischen Zustand mit einheitlich großen Zellen befanden, sondern im Zuge der Vermehrungstätigkeit auch Zellen mit kleinerem Durchmesser vorlagen. Bei der statistischen Prüfung der Versuchsergebnisse mittels Ausreißertest wurde für die auffälligen Testkeim-Porengrößen-Kombinationen wiederholt in Abhängigkeit vom Alter der Testkeime eine geteilte Grundgesamtheit festgestellt. Die Korrelation konnte vor allem in Versuchen nachgewiesen werden, bei denen Filter mit einem für den Testkeim vergleichsweise großen Porendurchmesser eingesetzt wurden und sich entsprechend eine nennenswerte Keimpassage in das Filtrat ergab. So sind für *Saccharomyces carlsbergensis* bei der Porengröße 3,64 µm, für *Saccharomyces cerevisiae varians diastaticus* bei 2,20 µm und 2,12 µm, für *Saccharomyces exiguus*

bei 1,45 µm sowie für *Debaryomyces hansenii* bei 1,25 µm entsprechende Beobachtungen dokumentiert (vgl. Abb. 4–22).

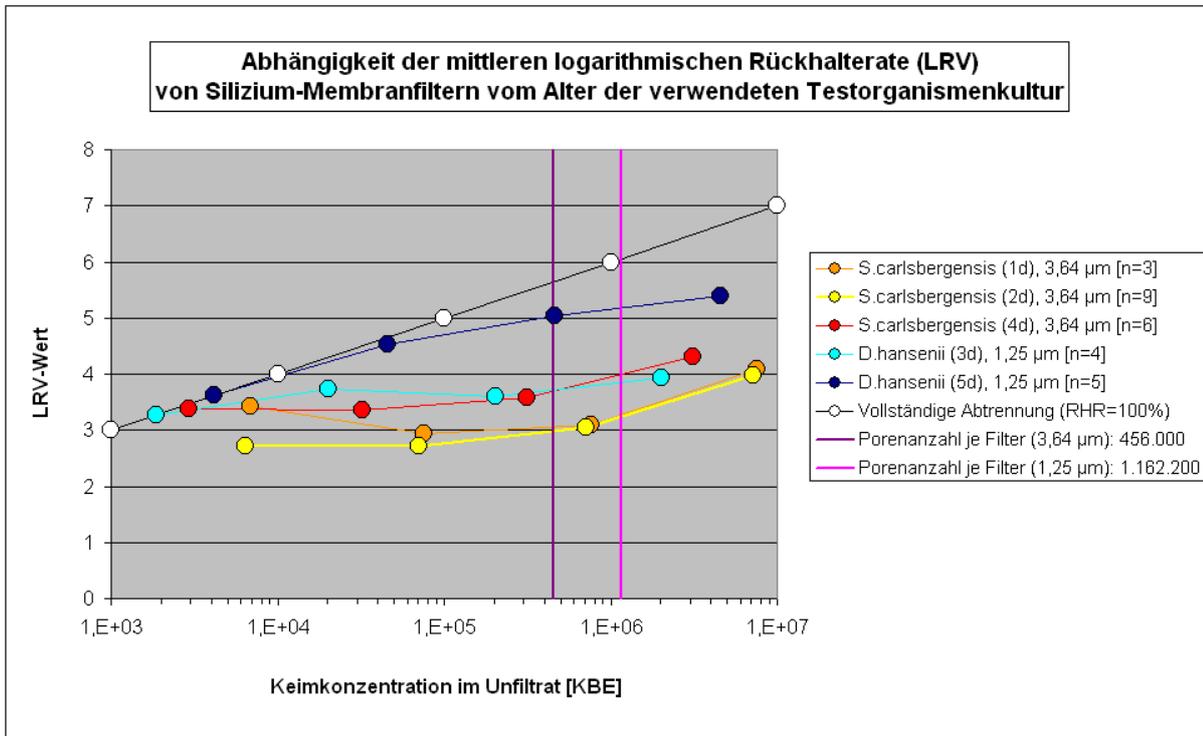


Abb. 5-2: Abhängigkeit der mittleren logarithmischen Rückhalterate (LRV) vom Alter der Testorganismen (ausgewählte Beispiele)

Eine weitere Bestätigung der absoluten und definierten Trennwirkung der Silizium-Membranfilter ergibt sich aus der Beobachtung, dass bei einer Keimbeaufschlagung bis maximal in Höhe der vorhandenen Porenanzahl die Trennwirkung der Filter durch die geometrischen Abmessungen (Porenstruktur) der Silizium-Membranfilter bestimmt wurde. Wurden jedoch mehr Keime aufgegeben als Poren vorhanden waren, wurden wiederholt Kennzeichen für die einsetzende Wirkung einer Kuchenfiltration infolge der Ausbildung einer filtrationswirksamen Deckschicht festgestellt. So zeigte sich eine deutliche Zunahme der LRVs in der dritten und vierten Verdünnungsstufe für die Porengröße 3,64 µm ($4,56 \times 10^5$ Poren) und den Testkeim *Saccharomyces carlsbergensis* sowie die Porengröße 1,72 µm ($1,16 \times 10^6$ Poren) und den Testkeim *Saccharomyces exiguus* (vgl. Abb. 4–22). Ähnliche Beobachtungen wurden beim Testorganismus *Debaryomyces hansenii* für

die Porengrößen 1,72 μm , 1,64 μm und 1,45 μm in der vierten Verdünnungsstufe gemacht (vgl. Abb. 4–5).

Das für Bakterien ermittelte Rückhaltevermögen der Silizium-Membranfilter bestätigt prinzipiell die Erkenntnisse aus den Versuchen mit Hefen, zeigt aber insgesamt noch kein zufriedenstellendes Bild. So wurde für den Testkeim *Pediococcus damnosus* (Kokken, Durchmesser 0,5 bis 1,0 μm) die zu erwartende kontinuierliche Steigerung des Rückhaltevermögens mit kleiner werdenden Porendurchmessern bis hin zur vollständigen Abtrennung der Testkeime durch Filter der Porengröße 0,50 μm nachgewiesen (vgl. Tab. 4–2, Abb. 4–6). Dabei wurden allerdings die geforderten Filtratvolumina (mindestens 80% des Unfiltratvolumens in der vierten Verdünnungsstufe) nicht erreicht, so dass hier insgesamt keine Ergebnisse für die vierte Verdünnungsstufe verfügbar sind und nicht die für die Rückhaltetests vorgesehene Keimbeaufschlagung mindestens in Höhe der Porenanzahl erreicht wurde.

Als Ursachen für die zu geringen erzielten Filtratvolumina bei den kleinsten Porengrößen sind zwei Erklärungsansätze naheliegend. Wie in Kapitel 3.1.1 ausgeführt bestehen Unsicherheiten hinsichtlich der Maßhaltigkeit der Silizium-Membranfilter. Dies betrifft zum einen größere Poren, die für das Rückhaltevermögen relevant sind (s.u.), andererseits ist die beschriebene Problematik von abweichenden Porendurchmessern auch hinsichtlich verkleinerter Poren zu berücksichtigen. Entsprechend der aufgezeigten Abhängigkeit von Porendurchmesser und erforderlichem transmembranen Druck nach Cantor ist für Porendurchmesser $< 1,0 \mu\text{m}$ eine exponentielle Zunahme des erforderlichen Drucks zur Benetzung der Porenstruktur zu erwarten. Entsprechend ist es möglich, dass in den Versuchen für Teile der Porenstruktur schlicht nicht der erforderliche transmembrane Druck erreicht wurde, um einen Volumenstrom durch die Poren herbeizuführen und die Poren filtrationswirksam werden zu lassen.

Gleichzeitig könnte eine weitere Ursache für die aufgetretenen Probleme in der Kombination aus Zellmorphologie und regelmäßigen Filterstruktur der Silizium-Membranfiltern liegen. So lag in den Versuchen mit *Pediococcus damnosus* der Abstand zwischen benachbarten Poren mit 2,0 μm (Mitte-Mitte) deutlich über dem für die kugelförmigen Zellen zu erwartenden Durchmesser von 0,5-1,0 μm . Damit besitzt *Pediococcus damnosus* bei statischer Filtration (Dead-End-Filtration) ein hohes

Potential zur irreversiblen Verblockung von Einzelporen durch Verstopfen mit Einzelzellen (vgl. Abb. 4–23, oben links). Dieser Effekt kam in den Versuchen mit Hefen nicht zum Tragen, da der Abstand zwischen benachbarten Poren mit $3,5\ \mu\text{m}$ (Mitte-Mitte) zumindest anteilig unterhalb des Durchmessers der als Testkeime eingesetzten Schadhefen lag (*S.exiguus*, $2,5$ bis $5,0\ \mu\text{m}$), so dass hier eine oberflächliche Abscheidung von Testkeimen unter Freibleiben von Poren zu erwarten ist (vgl. Abb. 4–23, unten). Auch für *Lactobacillus brevis* ist im Vergleich zu *Pediococcus damnosus* ein anderes Verblockungsverhalten zu erwarten, da es wegen seiner Stäbchenform weit weniger häufig zu einem vollständigen Verschluss einzelner Poren kommen dürfte (vgl. Abb. 4–23, oben rechts).

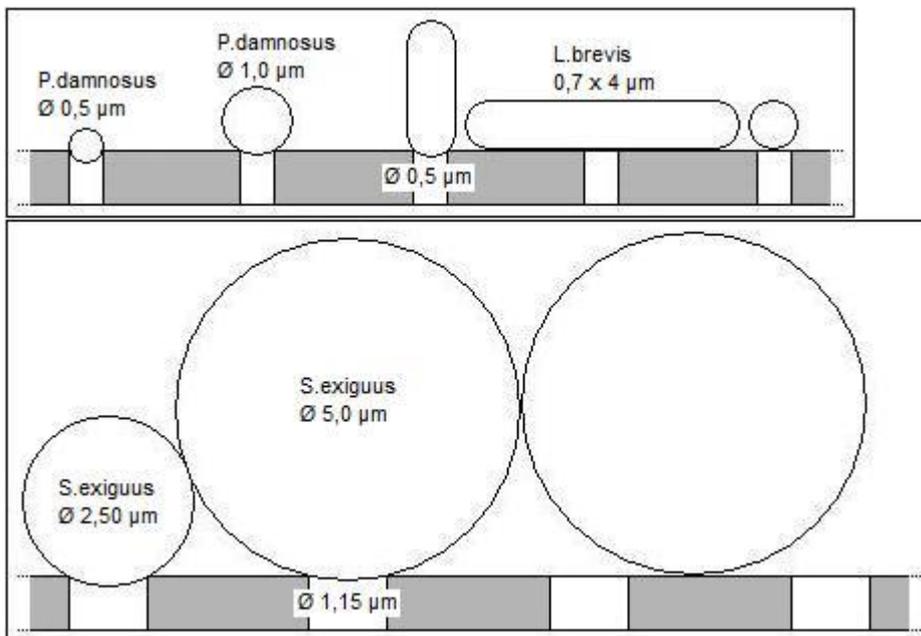


Abb. 5-3: Einfluss von Zell-Morphologie und geometrischer Struktur der Silizium-Membranfilter auf Durchsatzraten und Filtratvolumina

Ähnliche Probleme traten in den Versuchen mit dem Testkeim *Lactobacillus brevis* (Stäbchen, durchschnittlich $0,7 \times 4\ \mu\text{m}$) und Membranfiltern mit einer mittleren Porengröße von $0,5005\ \mu\text{m}$ auf. Auch hier wurden in der vierten Verdünnungsstufe wiederholt zu geringe Filtratvolumina erzielt, so dass die entsprechenden Versuche nicht in der Auswertung berücksichtigt wurden. Hier erscheint vor dem Hintergrund der Zellmorphologie (vgl. Abb. 4-23, oben rechts.) aber weniger von einer irreversiblen Verblockung einzelner Poren ursächlich zu sein, als eine Nicht-Benetzung von Teilen der Porenstruktur. Für *Lactobacillus brevis* konnten mit keiner

der eingesetzten Filtergrößen (0,4985 µm, 0,5005 µm, 0,52 µm, 0,54 µm) eine vollständige Testkeimabscheidung realisiert werden. Die günstigsten Rückhalteraten wurden für Filter mit einem mittleren Porendurchmesser von 0,5005 µm erzielt (Ø Testkeime: $4,94 \times 10^5$ KBE, Ø Rückhalterate: 99,99877499%).

Überraschend zeigten die drei übrigen Porengrößen bei ansteigender Testkeimbeaufschlagung sogar eine deutlich nachlassende Trennwirkung (vgl. Abb. 4–7). Offensichtlich kommt es hier zur Ausbildung eines quasi-stationären Zustandes, in dem ein gleichbleibender Anteil der zugeführten Keime die Filtermembran durchdringt. Ursache könnte hier die Passage der kleinsten in der Zellkultur enthaltenen Testkeime durch die größten Öffnungen in der Porenmembran sein (vgl. Kap. 3.1.1). Dieser Effekt würde verstärkt durch das Vorkommen von Porenöffnungen außerhalb der ursprünglichen Herstellerspezifikationen (+/- 10% vom mittleren Porendurchmesser), die vor dem Hintergrund der gewonnenen Erkenntnisse zu den Struktureigenschaften (vgl. Kap. 3.1.1) und zur chemischen Beständigkeit (vgl. Kap. 3.1.2) der im Rahmen der Arbeit eingesetzten Silizium-Membranfilter fraglich sind. Folglich stehen die Ergebnisse aus den Untersuchungen zum Rückhaltevermögen von Silizium-Membranfiltern gegenüber bierschädlichen Bakterien insgesamt unter dem Vorbehalt der beschriebenen Unsicherheiten. Anders als in den Versuchen mit Hefen, die mit größeren mittleren Porendurchmessern ($> 0,92$ µm) durchgeführt wurden, sind die nachgewiesenen Mängel hinsichtlich der Maßhaltigkeit (Membranöffnungen mit Durchmessern von ≥ 1 µm) bei der Bewertung der Ergebnisse aus den Versuchen mit Bakterien zu berücksichtigen, da hier Filter mit Porengrößen zwischen 0,50 und 0,92 µm eingesetzt wurden, so dass infolge der Mängel eine Beeinflussung der Trennwirkung erwartet werden muss und diese eine naheliegende Erklärung für das noch nicht ausreichende Rückhaltevermögen der Filter gegenüber Bakterien sind.

Eine Anwendung der Silizium-Membranfilter in der Praxis der biologischen Betriebsüberwachung der Brau- und Getränkeindustrie für Trennprozesse zur Isolierung bzw. Konzentrierung von Mikroorganismen, insbesondere jedoch von Bakterien ist vor diesem Hintergrund noch nicht angeraten. Eine geeignete Porengröße zur sicheren Abtrennung von bierschädlichen Bakterien konnte auf Basis der aktuellen Ergebnislage im Rahmen dieser Arbeit noch nicht festgelegt werden.

5.2 Optimierung mikrobiologischer Schnellnachweisverfahren durch kombinierten Einsatz von Silizium-Membranfiltern

In den Untersuchungen zur Vergleichbarkeit des Standardverfahrens nach Herstellerprotokoll zum Nachweis von Hefen mittels PCR und dem neuen Verfahren mit Direktlyse nach Isolierung der Keime auf Silizium-Membranfiltern ergaben sich vergleichbare Ct-Werte. Bei der Bewertung der Ergebnisse ist zu Gunsten des neuen Verfahrens mit Filtration über Silizium-Membranfilter zusätzlich zu berücksichtigen, dass hier die Keime aus 100 ml Probelösung isoliert wurden, beim Standardverfahren dagegen die gleiche Anzahl an Keimen aus 1 ml Probelösung. Da für den Nachweis der Testkeime aus dem 100-fachen Volumen vergleichbare Ct-Werte ermittelt wurden, ist das Verfahren mit kombiniertem Einsatz von Silizium-Membranfiltern und Real-Time-PCR als qualitativ deutlich hochwertiger einzustufen, wobei sich sogar die grundsätzliche Frage stellt, mit welchem alternativen Verfahren generell ein Nachweis in der ermittelten Qualität hätte geführt werden können? Die Nachweisgrenze für Hefen aus isotonischer Kochsalzlösung und aus Bier lag reproduzierbar bei 10^1 KBE sowohl nach dem Standardverfahren gemäß Herstellerprotokoll aus 1 ml Probelösung als auch nach dem neuen Verfahren mit Filtration über Silizium-Membranfilter und nachfolgende Direktlyse aus 100 ml Probelösung. Dabei zeigte sich bei guter Reproduzierbarkeit wiederum kein signifikanter Unterschied zwischen den Ct-Werten für das Standardverfahren und die Direktlyse.

In den bisher durchgeführten Untersuchungen mit Bakterien lagen die Ct-Werte für die Direktlyse der mit Silizium-Membranfiltern aus einer Probe isolierten Mikroorganismen leicht oberhalb der Ergebnisse aus den Analysen nach Standardverfahren. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass bei der Direktlyse nach Filtration die Mikroorganismen aus 20 ml Unfiltratlösung im Vergleich zu 1 ml Unfiltratlösung beim Standardverfahren nachgewiesen wurden. Dies dürfte in der Praxis den Nachteil des etwas höheren Ct-Wertes kompensieren und steigert den Wert der Ergebnisse aus der Direktlyse in den übrigen Versuchen, bei denen die Ct-Werte auf vergleichbarem Niveau gelegen hatten.

Grundsätzlich ist für die Anwendung von Silizium-Membranfiltern ein leichter Verlust an Zellmaterial im Zuge des Isolierungsverfahrens durch eine unvollständige Lyse

der Mikroorganismen auf der Oberfläche der Filter oder den Verlust an DNA im Verlauf der Probenaufbereitung denkbar. Dies bestätigen auch vergleichbare Erkenntnisse aus den Versuchen bei einer Großbrauerei (vgl. Kap. 4.2.5). Hier könnte also noch ein prinzipielles Problem für das Direktlyse-Verfahren zur DNA-Isolierung aus den auf den Silizium-Membranfiltern zurückgehaltenen Zellen bestehen, das es ggf. durch eine weitere Optimierung des DNA-Isolierungsprozess zu beheben gilt.

Weiterer Optimierungsbedarf besteht auch hinsichtlich der Nachweisgrenzen für bierschädliche Bakterien. Sowohl für isotonische Kochsalzlösung als auch für Bier konnte mit den drei Isolierungsverfahren (Standardverfahren, variiertes Standardverfahren, Direktlyse) noch kein reproduzierbarer Nachweis für Organismenzahlen $< 10^4$ KBE geführt werden. Nur in einem einzelnen Versuch wurden mit dem Standardverfahren nach Herstellervorschrift (GEN-IAL) 10^2 und 10^3 KBE nachgewiesen (vgl. Tab. 9–9 (Anhang)). Damit konnte die Herstellerangabe, die eine Nachweisgrenze von 10^2 KBE für das eingesetzte PCR-Kit nennt, in den Versuchen nicht bestätigt werden. Dieses spricht dafür, dass die Anpassung des PCR-Verfahrens an PCR-Kit und iCycler IQ noch nicht in optimaler Weise erfolgt ist. Nach aktuellem Kenntnisstand ist noch kein Zusammenhang zwischen der zu hohen Nachweisgrenze für *Lactobacillus brevis* und der Anwendung von Silizium-Membranfiltern mit anschließender Direktlyse erkennbar.

Bei der Prüfung eines möglichen Einflusses einer vorherigen Fluoreszenz-Markierung von Zellen auf einen nachfolgenden PCR-Nachweis wurde für die unterschiedlichen Probemedien isotonische Kochsalzlösung und Bier in Kombination mit den unterschiedlichen Verfahren zur DNA-Isolierung mittels Direktlyse auf den Silizium-Membranfiltern oder nach Standardverfahren gemäß Herstellerprotokoll kein signifikanter Unterschied der Ct-Werte festgestellt. Sowohl in den Versuchen mit Hefen als auch in jenen mit Bakterien zeigte sich nach einer vorhergehenden Fluoreszenzmarkierung der Mikroorganismen mit den Farbstoffen CFDA,SE, DAPI und PI kein negativer Einfluss auf den Verlauf der nachfolgenden Real-Time-PCR, in die die DNA aus den zuvor angefärbten Zellen als Template-DNA eingesetzt wurde. Es ist anzunehmen, dass das im Cytoplasma gebundene CF,SE (CFDA,SE) im Zuge der DNA-Isolierung zusammen mit den anderen Zellbestandteilen abgetrennt wird. Zudem dürfte die Menge der mit den Mikroorganismen in die DNA-Isolierung

eingebrachten Farbstoffe im Vergleich zu dem bei der Real-Time-PCR im Überschuss vorliegenden SYBR-Green so vernachlässigbar gering sein, dass sie im Gesamtergebnis insbesondere durch die exponentielle Zunahme der DNA im Zuge der PCR nicht mehr zur Geltung kommen. Diese Erklärung trifft somit auch für DAPI und PI zu, die zudem in einem anderen Wellenlängenbereich (DAPI: 461 nm; PI: 617 nm) als das grüne SYBR-Green (520 nm) ihre Fluoreszenz emittieren und auch aus diesem Grund offensichtlich keine erkennbare Beeinträchtigung des PCR-Nachweises hervorrufen.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass eine Konzentrierung von bierschädlichen Mikroorganismen durch Silizium-Membranfilter und deren anschließender unmittelbarer Nachweis durch „Fluoreszenzmarkierung“ und „RTQ-PCR“ grundsätzlich realisiert werden kann. Für den Nachweis von Hefen wurden hier sehr günstige Ergebnisse erzielt, für den Nachweis von bierschädlichen Bakterien besteht dagegen noch deutlicher Optimierungsbedarf. Auch für den kombinierten Einsatz von Fluoreszenzmarkierung als schnelles Screening und PCR-Nachweises zur Absicherung des Ergebnisses bzw. zur Identifizierung von Keimen wurde die Machbarkeit nachgewiesen.

6 Zusammenfassung

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit lag in der Optimierung bestehender mikrobiologischer Schnellnachweisverfahren für bierschädliche Mikroorganismen durch deren kombinierten Einsatz mit Silizium-Membranfiltern. Die Fluoreszenzmarkierung und die quantitative Real-Time-PCR (RTQ-PCR) sind Verfahren, die sich bereits in der betrieblichen Praxis der biologischen Betriebsüberwachung der Brau- und Getränkeindustrie für das routinemäßige mikrobiologische Monitoring etablieren konnten. Mit beiden Methoden kann zwar prinzipiell ein Nachweis von Mikroorganismen innerhalb von 3 Stunden geführt werden, in der betrieblichen Praxis ist allerdings üblicherweise eine kulturelle Voranreicherung von 24 bis 48 Stunden erforderlich, um zu validen Ergebnissen zu kommen. Dies liegt begründet in den für die Methoden bestehenden Nachweisgrenzen in Kombination mit den in der Brau- und Getränkeindustrie üblicherweise allenfalls auftretenden Spurenkontaminationen. Damit entfernen sich die genannten Methoden in der Praxis wieder deutlicher von einer quasi Online-Analytik, wie sie von der Industrie als Ideallösung für die Steuerung der mikrobiologischen Produktqualität angestrebt wird. Um hier das grundsätzlich vorhandene Potential als „Schnellnachweismethoden“ voll ausschöpfen zu können, müsste folglich der Prozessschritt einer Voranreicherung entfallen.

Als Lösungsansatz für diese Problemstellung wurde in der vorliegenden Arbeit eine Isolierung und Konzentrierung von Keimen aus dem Probenmaterial durch Silizium-Membranfilter verfolgt. Im Anschluss sollte der eigentliche mikrobiologische Nachweis mittels Fluoreszenzmarkierung und/oder RTQ-PCR erfolgen. Der Fluoreszenzmarkierung kommen dabei die Funktionen eines schnellen Screenings und optional einer Lebend-Tot-Differenzierung zu, mit der RTQ-PCR ist bei hoher Nachweissicherheit auch ein spezifischer Nachweis von Schadkeimen möglich.

Bei der Methodenentwicklung lag der erste Schwerpunkt auf der Auswahl von Silizium-Membranfiltern mit geeigneten Trenneigenschaften für die Isolierung und Konzentrierung von relevanten Mikroorganismen. Dazu wurde das Rückhaltevermögen der Filter gegenüber ausgewählten Keimen untersucht. Für alle untersuchten Hefen und das bierschädliche Bakterium *Pediococcus damnosus* konnten Filter bzw. Porengrößen mit absoluter Trennwirkung bestimmt werden. Für

das ebenfalls bierschädliche Bakterium *Lactobacillus brevis* konnte dagegen noch keine Trenngrenze bestimmt werden. Anhand der gewonnenen Erkenntnisse wurden geeignete Porengrößen für die weiterführenden Versuche zur Optimierung von mikrobiologischen Schnellnachweisverfahren ausgewählt.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde das eigentliche Ziel einer Optimierung von bestehenden mikrobiologischen Schnellnachweisverfahren (Fluoreszenzmarkierung, RTQ-PCR) durch kombinierten Einsatz mit Silizium-Membranfiltern bearbeitet. Dabei wurden geeignete Prozeduren für die kombinierte Anwendung entwickelt und auf ihre Eignung hin geprüft. Durch den kombinierten Einsatz von Silizium-Membranfiltern und Fluoreszenzmarkierung war es bereits möglich, in weniger als einer Stunde Hefen und bierschädliche Bakterien nachzuweisen, zu quantifizieren und ggf. auch nach lebenden und toten Zellen zu differenzieren, obwohl zugleich noch weiteres Optimierungspotential hinsichtlich der Qualität der Markierung von Schadkeimen besteht. Auch für die kombinierte Anwendung von Silizium-Membranfiltern und RTQ-PCR wurde die prinzipielle Machbarkeit für den Nachweis von Hefen und bierschädlichen Bakterien nachgewiesen, wobei hier für den Nachweis von Bakterien noch keine zufriedenstellende Sensitivität erzielt wurde. Hier ist eine weitere Herabsetzung der Nachweisgrenzen für das Verfahren erforderlich, um eine für die betriebliche Praxis geeignete Methodik zu realisieren. Zuletzt wurde auch der kombinierte Einsatz von Silizium-Membranfiltern für die Isolierung und Konzentrierung von Schadkeimen mit einer Fluoreszenzmarkierung für ein schnelles Screening und anschließender RTQ-PCR für die Identifizierung von Schadkeimen getestet. Dabei wurde keine nachteilige Beeinflussung der RTQ-PCR durch eine vorhergehende Fluoreszenzmarkierung festgestellt, so dass mit diesem Ansatz auch eine Option für eine diversifizierte Systematik zum Schnellnachweis von Schadkeimen in der Brau- und Getränkeindustrie bereitsteht.

Die Ergebnisse für das Rückhaltevermögen und den kombinierten Einsatz von Silizium-Membranfiltern und RTQ-PCR wurden durch erste begleitende Versuche im mikrobiologischen Betriebslabor einer deutschen Großbrauerei bestätigt.

Auf Basis der gewonnenen Erkenntnissen lässt sich somit abschließend festhalten, dass durch den Einsatz von Silizium-Membranfiltern prinzipiell eine Optimierung der etablierten mikrobiologischen Schnellnachweisverfahren Fluoreszenzmarkierung

und/oder „RTQ-PCR“ in Richtung hin zu einer quasi mikrobiologischen Online-Analytik für die Brau- und Getränkeindustrie möglich ist. Auf dem Weg zu einer möglichen Praxis-Anwendung sind allerdings neben einer weiteren Optimierung der eigentlichen Nachweis-Prozeduren auch noch Problemstellungen hinsichtlich der Probenaufbereitung durch die Filtration über die Silizium-Membranfilter (Durchsatzmengen, Verblockungsproblematik) und auch hinsichtlich der Materialeigenschaften der Filter selbst (Maßhaltigkeit, Integrität) zu lösen.

7 Abstract

The main purpose of the present thesis was the optimization of existing microbiological rapid tests for beer spoiling microorganisms by combined use with silicon membrane filters. The fluorescence marking and the real-time quantitative PCR (RTQ-PCR) are methods, which have already been established in practice for the regular microbiological monitoring in the quality management of brewing and beverage industry. Although it is possible in principle to furnish evidence of microorganisms within 3 hours with these methods, the currently employed practice usually needs a pre-enrichment of 24 to 48 hours to reach valid results. The reasons for this are on the one hand the existing detection limits for the methods and on the other hand the low concentrations of microorganisms, as in generally only trace contaminations are customary in the brewing and beverage industry. Because of this the aforementioned methods differ substantially in practice to an online analysis, which is requested by the industry as the ideal solution for the control of the microbiological product quality. In order to fully use the potential as a rapid test method the step of pre-enrichment currently used in the process has to be eliminated.

To find a solution for this problem this thesis examined the isolation and concentration of germs from sample material through silicon membrane filters. Following that the actual microbiological detection was to be carried out through fluorescence marking and/or RTQ-PCR. The fluorescence marking shall fulfill the function of a quick screening and optionally a differentiation of living and dead cells, with the RTQ-PCR it is possible to get optionally also a specific detection of germs combined with a high level of method's reliability.

During the development of the methods the first focus was put on the selection of silicon membrane filters with suitable separation characteristics for the isolation and concentration of relevant microorganisms. For this purpose the retention capacity of the filters versus selected germs was analyzed. The analysis specified the absolute cut-off-point of filters and pore-sizes for all tested yeasts and the beer spoiling bacteria *Pediococcus damnosus*. However it was not possible yet to determine a specific cut-off point for the beer spoiling bacterium *Lactobacillus brevis*. With those

results it was possible to determine suitable pore sizes for further testing to optimize the microbiological rapid tests.

The second part of this thesis examines the original objective to optimize existing microbiological rapid tests (fluorescence marking, RTQ-PCR) by combined use with silicon membrane filters. Therefore, suitable processes were developed and tested. By means of the combined use of silicon filters and fluorescence marking it was already possible to detect yeasts and beer spoiling bacteria in less than one hour and to quantify and to differentiate between living and dead cells where necessary, although there is more optimizing potential regarding the quality of the marking of spoiling germs. The general feasibility for the detection of yeasts and beer spoiling bacteria by the combined application of silicon membrane filters and RTQ-PCR was also shown, whereas the detection of bacteria didn't result in a satisfactory sensitivity yet. For this special case it is necessary to lower the method's detection limits to realize a process suitable for the regular practice. At last the combined use of silicon membrane filters for the isolation and concentration of germs was tested together with fluorescence marking for a rapid screening and a subsequent RTQ-PCR for the identification of germs. At that no negative influence of a previous fluorescence marking on the following RTQ-PCR could be detected, so that with this attempt also an option for a diverse system of rapid testing for spoiling germs in beverage and brewing industry is offered.

The results for the retention rates and the combined use of silicon membrane filters and RTQ-PCR were confirmed already with first accompanying tests in the microbiological factory laboratory of an important German brewery.

Based on the gathered results it can be concluded that with the use of silicon membrane filters it is possible in general to optimize existing microbiological rapid tests fluorescence marking and RTQ-PCR for future use as an online-analysis in beverage and brewing industry. Regarding a probable use in practice several problems - besides a further optimization of the original detection methods - have to be solved, like the sample processing by filtration through the silicon membrane filters (flow rates, membrane blocking) and also the material characteristics of the filters itself (dimensional accuracy, integrity).

8 Literaturverzeichnis

- AMMON, S., LÖTGENBÖRGER, H.-J., TRETZEL, J., 2004: Schnell, sicher, selektiv – Aspekte der modernen mikrobiologischen Qualitätssicherung im Getränkebetrieb. Brauwelt, Nr. 12, S. 333-335.
- ATTFIELD, P.V., KLETSAS, S., VEAL, D.A., VAN ROOIJEN, R., BELL, P.J.L., 2000: Use of flow cytometry to monitor cell damage and predict fermentation activity of dried yeasts. Journal of Applied Microbiology, Vol. 89, S. 207-214.
- BACK, W., 1994a: Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie – Teil 1. Verlag Hans Carl, Nürnberg.
- BACK, W., 1994b: Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie – Teil 2. Verlag Hans Carl, Nürnberg.
- BACK, W., 1994c: Technologische Voraussetzungen für die „kaltseptische“ Abfüllung von Bier. Brauwelt, Nr. 39, S. 1936-1942.
- BACK, W., 1995: Technische und technologische Voraussetzungen zur „kaltsterilen“ Abfüllung. Brauwelt, Nr. 42, S. 2068-2076.
- BACK, W., PÖSCHL, P., 1998: Bypass-Membranfiltration (BM-System) - Verbesserung des Spurennachweises nach der Filtration. Brauwelt, Nr. 46/47, S. 2312-2315.
- BALTES, W., KROH, L.W., 2004: Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihren Rohstoffen. 3. Auflage. B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg.
- BARNEY, M., KOT, E., 1992: A Comparison of Rapid Microbiological Methods for Detecting Beer Spoilage Microorganisms. MBAA Technical Quarterly, Vol. 29, S. 91-95.
- BARTLETT, J.M.S., STIRLING, D., 2003: PCR Protocols. 2. Auflage. Humana Press Inc., Totowa, Vereinigte Staaten von Amerika.
- BAST, E., 2001: Mikrobiologische Methoden – Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- BEIMFOHR, C., THELEN, K., 2002: Nahezu On-Line – Neue Schnelltests zum Nachweis von Bierschädlingen. Brauindustrie, N. 11, S. 50-53.
- BIANCHI, M.A., DEL RIO, D., PELLEGRINI, N., SANSEBASTIANO, G., NEVIANI, E., BRIGHENTI, F., 2004: A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells. Letters of Applied Microbiology, Vol. 39, S. 301-305.
- BIRD, M.R., FRYER, P.J., 1992: An Analytical model for the cleaning of Food process plant. In: Food Engineering in a Computer Climate. IChemE Symposium Series No. 126, S. 325-330.
- BISCHOFF, E., 2001: Schnelldachweis von bierschädlichen Bakterien mit PCR. Dissertation. Technische Universität München.
- BRANDL, A., TENGE, C., GEIGER, E., 2003: Lebend-Tot-Differenzierung von bierschädlichen Bakterien mittels Real-Time PCR. Brauwelt, Nr. 49, S. 1690-1692.

- BRANDL, A., GEIGER, E., 2004: Abfüllung und Qualitätssicherung – Mikrobiologische Sicherheit bei Getränken. Brauwelt, Nr. 29, S. 788-792.
- BRANDL, A., 2006: Entwicklung und Optimierung von PCR-Methoden zur Detektion und Identifizierung von brauereirelevanten Mikroorganismen zur Routine-Anwendung in Brauereien. Dissertation, Technische Universität München.
- BRACEY, D., HOLYOAK, C.D., NEBE VON CARON, G., COOTE, P.J., 1998: Determination of the intracellular pH (pHi) of growing cells of *Saccharomyces cerevisiae* – the effect of reduced-expression of the membrane H⁺-ATPase. Journal of Microbiological Methods, Vol. 31, S. 113-125.
- BRANS, G., VAN DER SMAN, R.G.M., SCHRÖEN, C.G.P.H., VAN DER PADT, A., BOOM, R.M., 2006: Optimization of the membrane and pore design for micro-machined membranes. Journal of Membrane Science, Vol. 278, S. 239-250.
- BRANTLEY, J. D., ARANHA, H., 1994: Comparison of the Retention of Different Beer Spoilage Organisms by Membrane Filters. MBAA Technical Quarterly, Vol. 31. S. 121-123.
- BRANTLEY, J.D., 2005: Beer Filtration – Membrane Morphology and Fluid Dynamics. MBAA Technical Quarterly, Vol. 42, Nr. 4, S. 342-345.
- BRETTSCHEIDER, M., 2002: PCR-Methode mittels GEN-IAL First-Beer Magnetic Kit. Brauwelt, Nr. 30, S. 1051.
- BRETTSCHEIDER, M., 2003: Direkter Nachweis von Bierschädlingen. Brauwelt, Nr. 24/25, S. 761-762.
- BRIDGE, P.D., ARORA, D.K., REDDY, C.A., ELANDER, R.P., 1998: Applications of PCR in Mycology. CAB International, CAB International, Wallingford, Großbritannien.
- BÜCHL, N.R., 2009: Identifizierung von Hefen durch Fourier-transform Infrarotspektroskopie und künstliche neuronale Netze. Dissertation, Technische Universität München.
- BÜTTGENBACH, S., 1994: Mikromechanik: Einführung in Technologie und Anwendungen. 2. Auflage. B.G. Teubner, Stuttgart.
- BURKE, J.F., 1996: PCR – Essential Techniques. John Wiley & Sons, Chichester, Großbritannien.
- BUSCH, U., 2010: Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik: Grundlegende Methoden und Anwendungen. 1. Auflage. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- CHERYAN, M., 1998: Ultrafiltration and Microfiltration Handbook. CRC Press LLC, Boca Raton, USA.
- COLEMAN, A.W., MAGUIRE, M.J., 1982: A Microspectrofluorometric Analysis of Nuclear and Chloroplast DNA in *Volvox*. Developmental Biology, Vol. 94, S. 441-450.
- COLEMAN, A.W., MAGUIRE, M.J., COLEMAN, J.R., 1981: Mithramycin- and 4'-6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)-DNA Staining for Fluorescence Microspectrophotometric Measurement of DNA in Nuclei, Plastids, and Virus Particles. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Vol. 29, Nr. 8, S. 959-968.

- DELLINGER, W., GEZE, M., 2001: Detection of mitochondrial DNA in living animal cells with fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, Vol. 204, Nr. 3, S. 196-202.
- DENNIGER, H., SCHNIEDER, G., BOCK, M., 2003: Membranfiltration von Bier. *Brauwelt*, Nr. 45, S. 1512-1516.
- DIN – DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E.V., 2005: DIN 58355-2, Membranfilter – Teil 2: Prüfung des Blasendrucks. Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- DIN – DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E.V., 1990: DIN 58355-3, Membranfilter – Teil 3: Bakterienrückhaltevermögen für Flachfilter – Prüfung des Blasendrucks. Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- DOLEZEL, J., 1991: Flow Cytometric Analysis of Nuclear DNA Content in Higher Plants. *Phytochemical Analysis*, Vol. 2, S. 143-154.
- DOLEZEL, J., SGORBATI, S., LUCRETTI, S., 1992: Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum*, Vol. 85, S. 625-631.
- DRIOLI, E.; CRISCUOLI, A.; CURCIO, E., 2006: Membrane Science and Technology Series, 11: Membrane Contactors: Fundamentals, Applications and Properties. Elsevier B.V., Amsterdam, Niederlande.
- DUCA, J.G., 1999: Latest Practices of CIP Operations in the Brewery. *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 36, Nr. 4, S. 407-411.
- EBC – EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 1999: Beer Filtration, Stabilisation and Sterilisation – Manual of Good Practice. European Brewery Convention and Fachverlag Hans Carl, Nürnberg.
- EDWARDS, K., LOGAN, J., SAUNDERS, N., 2004: Real-Time PCR – An Essential Guide. Horizon Bioscience Wymondham, Großbritannien.
- EGGERS, G., NITZSCHE, F., 2001: Gefragt ist Schnelligkeit und Sicherheit – Mikrobiologische Filtrationskontrolle. *Brauindustrie*, Nr. , S. 34-35.
- FILLAUDEAU, L., 1999: Cross-flow microfiltration in the brewing industry – an overview of uses and applications. *Brewers' Guardian*, Nr. 7, S. 22-30.
- FILLAUDEAU, L., CARRÈRE, H., 2002: Yeast Cells, beer composition and mean pore diameter impacts on fouling and retention during cross-flow filtration of beer with ceramic membranes. *Journal of Membrane Science*, Vol. 196, S. 39-57.
- FULLER, M.E., MAILLOUX, B.J., ZHANG, P., STREGER, S.H., HALL, J.A., VAINBERG, S.N., BEAVIS, A.J., JOHNSON, W.P., ONSTOTT, T.C., DE FLAUN, M.F., 2001: Field-scale evaluation of CFDA/SE staining coupled with multiple detection methods for assessing the transport of bacteria in situ. *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 37, S. 55-66.
- GADELLE, D., FORTERRE, P., 1994: DNA intercalating drugs inhibit positive supercoiling induced by novobiocin in halophilic archaea. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 123, S. 161-166.
- GAN, Q., FIELD, R.W., BIRD, M.R., ENGLAND, R., HOWELL, J.A., MC KECHNIE, M.T., O'SHAUGHNESSY, C.L., 1997: Beer Clarification by Microfiltration: Fouling Mechanisms and Flux Enhancement. *Trans IChemE*, Vol. 75, Part A, S. 3-8.

- GAN, Q., HOWELL, J.A., FIELD, R.W., ENGLAND, R., BIRD, M.R., O'SHAUGHNESSY, C.L., MC KECHNIE, M.T., 1999: Synergetic cleaning procedur for a ceramic membrane fouled by beer microfiltration. *Journal of Membrane Science*, Vol. 155, S. 277-289.
- GAN, Q., HOWELL, J.A., FIELD, R.W., ENGLAND, R., BIRD, M.R., O'SHAUGHNESSY, C.L., MC KECHNIE, M.T., 2001: Beer clarification by microfiltration – product quality control and fractionation of particles and macromolecules. *Journal of Membrane Science*, Vol. 194, S. 185-196.
- GAUB, R., 1993a: Kriterien der Fein- und Entkeimungsfiltration und ihre Bewertung. *Brauwelt*, Nr. 1/2, S. 20-26.
- GAUB, R., 1993b: Kriterien der Fein- und Entkeimungsfiltration von Bier. *Brauwelt*, Nr. 20, S. 863-872.
- GEIGER, E., WAGNER, D., HEBMÜLLER, F., 1997: Ist die saure Einphasen-Reinigung praxistauglich? *Brauwelt*, Nr. 38, S. 1694-1698.
- GERLACH, G., DÖTZEL, W., 2006: Einführung in die Mikrosystemtechnik. Fachbuchverlag Leipzig im Carl Hanser Verlag, München/Wien.
- GIRONES, M., BORNEMANN, Z., LAMMERTINK, R.G.H., WESSLING, M., 2005: The role of wetting on the water flux performance of microsieve membranes. *Journal of Membrane Science*, Vol. 259, S. 55-64.
- GIRONES, M., LAMMERTINK, R.G.H., WESSLING, M., 2006: Protein aggregate deposition and fouling reduction strategies with high-flux silicon nitride microsieves. *Journal of Membrane Science*, Vol. 273, S. 68-76.
- GRAZIANO, M., ST.PIERRE, Y., BEAUCHEMIN, C., DESROSIERS, M., POTWOROWSKI, E.F., 1998: The Fate of Thymocytes Labeled in Vivo with CFSE. *Experimental Cell Research*, Vol. 240, S. 75-85.
- GREENWOOD, N.N., EARNSHAW, A., 1988: Chemie der Elemente. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- HADAMOVSKY, H.-F., 1990: Werkstoffe der Halbleitertechnik. 2. Auflage. VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig.
- HANSSON, Y., JACOBSON, E., ORTLUND, J., PAULIE, S., PERLMANN, P., 1987: A rapid method for detection of cellular proliferation using carboxyfluorescein. *Journal of Immunological Methods*, Vol. 100, S. 261-267.
- HARTMANN, K., 2006: Bedeutung rohstoffbedingter Inhaltsstoffe und produktionstechnologischer Einflüsse auf die Trübungsproblematik im Bier. Dissertation. Technische Universität München.
- HASBOLD, J., GETT, A.V., RUSH, J.S., DEENICK, E., AVERY, D., JUN, J., HODGKIN, P.D., 1999: Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunology and Cell Biology*, Vol. 77, S. 516-522.
- HAUGLAND, R.P., 1992: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. 5. Auflage. Molecular Probes Inc.
- HAUGLAND, R.P., 2008: The Handbook – A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. 10. Auflage. Invitrogen Detection Technologies.

- HEUBERGER, A., 1991: Mikromechanik – Mikrofertigung mit Methoden der Halbleitertechnologie. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- HIMA – Health Industry Manufacturers Association, 1982: Document No. 3, Vol. 4. Washington, DC, USA.
- HINRICHS, J., STAHL, U., 1995: Grundlagen und Wirkungsmechanismus der Reinigung und Desinfektion. Brauwelt, Nr. 38/39, S. 1939-1943.
- HOEFEL, D., GROOBY, W.L., MONIS, P.T., ANDREWS, S., SAINT, C.P., 2003a: A comparative study of carboxyfluorescein diacetat and carboxyfluorescein diacetat succinimidyl ester as indicators of bacterial activity. Journal of Microbiological Methods, Vol. 52, S. 379-388.
- HOEFEL, D., GROOBY, W.L., MONIS, P.T., ANDREWS, S., SAINT, C.P., 2003b: Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry – a comparison to culture-based techniques. Journal of Microbiological Methods, Vol. 55, S. 585-597.
- HOEFEL, D., MONIS, P.T., GROOBY, W.L., ANDREWS, S., SAINT, C.P., 2005: Profiling bacterial survival through a water treatment process and subsequent distribution system. Journal of Applied Microbiology, Vol. 99, S. 175-186.
- HOMANN, F., BREMER, Z., MÖLLER-HERGT, G., 2002: Etablierung der LightCyclerTM-PCR als Schnellnachweismethode – Bierschädliche Bakterien in der mikrobiologischen Routineanalytik. Brauwelt, Nr. 23/24, S. 798-804.
- HOMANN, F., 2002: Neue Nachweismethoden in der Praxis. Brauwelt, Nr. 30, S. 1051.
- HUHTAMELLA, S., LEINONEN, M., NIEMINEN, T., FAHNERT, B., MYLLYKOSKI, L., BREITENSTEIN, A., NEUNAUER, P., 2007: RNA-based sandwich hybridisation method for detection of lactic acid bacteria in brewery samples. Journal of Microbiological Methods, Vol. 68, S. 543-553.
- HUTTER, K.-J., 1992: Schnellbestimmung zur Lebend-tot-Analyse von Hefezellen. Brauwelt, N. 7/8, S. 252-259.
- HUTTER, K.-J., 2000: Fluoreszenzoptische Schnellmethoden in der Getränkemikrobiologie – Anspruch und Wahrheit. Brauwelt, Nr. 5, S. 177-180.
- HUTTER, K.-J., LAPPAS, S., KIEHNE, M., KEMENJI, D., NITZSCHE, F., 2003: Kombiniertes Schnellverfahren mit der Mikrosiebfiltration und PCR-Analyse zur direkten Detektion von bierschädlichen Mikroorganismen. Monatsschrift für Brauwissenschaft, Nr. 11/12, S. 198-205.
- HUTZLER, M., 2009: Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von getränkerelevanten Hefen. Dissertation, Technische Universität München.
- HUTZLER, M., SCHUSTER, E., STETTNER, G., 2008: Ein Werkzeug der Brauereimikrobiologie – Real-time PCR in der Praxis. Brauindustrie, Nr. 4, S. 52-55.
- JÄHRIG, A., SCHADE, W., 1993: Mikrobiologie der Gärungs- und Getränkeindustrie – Eine Einführung. 1. Auflage. CENA-Verlag, Meckenheim.
- JAKOBS, E., KOROS, W.J., 1997: Ceramic membrane characterization via the bubble point technique. Journal of Membrane Science, Nr. 124, S. 149-159.

- JUVONEN, R., SATOKARI, R., MALLISON, K., HAIKARA, A., 1999: Detection of spoilage bacteria in beer by Polymerase Chain Reaction. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Vol. 57(3), S. 99-103.
- JUVONEN, R., KOIVULA, T., HAIKARA, A., 2003: PCR detection of gram-negative brewery contaminants – present state. *Proceedings of the 29th EBC Congress*. S. 1046-1056.
- KAMMHUBER, K., 2008: Die antimikrobiellen und bakterio-statischen Eigenschaften der Hopfenbitterstoffe, *Tagungsband Internationales Hopfensymposium „Hopfenanbau 2020“*, S. 78-81.
- KÖHLER, M., 1998: *Ätzverfahren für die Mikrotechnik*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- KÖTKE, H., 2003: *Grundlegende Untersuchungen zur Eignung von Membranfiltern aus Silizium für Anwendungen in der Brauerei*. Technische Universität München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Semesterarbeit.
- KOHLWEIN, S.D., 2000: The Beauty of the Yeast – Live Cell Microscopy at the Limits of Optical Resolution. *Microscopy Research and Technique*, Vol. 51, S. 511-529.
- KRETSCH, J., 1994: Practical Considerations for Brewery Sanitation. *MBAA Technical Quarterly*, Nr. 31, S. 124-128.
- KÜMMERLE, M., SCHERER, S., SEILER, H., 1998: Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 64, S. 2207-2214.
- KUIPER, S., BRINK, R., NIJDAM, W., KRIJNEN, G.J.M., ELWENSPOEK, M.C., 2002a: Ceramic microsieves – Influence of perforation shape and distribution on flow resistance and membrane strength. *Journal of Membrane Science*, Vol. 196, S. 149-157.
- KUIPER, S., VAN RIJN, C.J.M., NIJDAM, W., ELWENSPOEK, M.C., 1998: Development and applications of very high flux microfiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, Vol. 150, S. 1-8.
- KUIPER, S., VAN RIJN, C., NIJDAM, W., RASPE, O., VAN WOLFEREN, H., KRIJNEN, G., ELWENSPOEK, M., 2002b: Filtration of lager beer with microsieves: flux, permeate haze and in-line microscope observations. *Journal of Membrane Science*, Vol. 196, S. 159-170.
- LECEUR, H., FEVRIER, M., GARCIA, S., RIVIERE, Y., GOUGEON, M.-L., 2001: A novel flow cytometric assay for quantification and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, Vol. 253, S. 177-187.
- LEONEL, M., BLAMPAIN, P., TAYLOUR, J., 1994: Rational Design of a Cleaning Procedure for Microfiltration Membranes. *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 31, S. 134-137.
- LI, X., DANCAUSSE, H., GRIJALVA, I., OLIVEIRA, M., LEVI, A.D.O., 2003: Labeling Schwann cells with CFSE – an in vitro and in vivo study. *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 125, S. 83-91.
- LOCH-AHRING, S., 2002: Detektion bierschädlicher Mikroorganismen mit dem PCR-Verfahren. *Brauwelt*, Nr. 39/40, S.1356-1357.

- LÖGTENBÖRGER, H.-J., ELTER, J., 2003: Nährmedien der mikrobiologischen Qualitätskontrolle – Eine aktuelle Übersicht. *Brauwelt*, Nr. 31/32, S. 1016-1017.
- LUCKERT, K., 2004: *Handbuch der mechanischen Fest-Flüssig-Trennung*. Vulkan-Verlag GmbH, Essen.
- LYKO, H., 2005: 10. Aachener Membran Kolloquium: Innovative Prozesse in der Lebensmittelindustrie und Biotechnologie. Membranen aus Siliziumwafern. *F & S Filtrieren und Separieren*, Vol. 2, S. 80-84.
- LYONS, A.B., 1999: Divided we stand: Tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunology and Cell Biology*, Vol. 77, 509-515.
- LYONS, A.B., 2000: Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal of Immunological Methods*, Vol. 243, S. 147-154
- MAURER, J., 2006: *PCR Methods in Food*. Springer Science + Business Media Inc., New York, Vereinigte Staaten von Amerika.
- MEIER, P.M., JANSSEN, G.P., BLAZKA, S., HEDGE, R., 1995: Investigation of Plugging Colloids on Microporous Membrane Filters. *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 32, S. 25-34.
- MENZ, W., MOHR, J., PAUL, O., 2005: *Mikrosystemtechnik für Ingenieure*. 3. Auflage. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. S. 255-259.
- MESCHEDER, U., 2004: *Mikrosystemtechnik – Konzepte und Anwendungen*. 2. Auflage. B. G. Teubner / GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden. S. 33-35.
- METHNER, F.-J., SCHUSTER, E., SCHACKMANN, A., 2004: Screening of beer-spoilage bacteria using the LightCycler PCR Workflow System. *Biochemica*, Nr. 1, S. 9-11.
- MOCK, K., 2001: Biofilme in der Brauerei – Praxisergebnisse mit der PCR-Technologie. *Brauwelt-Online*, S. 1-3.
- MOSS, S.J., LEDWITH, A., 1987: *The Chemistry of the Semiconductor Industry*. Blackie & Son Limited, London, Großbritannien.
- MOTHE, A.J., TATOR, C.H., 2005: Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in the adult rat. *Neuroscience*, Vol. 131, S. 177-187.
- MÜCHER, G., SCHÖNLING, J., 2000: PCR-Nachweis von Bierschädlingen mit dem First-Beer-Kit. *Brauwelt*, Nr. 39/40, S. 1570-1572.
- MÜLHARDT, C., 2000: *Der Experimentator – Molekularbiologie*. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- MÜLLER, H.-J., 2001: *PCR – Polymerase-Kettenreaktion – Das Methodenbuch*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- NAKAJIMA, K., NONAKA, K., YAMAMOTO, K., YAMAGUCHI, N., TANI, K., NASU, M., 2005: Rapid monitoring of microbial contamination on herbal medicines by fluorescent staining methods. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 40, S. 128-132.
- NELSON, W.H., 1985: *Instrumental methods for rapid microbiological analysis*. VCH Publishers Inc., Vereinigte Staaten von Amerika.

- NEUMÜLLER, O.-A., 1987: Römpps Chemie-Lexikon, Band 5. 8.Auflage. Franckh'sche Verlagshandlung, W. Keller & Co., Stuttgart. S. 3851-3852.
- NEWTON, C.R., 1995: PCR – Essential Data. John Wiles & Sons, Chichester, Großbritannien.
- NEWTON, C.R., GRAHAM, A., 1994: PCR. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, Großbritannien.
- NITZSCHE, F., 2002: Alternative Schnellverfahren in der Praxis. Brauwelt, N. 39/40, S. 1356.
- NITZSCHE, F., EGGERS, G., 2001: Hygiene Monitoring in Brauereien – Das mikrobiologische Labor als Dienstleister. Brauwelt, N. 12/13, S. 454-457.
- OHLROGGE, K., EBERT, K., 2006: Membranen. Grundlagen, Verfahren und industrielle Anwendungen. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- PAROLIN, C., MONTECUCCO, A., CIARROCCHI, G., PEDRALI-NOY, G., VALISENA, S., PALUMBO, M., PALU, G., 1990: The effect of the minor groove binding agent DAPI (2-amidino-diphenyl-indole) on DNA-directed enzymes: an attempt to explain inhibition of plasmid expression in Escherichia coli. FEMS Microbiology Letters, Vol. 68, S. 341-346.
- PMI – POROUS MATERIALS INC., 1998: Advances in Pore Size Characterization: New Techniques for largest Pore Size and Pore Shape Determination. Filtration & Separation, April 1998, S. 254.
- QIAN, J., CUTLER, J.E., COLE, R.B., CAI, Y., 2008: MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 392, S. 439-449.
- QUEROL, A., FLEET, G., 2006: Yeasts in Food and Beverages (Yeast Handbook). Springer-Verlag, Berlin.
- REISCHL, U., WITTEWER, C., COCKERILL, F., 2002: Rapid Cycle Real-Time PCR – Methods and Applications – Microbiology and Food Analyses. Springer-Verlag, Berlin.
- RIPPERGER, S., 1992: Mikrofiltration mit Membranen. Grundlagen, Verfahren, Anwendungen. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- SACHS, L., 1997: Angewandte Statistik – Anwendungen statistischer Methoden. 8. Auflage. Springer-Verlag, Berlin.
- SCHMIDT, H.-J., 1993: Moderne Keimidentifizierung im Betriebslabor. Brauwelt, Nr. 4, S. 142-145.
- SCHMIDT, H.-J., 1994a: Das mikrobiologische Brauereilabor – Grundarbeitsweisen - Schluss. Brauwelt, Nr. 18, S. 840-842
- SCHMIDT, H.-J., 1994b: Mikrobiologische Qualitätsüberwachung in der Brauerei. Brauwelt, Nr. 44, S. 2342-2344.
- SCHMIDT, H.-J., 1994c: Mikrobiologische Qualitätssicherung in der Brauerei – Probenauswertung. Brauwelt, Nr. 48, S. 2592-2594.
- SCHMIDT, H.-J., 1995a: Reinigung und Desinfektion in der Brauerei. Brauwelt, Nr. 28/29. S. 1404-1406.

- SCHMIDT, H.-J., 1995b: Reinigung und Desinfektion in der Brauerei. Brauwelt, Nr. 36, 1796-1798.
- SCHOKNECHT, M., 2009: Eignung der ATP-Messung für den Sterilitätsnachweis in der Fruchtsaftindustrie. Diplomarbeit, Hochschule Neubrandenburg.
- SCHWARZ, C., SCHNEEBERGER, M., KREISZ, S., SCHNELLER, T., 2005: Verbrauchsanalyse des Crossflow-Membranfilters BMF-200. Brauwelt, Nr. 34-35, S. 1107-1110.
- SCHWISTER, K., 2005: Taschenbuch der Chemie. 3. Auflage. Fachbuchverlag Leipzig im Carl Hanser Verlag, München/Wien.
- SHIMAKITA, T., YAMAMOTO, H., NARAMURA, T., FUJIMORI, A., DIE, T., TASHIRO, Y., SAITO, M., MATSUOKA, H., 2007: Rapid Count of Microbial Cells in Dialysate. Therapeutic Apheresis and Dialysis, Vol. 11, Nr. 5, S. 363-369.
- SNYDER, J., GAUB, R., 2005: Profi Process for Diatomaceous Earth Replacement. MBAA Technical Quarterly, Vol. 42, Nr. 1, S. 65-69.
- SPECTOR, D.L., GOLDMAN, R.D., 2005: Basic Methods in Microscopy. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Vereinigte Staaten von Amerika.
- STAUDE, E., 1992: Membranen und Membranprozesse. Grundlagen und Anwendungen. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- STRACHOTTA, T., 2003: Mikrobiologische Qualitätssicherung im Brauereibetrieb. Brauwelt, Nr. 31/32, S. 1020-1022.
- STRACHOTTA, T., 2004: Wichtige Aspekte der mikrobiologischen Probenahme. Brauwelt, Nr. 32, S. 973-984.
- SWANNELL, R.P.J., WILLIAMSON, F.A., 1988: An investigation of staining methods to determine total cell numbers and the number of respiring microorganisms in samples obtained from field and the laboratory. FEMS Microbiology Ecology, Vol. 53, S. 315-324.
- TEVFIK DORAK, M., 2006: Real-time PCR. Taylor & Francis Group, New York, Vereinigte Staaten von Amerika.
- THELEN, K., BEIMFOHR, C., BOHAK, I., 2001: Spezifischer Schnellnachweis von bierschädlichen Bakterien mittels fluoreszenzmarkierter Gensonden. Brauwelt, Nr. 38, S. 1596-1603.
- TIMMINS, E. M., QUAIN, D. E., GOODACRE, R., 1998: Differentiation of brewing yeast strains by pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. Yeast, Vol. 14, S. 885-93.
- UECKERT, J.E., NEBE VON CARON, G., BOS, A.P., TER STEEG, P.F., 1997: Flow cytometric analysis of Lactobacillus plantarum to monitor lag times, cell division and injury. Letters of Applied Microbiology, Vol. 25, S. 295-299.
- VAN HOOF, S.C.J.M., NOORDMAN, T., BERGHUIS, O., MOL, M., PEET, C., BROENS, L., 2000: Membrane Filtration for Bright Beer, an Alternative to Kieselguhr. MBAA Technical Quarterly, Vol. 37, Nr. 2, S. 273-276.
- VAN RIJN, C.J.M., 2004: Membrane Science and Technology Series, 10: Nano and Micro Engineered Membrane Technology. Elsevier B.V., Amsterdam, Niederlande.

VOIGT, R., DE WIT, B., 2007: Kopparbergs Bryggeri AB mit neuer Filtrationslinie. Brauwelt, Nr. 50, S. 1454-1457.

VÖLKLEIN, F., ZETTERER, T., 2000: Einführung in die Mikrosystemtechnik. Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig.

VOETZ, M., 2002: Schnellmethoden in der Betriebskontrolle. Brauwelt, Nr. 34/35, S. 1205.

WANG, X.-Q., DUAN, X.-M., LIU, L.-H., FANG, Y.-Q., TAN, Y., 2005: Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester Fluorescent Dye for Cell Labeling. Acta Biochemica et Biophysica Sinica, Vol. 37, Nr. 6, S. 379-385.

WENNING, M. 2004: Identifizierung von Mikroorganismen durch Fouriertransformierte Infrarot (FTIR)-Mikrospektroskopie. Dissertation. Technische Universität München.

WESTON, S.A., PARISH, C.R., 1990: New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Journal of Immunological Methods, Vol. 133, S. 87-97.

9 Anhang

Tab. 9-1: Rückhalteraten – *Saccharomyces carlsbergensis*

Testorganismus: <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	St-Filter (0,64 µm) (n=18)	St-Filter (2,20 µm) (n=4)	St-Filter (2,12 µm) (n=10)	St-Filter (1,72 µm) (n=10)	Verseuche
Charge	8,36	8,31	8,44	8,02	
minimaler Poren-Ø [µm]	3,62		2,08	1,67	
mittlerer Poren-Ø [µm]	3,64	2,20	2,12	1,72	
maximaler Poren-Ø [µm]	3,67		2,16	1,78	
	Rückhalterate [%]	Rückhalterate [%]	Rückhalterate [%]	Rückhalterate [%]	
Ø Verdünnungsstufe A	99,86756425	99,97151384	100,00000000	100,00000000	10
Ø Verdünnungsstufe B	99,84505034	99,99920960	100,00000000	100,00000000	10
Ø Verdünnungsstufe C	99,92899666	99,99986322	99,99986688	100,00000000	10
Ø Verdünnungsstufe D	99,89128225	100,00000000	100,00000000	100,00000000	10
Ø Verdünnungsstufe A-D	99,90649838	99,99267067	99,99996672	100,00000000	
	RHR-STABW	RHR-STABW	RHR-STABW	RHR-STABW	
Ø Verdünnungsstufe A	0,14116021	0,05687233	0,00000000	0,00000000	10
Ø Verdünnungsstufe B	0,14515665	0,00015880	0,00000000	0,00000000	10
Ø Verdünnungsstufe C	0,03969265	0,00007354	0,00004150	0,00000000	10
Ø Verdünnungsstufe D	0,00412753	0,00000000	0,00000000	0,00000000	10
Ø Verdünnungsstufe A-D	0,08253426	0,01465867	0,00001037	0,00000000	
	KBE im Unfiltrat [n]	KBE im Unfiltrat [n]	KBE im Unfiltrat [n]	KBE im Unfiltrat [n]	
Ø Verdünnungsstufe A	5366	4794	6773	5408	10
Ø Verdünnungsstufe B	58828	51591	74436	59740	10
Ø Verdünnungsstufe C	582226	533363	749767	602036	10
Ø Verdünnungsstufe D	5882216	5268063	748525	5957803	10
	KBE im Filtrat [n]	KBE im Filtrat [n]	KBE im Filtrat [n]	KBE im Filtrat [n]	
Ø Verdünnungsstufe A	8,6	1,8	0,0	0,0	10
Ø Verdünnungsstufe B	115,3	0,5	0,0	0,0	10
Ø Verdünnungsstufe C	472,6	0,3	0,1	0,0	10
Ø Verdünnungsstufe D	526,8	0,0	0,0	0,0	10
	LRV	LRV	LRV	LRV	
Ø Verdünnungsstufe A	3,0578	3,4595	3,8174	3,7325	10
Ø Verdünnungsstufe B	2,9686	4,6062	4,8563	4,7758	10
Ø Verdünnungsstufe C	3,2354	5,6958	5,8622	5,7791	10
Ø Verdünnungsstufe D	4,1046	6,6917	6,8599	6,7746	10
	LRV-STABW	LRV-STABW	LRV-STABW	LRV-STABW	
Ø Verdünnungsstufe A	0,40639022	0,37464290	0,12082959	0,02229515	10
Ø Verdünnungsstufe B	0,38510333	0,19368025	0,12105605	0,02213984	10
Ø Verdünnungsstufe C	0,29279699	0,20366188	0,11755317	0,0225278	10
Ø Verdünnungsstufe D	0,20618694	0,19867238	0,12464410	0,02148830	10
Ø Verdünnungsstufe A-D	0,32261937	0,24270935	0,12102073	0,02204402	

Tab. 9-2: Rückhalteraten – *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*

Testorganismus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>	Si-Filter (2,20 µm) (n=8)		Si-Filter (2,17 µm) (n=4)		Si-Filter (2,12 µm) (n=22)		Si-Filter (1,72 µm) (n=13)	
	Versuche [n]		Versuche [n]		Versuche [n]		Versuche [n]	
Charge	8,31		8,22		8,44		8,02	
minimale Poren-Ø [µm]		3,164			2,068			
mittlere Poren-Ø [µm]	2,20	2,167			2,120		1,72	
maximale Poren-Ø [µm]		2,175			2,180			
	Rückhalterate [%]		Rückhalterate [%]		Rückhalterate [%]		Rückhalterate [%]	
Ø Verdünnungsstufe A	100,00000000		100,00000000		99,99999991		100,00000000	
Ø Verdünnungsstufe B	99,99999477		99,99999453		99,99999991		100,00000000	
Ø Verdünnungsstufe C	99,99999689		99,99997866		99,99997883		99,99997207	
Ø Verdünnungsstufe D	99,99997452		99,99960315		99,99969046		99,99969303	
Ø Verdünnungsstufe A-D	99,99992650		99,99957719		99,99999226		99,99999127	
	RHR - STABW		RHR - STABW		RHR - STABW		RHR - STABW	
Ø Verdünnungsstufe A	0,00000000		0,00000000		0,00000000		0,00000000	
Ø Verdünnungsstufe B	0,00029752		0,00131025		0,00000000		0,00000000	
Ø Verdünnungsstufe C	0,00016953		0,00092779		0,00006966		0,00006818	
Ø Verdünnungsstufe D	0,00003448		0,00036311		0,00002738		0,00001393	
Ø Verdünnungsstufe A-D	0,00012541		0,00065029		0,00002426		0,00002053	
	Ø KBE im Unfiltrat [n]		Ø KBE im Unfiltrat [n]		Ø KBE im Unfiltrat [n]		Ø KBE im Unfiltrat [n]	
Ø Verdünnungsstufe A	6341		3864		6262		6863	
Ø Verdünnungsstufe B	70132		42828		67183		74889	
Ø Verdünnungsstufe C	713821		433250		697842		764777	
Ø Verdünnungsstufe D	7038412		4282158		6948673		7633142	
	Ø KBE im Filtrat [n]		Ø KBE im Filtrat [n]		Ø KBE im Filtrat [n]		Ø KBE im Filtrat [n]	
Ø Verdünnungsstufe A	0,0		0,0		0,0		0,0	
Ø Verdünnungsstufe B	0,1		0,3		0,0		0,0	
Ø Verdünnungsstufe C	1,5		3,5		0,1		0,2	
Ø Verdünnungsstufe D	2,8		8,0		0,5		0,4	
	LRV		LRV		LRV		LRV	
Ø Verdünnungsstufe A	3,7555		3,5854		3,7585		3,8114	
Ø Verdünnungsstufe B	4,7964		4,6313		4,7910		4,8491	
Ø Verdünnungsstufe C	5,6530		5,2096		5,7352		5,6895	
Ø Verdünnungsstufe D	6,5037		6,2821		6,7456		6,6115	
	LRV - STABW		LRV - STABW		LRV - STABW		LRV - STABW	
Ø Verdünnungsstufe A	0,21068017		0,04370179		0,19157001		0,14871883	
Ø Verdünnungsstufe B	0,21238724		0,02469936		0,18557765		0,14914112	
Ø Verdünnungsstufe C	0,14207922		0,40679774		0,18178966		0,14849276	
Ø Verdünnungsstufe D	0,24162149		0,75475799		0,26762995		0,21548891	
Ø Verdünnungsstufe A-D	0,20168703		0,30745672		0,20689037		0,16546041	

Tab. 9-3: Rückhalteraten – *Saccharomyces exiguus*

Testorganismus: <i>Saccharomyces exiguus</i>	St-Filter (1,72 µm) (n=6)		St-Filter (1,45 µm) (n=5)		St-Filter (1,25 µm) (n=22)		St-Filter (1,15 µm) (n=9)	
	Versuche	[%]	Versuche	[%]	Versuche	[%]	Versuche	[%]
Charge	8,02		8,16		8,32		8,54	
minimaler Poren-Ø [µm]	1,657		1,452				1,112	
mittlerer Poren-Ø [µm]	1,716		1,448		1,25		1,149	
maximaler Poren-Ø [µm]	1,781		1,457				1,170	
	Rückhalterate [%]		Rückhalterate [%]		Rückhalterate [%]		Rückhalterate [%]	
Ø Verdünnungsstufe A	97,63969143	6	100,00000000	5	99,99966532	21	100,00000000	9
Ø Verdünnungsstufe B	98,15130919	5	99,99950404	5	99,9992366	21	100,00000000	9
Ø Verdünnungsstufe C	99,53406296	5	99,99793966	5	99,99980399	22	100,00000000	9
Ø Verdünnungsstufe D	99,96825730	2	99,99927987	5	99,99997049	22	99,9999795	9
Ø Verdünnungsstufe A-D	96,56564022		99,99918062		99,99967101		99,99999846	
	RHR-STABW		RHR-STABW		RHR-STABW		RHR-STABW	
Ø Verdünnungsstufe A	1,98690044	6	0,00000000	5	0,00474151	21	0	9
Ø Verdünnungsstufe B	1,85264358	5	0,00110900	5	0,00034983	21	0	9
Ø Verdünnungsstufe C	0,43548244	5	0,00407946	5	0,00066514	22	0	9
Ø Verdünnungsstufe D	0,01871851	2	0,00108921	5	0,00009178	22	0,00000633	9
Ø Verdünnungsstufe A-D	1,07368124		0,00156942		0,00146707		0,00000158	
	KBE im Unfiltrat [n]		KBE im Unfiltrat [n]		KBE im Unfiltrat [n]		KBE im Unfiltrat [n]	
Ø Verdünnungsstufe A	4624	6	4860	5	5787	21	4102	9
Ø Verdünnungsstufe B	48473	5	52889	5	63768	21	45026	9
Ø Verdünnungsstufe C	509173	5	538464	5	665224	22	457289	9
Ø Verdünnungsstufe D	5517606	2	5397628	5	6625296	22	4664082	9
	KBE im Filtrat [n]		KBE im Filtrat [n]		KBE im Filtrat [n]		KBE im Filtrat [n]	
Ø Verdünnungsstufe A	101,7	6	0,0	5	0,0	21	0,0	9
Ø Verdünnungsstufe B	873,6	5	0,2	5	0,0	21	0,0	9
Ø Verdünnungsstufe C	2177,6	5	10,0	5	1,0	22	0,0	9
Ø Verdünnungsstufe D	2280	2	33,6	5	1,4	22	0,1	9
	LRV		LRV		LRV		LRV	
Ø Verdünnungsstufe A	1,7908	6	3,6784	5	3,7968	21	3,6102	9
Ø Verdünnungsstufe B	1,8955	5	4,7155	5	4,7719	21	4,8508	9
Ø Verdünnungsstufe C	2,5622	5	5,2689	5	5,6888	22	5,6573	9
Ø Verdünnungsstufe D	3,4051	2	5,9190	5	6,6772	22	6,6564	9
	LRV-STABW		LRV-STABW		LRV-STABW		LRV-STABW	
Ø Verdünnungsstufe A	0,44235758	6	0,09413070	5	0,14962096	21	0,05191277	9
Ø Verdünnungsstufe B	0,42666925	5	0,09187345	5	0,15062499	21	0,05060667	9
Ø Verdünnungsstufe C	0,6110146	5	0,77009040	5	0,34363567	22	0,05341376	9
Ø Verdünnungsstufe D	0,1401049	2	1,04802467	5	0,40088102	22	0,05318516	9
Ø Verdünnungsstufe A-D	0,40483408		0,50102986		0,26121583		0,05227959	

Tab. 9-4: Rückhalteraten – *Debaryomyces hansenii*

Testorganismus <i>Debaryomyces hansenii</i>	St-Filter (1,72 µm) (n=11)	St-Filter (1,64 µm) (n=10)	St-Filter (1,45 µm) (n=5)	St-Filter (1,25 µm) (n=9)	St-Filter (1,20 µm) (n=3)	St-Filter (1,15 µm) (n=12)	St-Filter (0,92 µm) (n=10)
Charge	8,02	8,24	8,16	8,32	2,45	8,54	8,27
minimale Poren-Ø [µm]	1,657	1,615	1,632	1,632			0,928
mittlere Poren-Ø [µm]	1,716	1,839	1,446	1,25	1,20	1,15	0,922
maximale Poren-Ø [µm]	1,781	1,861	1,467				0,934
	Rückhalterate [%]	Rückhalterate [%]	Rückhalterate [%]	Rückhalterate [%]	Rückhalterate [%]	Rückhalterate [%]	Rückhalterate [%]
Ø Verdünnungsstufe A	99,85419546	99,94531270	99,96811697	99,96799648	100,00000000	100,00000000	100,00000000
Ø Verdünnungsstufe B	99,884556573	99,98126763	99,96707029	99,96707029	100,00000000	100,00000000	100,00000000
Ø Verdünnungsstufe C	99,87695499	99,96525170	99,96516168	99,96516168	99,99996126	99,99996126	100,00000000
Ø Verdünnungsstufe D	flächig	99,96492069	99,96536119	99,96536119	100,00000000	100,00000000	100,00000000
Ø Verdünnungsstufe A-D	94,84985710	99,89211400	99,96861305	99,96863548	99,9999703	99,9999522	100,00000000
	RHR-STABW	RHR-STABW	RHR-STABW	RHR-STABW	RHR-STABW	RHR-STABW	RHR-STABW
Ø Verdünnungsstufe A	3,51536391	0,23178363	0,02376607	4	0,00000000	3	0,00000000
Ø Verdünnungsstufe B	1,32370192	0,12572124	0,00627052	5	0,00000000	3	0,00000000
Ø Verdünnungsstufe C	flächig	0,09437321	0,00974204	0,01901911	0,00000000	3	0,00000000
Ø Verdünnungsstufe D	flächig	0,01946231	0,00478463	0,00751730	0,00002063	3	0,00000000
Ø Verdünnungsstufe A-D	2,41953291	0,11763507	0,01164081	0,01778819	0,00000516	0,00001084	0,00000000
	KBE im Unfiltrat [n]	KBE im Unfiltrat [n]	KBE im Unfiltrat [n]	KBE im Unfiltrat [n]	KBE im Unfiltrat [n]	KBE im Unfiltrat [n]	KBE im Unfiltrat [n]
Ø Verdünnungsstufe A	5158	5369	4910	3140	2509	6356	3907
Ø Verdünnungsstufe B	54908	59462	57010	34268	28259	70381	43132
Ø Verdünnungsstufe C	572230	586425	577945	346514	281230	711263	434367
Ø Verdünnungsstufe D	5708933	5776135	5672251	3454201	2841425	7386447	4346730
	KBE im Filtrat [n]	KBE im Filtrat [n]	KBE im Filtrat [n]	KBE im Filtrat [n]	KBE im Filtrat [n]	KBE im Filtrat [n]	KBE im Filtrat [n]
Ø Verdünnungsstufe A	244,6	9,9	0,8	0,2	0,0	0,0	0,0
Ø Verdünnungsstufe B	1876,0	75,7	6,4	2,9	0,0	0,0	0,0
Ø Verdünnungsstufe C	flächig	722,1	81,0	29,8	0,0	0,2	0,0
Ø Verdünnungsstufe D	flächig	2021,6	227,4	131,1	0,3	0,0	0,0
	LRV	LRV	LRV	LRV	LRV	LRV	LRV
Ø Verdünnungsstufe A	1,2844	3,1475	3,5513	3,4638	3,3693	3,7578	3,5807
Ø Verdünnungsstufe B	1,4014	3,2203	4,0322	4,1789	4,4511	4,8306	4,8245
Ø Verdünnungsstufe C	flächig	3,0099	3,3277	4,3949	5,4491	5,8346	5,8273
Ø Verdünnungsstufe D	flächig	3,5055	4,8951	4,7460	6,4535	6,8968	6,8284
	LRV-STABW	LRV-STABW	LRV-STABW	LRV-STABW	LRV-STABW	LRV-STABW	LRV-STABW
Ø Verdünnungsstufe A	0,27748046	0,55704680	0,19528653	0,18519880	0,01249794	0,13525642	0,10805186
Ø Verdünnungsstufe B	0,13777303	0,59425108	0,35236443	0,55675963	0,00593443	0,13386530	0,10347509
Ø Verdünnungsstufe C	flächig	0,30285015	0,34710493	0,63426363	0,00165426	0,13445794	0,10465211
Ø Verdünnungsstufe D	flächig	0,21324477	0,76951116	0,86867392	0,00880326	0,11373570	0,10174749
Ø Verdünnungsstufe A-D	0,20763175	0,41674970	0,41498429	0,61152685	0,00718497	0,12927934	0,10481659

Tab. 9-5: Rückhalteraten – *Lactobacillus brevis*

Testorganismus <i>Lactobacillus brevis</i>	S+Filter (0,81 µm) (n=2)	S+Filter (0,65 µm) (n=0)	S+Filter (0,59 µm) (n=7)	S+Filter (0,54 µm) (n=8)	S+Filter (0,52 µm) (n=7)	S+Filter (0,5005 µm) (n=6)	S+Filter (0,4985 µm) (n=11)
	Versuche	Versuche	Versuche	Versuche	Versuche	Versuche	Versuche
Charge	8,20	2,44	8,41	8,46	8,45	9,38	8,40
minimaler Poren-Ø [µm]	0,7940	0,6500	0,6970	0,4970	0,4960	0,4950	0,4950
mittlere Poren-Ø [µm]	0,8083	0,6500	0,6970	0,5402	0,5233	0,5005	0,4985
maximaler Poren-Ø [µm]	0,8220	0,6100	0,6100	0,5990	0,5700	0,5210	0,5180
	Rückhalterate [%]	Rückhalterate [%]					
Ø Verdünnungsstufe A	91,70263200	99,15161368	99,72480508	100,00000000	99,99035021	99,99521362	100,00000000
Ø Verdünnungsstufe B	93,99161336	99,32496662	99,79433386	99,99878959	99,99945689	99,999636165	99,999636165
Ø Verdünnungsstufe C	flächig	99,67481267	99,65030821	99,99297127	99,99990948	99,99990178	99,99789090
Ø Verdünnungsstufe D	flächig	99,93844042	99,94292113	99,99891681	99,99940054	99,99998469	99,99844598
Ø Verdünnungsstufe A-C	92,84712688	99,47209052	99,62646037	99,99891917	99,99722678	99,99807469	99,99792213
	RHR-STABW	RHR-STABW	RHR-STABW	RHR-STABW	RHR-STABW	RHR-STABW	RHR-STABW
Ø Verdünnungsstufe A	0,23752644	1,22990363	0,21145682	0,00000000	0,02553095	0,01172420	0,00000000
Ø Verdünnungsstufe B	0,95531467	0,76380079	0,16545135	0,00131622	0,00119881	0,00000000	0,00693861
Ø Verdünnungsstufe C	flächig	0,43391462	0,12534083	0,00101114	0,00041213	0,00016464	0,00169146
Ø Verdünnungsstufe D	flächig	0,05109009	0,04259953	0,00047741	0,00054286	0,00002449	0,00115565
Ø Verdünnungsstufe A-C	0,59642065	0,62469748	0,13621188	0,00077579	0,00692114	0,00396295	0,00254036
	Ø KBE im Unfiltrat [n]	Ø KBE im Unfiltrat [n]					
Ø Verdünnungsstufe A	3622	4238	3923	3804	2702	4471	4800
Ø Verdünnungsstufe B	4052	4616	43752	41657	29652	49156	52004
Ø Verdünnungsstufe C	412387	480398	442721	415649	292434	502760	527535
Ø Verdünnungsstufe D	4099287	4895021	4474630	4131911	2902149	4942351	5225533
	Ø KBE im Filtrat [n]	Ø KBE im Filtrat [n]					
Ø Verdünnungsstufe A	300,5	32,8	10,3	0,0	0,3	0,2	0,0
Ø Verdünnungsstufe B	2420,0	296,0	66,7	0,5	0,1	0,0	2,2
Ø Verdünnungsstufe C	flächig	1439,1	612,9	8,6	1,1	0,5	11,1
Ø Verdünnungsstufe D	flächig	3353,6	2326,8	43,5	16,0	0,7	78,8
	LRV	LRV	LRV	LRV	LRV	LRV	LRV
Ø Verdünnungsstufe A	1,0911	2,4922	2,7706	3,5771	3,3630	3,6478	3,6506
Ø Verdünnungsstufe B	1,2240	2,8044	3,0733	4,6162	4,4667	4,6993	4,4772
Ø Verdünnungsstufe C	flächig	2,9432	3,1876	4,7668	5,3079	5,6481	4,9185
Ø Verdünnungsstufe D	flächig	3,8662	3,5206	5,0071	5,4639	6,5902	5,0453
	LRV-STABW	LRV-STABW	LRV-STABW	LRV-STABW	LRV-STABW	LRV-STABW	LRV-STABW
Ø Verdünnungsstufe A	0,0124313	0,69323963	0,5570223	0,05526272	0,12023018	0,05370304	0,16396391
Ø Verdünnungsstufe B	0,06934464	0,65019722	0,87107684	0,05990865	0,079592107	0,05995199	0,27699607
Ø Verdünnungsstufe C	flächig	0,74136667	0,78978627	0,38807318	0,20512879	0,13284332	0,50535566
Ø Verdünnungsstufe D	flächig	0,99662560	0,68738755	0,13668640	0,58571669	0,19689140	0,64250062
Ø Verdünnungsstufe A-C	0,04068938	0,77010965	0,72093817	0,16109019	0,24674868	0,08193278	0,32210569

Tab. 9-6: Rückhalteraten – *Pediococcus damnosus*

Testorganismus	<i>Pediococcus damnosus</i>	St-Filter (0,32 µm) [n=4]	St-Filter (0,81 µm) [n=5]	St-Filter (0,65 µm) [n=4]	St-Filter (0,69 µm) [n=7]	St-Filter (0,52 µm) [n=3]	St-Filter (0,50 µm) [n=6]	Versuche [n]
Charge	8,27	2,44	8,20	8,41	8,45	8,40		
minimaler Poren-Ø [µm]	0,9060	0,7940	0,9680	0,9600	0,4860	0,4850		
mittlerer Poren-Ø [µm]	0,9224	0,8063	0,8990	0,8990	0,5233	0,4995		
maximaler Poren-Ø [µm]	0,9340	0,6220	0,6100	0,6100	0,5100	0,5180		
	Rückhalterate [%]	Rückhalterate [%]	Rückhalterate [%]	Rückhalterate [%]	Rückhalterate [%]	Rückhalterate [%]	Rückhalterate [%]	
Ø Verdünnungsstufe A	99,59650673	99,95498977	99,99974942	100,00000000	100,00000000	100,00000000	100,00000000	5
Ø Verdünnungsstufe B	99,24669200	99,98874942	99,99702794	100,00000000	100,00000000	100,00000000	100,00000000	5
Ø Verdünnungsstufe C	99,21462967	99,94461445	99,99960254	99,9997424	99,9997424	100,00000000	100,00000000	5
Ø Verdünnungsstufe D	flächig	0	0	0	0	0	0	1
Ø Verdünnungsstufe A-C	99,35060846	99,96275121	99,99639142	99,99892567	99,99992475	100,00000000	100,00000000	
	RHR-STABW	RHR-STABW	RHR-STABW	RHR-STABW	RHR-STABW	RHR-STABW	RHR-STABW	
Ø Verdünnungsstufe A	0,48161721	0,05043414	0,00000000	0,00000000	0,00000000	0,00000000	0,00000000	5
Ø Verdünnungsstufe B	0,78042894	0,00722831	0,00325959	0,00786334	0,00000000	0,00000000	0,00000000	5
Ø Verdünnungsstufe C	0,52891272	0,06379022	0,00211846	0,00018644	0,00039103	0,00000000	0,00000000	5
Ø Verdünnungsstufe D								1
Ø Verdünnungsstufe A-C	0,59686629	0,04048423	0,00179268	0,00281742	0,00019034	0,00000000	0,00000000	
	Ø KBE im Unfiltrat [n]	Ø KBE im Unfiltrat [n]	Ø KBE im Unfiltrat [n]	Ø KBE im Unfiltrat [n]	Ø KBE im Unfiltrat [n]	Ø KBE im Unfiltrat [n]	Ø KBE im Unfiltrat [n]	
Ø Verdünnungsstufe A	4246	4609	4509	3411	1569	2602	2602	5
Ø Verdünnungsstufe B	47519	51944	49402	34259	17608	29882	29882	5
Ø Verdünnungsstufe C	475393	514152	494030	341367	177017	292865	292865	5
Ø Verdünnungsstufe D	3849728			1744029		1803323	1803323	1
	Ø KBE im Filtrat [n]	Ø KBE im Filtrat [n]	Ø KBE im Filtrat [n]	Ø KBE im Filtrat [n]	Ø KBE im Filtrat [n]	Ø KBE im Filtrat [n]	Ø KBE im Filtrat [n]	
Ø Verdünnungsstufe A	26,5	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5
Ø Verdünnungsstufe B	329,6	6,6	1,5	0,4	0,0	0,0	0,0	5
Ø Verdünnungsstufe C	3218,0	285,3	6,8	0,4	0,3	0,0	0,0	5
Ø Verdünnungsstufe D	flächig			1,0				1
	LRV	LRV	LRV	LRV	LRV	LRV	LRV	
Ø Verdünnungsstufe A	2,6089	3,4142	3,5802	3,4961	3,1917	3,3908	3,3908	5
Ø Verdünnungsstufe B	2,5266	4,0638	4,4509	4,4174	4,2361	4,4360	4,4360	5
Ø Verdünnungsstufe C	2,1657	3,7094	4,9413	5,4444	5,2378	5,4412	5,4412	5
Ø Verdünnungsstufe D	flächig			6,2416		6,2795	6,2795	1
	LRV-STABW	LRV-STABW	LRV-STABW	LRV-STABW	LRV-STABW	LRV-STABW	LRV-STABW	
Ø Verdünnungsstufe A	0,55809378	0,38474864	0,30092171	0,20657581	0,10877285	0,16193389	0,16193389	5
Ø Verdünnungsstufe B	0,93351094	0,40577817	0,29424295	0,30304495	0,1097941	0,16718377	0,16718377	5
Ø Verdünnungsstufe C	0,25082080	0,83841697	0,67289128	0,20978952	0,11274762	0,16485449	0,16485449	5
Ø Verdünnungsstufe D	flächig							1
Ø Verdünnungsstufe A-C	0,68080951	0,54298123	0,42286531	0,23990339	0,11048336	0,16465739	0,16465739	

Tab. 9-7: Nachweisgrenzen für Schadhefen bei der RTQ-PCR [rote Markierung – Messwerte mit negativer Schmelzkurvenanalyse]

	Organismenanzahl in der Probe						Positivkontrolle [Ct-Wert]	Negativkontrolle [Ct-Wert]
	10Ex1 [Ct-Wert]	10Ex2 [Ct-Wert]	10Ex3 [Ct-Wert]	10Ex4 [Ct-Wert]	10Ex5 [Ct-Wert]	10Ex6 [Ct-Wert]		
[S.e.1.3.1] S.exiguus, NaCl-Lösung, Standardverf.	26,1	25,7	26,1	23,5	20,1		13,2	31,8
[S.e.1.4.1] S.exiguus, NaCl-Lösung, Direktlyse	26,0	26,2	26,7	25,2	20,9		13,1	32,4
[S.e.1.5.1] S.exiguus, NaCl-Lösung, Standardverf.	28,6	26,8	26,8	24,9	21,3	15,4	12,2	29,9
[S.e.1.5.2] S.exiguus, NaCl-Lösung, Direktlyse	27,6	28,0	26,4	24,0	21,1		12,2	29,9
[S.e.1.6.1] S.exiguus, NaCl-Lösung, Standardverf.	29,2	26,4	N/A	24,7	22,2	14,4	12,8	30,5
[S.e.1.6.2] S.exiguus, NaCl-Lösung, Direktlyse	28,2	26,9	N/A	23,9	21,3		12,8	30,5
[S.e.2.1.1] S.exiguus, NaCl-Lösung, Standardverf.	28,6		29,1		23,2		13,3	27,1
[S.e.2.1.2] S.exiguus, NaCl-Lösung, Direktlyse	27,6	27,6	26,7	24,7	21,6		13,3	27,1
[S.e.2.2.1] S.exiguus, NaCl-Lösung, Standardverf.					27,8		13,8	30,9
[S.e.2.2.2] S.exiguus, NaCl-Lösung, variiertes Standardverf.					26,5		13,8	30,9
[S.e.2.3.1] S.exiguus, NaCl-Lösung, Standardverf.					22,0		12,7	30,0
[S.e.2.3.2] S.exiguus, NaCl-Lösung, variiertes Standardverf.					21,1		12,7	30,0
[S.e.3.1.1] S.exiguus, NaCl-Lösung, Standardverf.	26,4		25,2		20,2		12,6	29,9
[S.e.3.2.1] S.exiguus, NaCl-Lösung, Standardverf.					18,5			31,1
[S.e.4.2.1] S.exiguus, Bier, Standardverf.		27,2			18,6		13,9	35,2
[S.e.4.2.2] S.exiguus, Bier, variiertes Standardverf.	29,0	29,1			22,0		13,9	35,2
[S.e.4.2.3] S.exiguus, Bier, Direktlyse	28,9	28,6			21,7		13,9	35,2
[S.e.4.3.1] S.exiguus, Bier, variiertes Standardverf.					21,9		13,6	30,4
[S.e.4.3.2] S.exiguus, Bier, Direktlyse					23,1		13,6	30,4
[S.e.4.4.1] S.exiguus, Bier, variiertes Standardverf.					19,4		14,0	31,8
[S.e.4.4.2] S.exiguus, Bier, Direktlyse					18,9		14,0	31,8
[S.d.4.1.1] S.c.v.diastaticus, Bier, Standardverf.		25,1					13,3	32,3
[S.d.4.1.2] S.c.v.diastaticus, Bier, variiertes Standardverf.	28,6	28,5			18,9		13,3	32,3
[S.d.4.1.3] S.c.v.diastaticus, Bier, Direktlyse	28,2	26,8			19,7		13,3	32,3

Tab. 9-8: Nachweisgrenze für L.brevis bei der RTQ-PCR [rote Markierung – Messwerte mit negativer Schmelzkurvenanalyse]

	Organismenanzahl in der Probe						Positivkontrolle [Ct-Wert]	Negativkontrolle [Ct-Wert]
	10Ex1 [Ct-Wert]	10Ex2 [Ct-Wert]	10Ex3 [Ct-Wert]	10Ex4 [Ct-Wert]	10Ex5 [Ct-Wert]	10Ex6 [Ct-Wert]		
[L.b.3.1.1] NaCl-Lsg., Standardverf.				25,6	21,0	18,4	13,4	29,3
[L.b.3.2.1] NaCl-Lsg., Standardverf.		27,7	26,8	25,0	25,1	20,7	12,7	28,1
[L.b.3.3.1] NaCl-Lsg., Standardverf.						23,4	14,6	28,7
[L.b.3.3.2] Bier, Standardverf.						21,8	14,6	28,7
[L.b.3.4.1] Bier, Standardverf.						23,4	13,7	30,6
[L.b.3.4.2] Bier, Direktlyse						24,2	13,7	30,6
[L.b.3.5.1] Bier, Standardverf.	31,2	29,8	29,6	29,5	28,1	25,0	14,1	29,6
[L.b.3.5.2] Bier, Direktlyse						25,5	14,1	29,6
[L.b.4.1.1] Bier, Standardverf.			30,1				13,8	28,1
[L.b.4.1.2] Bier, var. Standardverf.		31,1	30,6			24,7	13,8	28,1
[L.b.4.1.3] Bier, Direktlyse		29,4	30,2			27,4	13,8	28,1
[L.b.4.2.1] Bier, var. Standardverf.						25,2	13,9	30,7
[L.b.4.2.2] Bier, Direktlyse						25,1	13,9	30,7
[L.b.4.3.1] Na-Cl-Lsg., Standardverf.						23,5	14,1	30,4
[L.b.4.3.2] Bier, Standardverf.						21,9	14,1	30,4
[L.b.4.3.3] Bier, var. Standardverf.						24,9	14,1	30,4
[L.b.4.4.1] Bier, Standardverf.						18,8	14,6	29,8
[L.b.4.4.2] Bier, var. Standardverf.						22,8	14,6	29,8
[L.b.4.4.3] Bier, Direktlyse						21,9	14,6	29,8

Tab. 9-9: Einfluss einer vorhergehenden Fluoreszenzfärbung auf eine PCR zum Nachweis von Kultur- und Schadhefen

	ohne	DAPI	DAPI + PI	PI	CFDA-SE	Positiv-	Negativ-
	[Ct-Wert]	[Ct-Wert]	[Ct-Wert]	[Ct-Wert]	[Ct-Wert]	kontrolle	kontrolle
[S.c.2.1.1] S.carlsb., NaCl-Lösung, Färbung im Unfiltrat, Direktlyse	21,2	21,0	27,0	28,4		13,9	30,7
[S.c.2.2.1] S.carlsb., NaCl-Lösung, Färbung nach Demontage, Direktlyse	28,3				29,5	12,7	29,4
[S.c.2.2.2] S.carlsb., NaCl-Lösung, Färbung im Unfiltrat, Direktlyse	28,3				28,1	12,7	29,4
[S.c.2.2.3] S.carlsb., Bier, Färbung im Unfiltrat, Direktlyse	26,3	22,8		26,6	26,9	12,7	29,4
[S.e.2.3.1] S.exiguus, NaCl-Lösung, Färbung im Unfiltrat, Direktlyse	25,7		27,6			13,9	30,0
[S.e.2.3.2] S.exiguus, Bier, Färbung im Unfiltrat, Direktlyse	26,7	24,7		24,8	23,9	13,9	30,0
[S.e.4.3.1] S.exiguus, Bier, Färbung im Unfiltrat, Direktlyse	21,9	21,7	20,9			13,6	30,4
[S.e.4.3.2] S.exiguus, Bier, Färbung im Unfiltrat, variiertes Standardverf.	23,1	22,0	22,3			13,6	30,4

Tab. 9-10: Einfluss einer vorhergehenden Fluoreszenzfärbung auf eine PCR zum Nachweis von bierschädlichen Bakterien

	ohne Färbung	DAPI	DAPI + PI	PI	CFDA-SE	Positiv-	Negativ-
	[Ct-Wert]	[Ct-Wert]	[Ct-Wert]	[Ct-Wert]	[Ct-Wert]	kontrolle	kontrolle
[L.b.3.3.1] NaCl-Lösung, Färbung im Unfiltrat, Standardverf.	23,4	23,6	23,8	22,6	25,8	14,6	28,7
[L.b.3.3.2] Bier, Färbung im Unfiltrat, Standardverf.	21,8	22,3	22,8	21,8	23,1	14,6	28,7
[L.b.3.4.1] Bier, Färbung im Unfiltrat, Standardverf.	23,4	24,7	24,1			13,7	30,6
[L.b.3.4.2] Bier, Färbung im Unfiltrat, Direktlyse	24,2	22,9	22,4			13,7	30,6
[L.b.3.5.1] Bier, Färbung im Unfiltrat, Standardverf.	25,0	25,6	26,1			14,1	29,6
[L.b.3.5.2] Bier, Färbung im Unfiltrat, Direktlyse	25,5	25,5	25,6			14,1	29,6
[L.b.4.2.1] Bier, Färbung im Unfiltrat, var. Standardverf.	25,2	24,8	27,7			13,9	30,7
[L.b.4.2.2] Bier, Färbung im Unfiltrat, Direktlyse	25,1	24,5	24,7			13,9	30,7