

Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I
der Technischen Universität München

Schnellnachweis von bierschädlichen Bakterien mit PCR

Erik Bischoff

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 (Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Eberhard Geiger

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Werner Back
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Rudi Vogel

Die Dissertation wurde am 02.01.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11.03.2002 angenommen.

Danksagung

Diese Arbeit wäre nicht zustande gekommen, ohne die Hilfe von verschiedenen Personen, die hier nicht unerwähnt bleiben sollen.

Meiner Frau Dipl.-Ing. Britta Bischoff, die mich stets aufs Neue motiviert hat, diese Arbeit durchzuziehen. Sie hat mir auf bewundernswerte Weise gerade in der Endzeit der Arbeit den Rücken freigehalten.

Meinen Kindern Vanessa und Fabian, die mir gezeigt haben, dass es Wichtiges als die Arbeit gibt.

Meinen Eltern Dr. phil. Horst Bischoff und Ilsemarie Bischoff, die schon während des Studiums und auch während der Promotion mir ideell, materiell und finanziell zur Seite standen.

Meinem Bruder Dr. rer. pol. Sven Bischoff, mit dem ich mich über Promotionen austauschen konnte.

Meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr.-Ing. Werner Back, der mir diese Arbeit zur Verfügung stellte und mich bei der Ausarbeitung nach Kräften unterstützte. Insbesondere in mikrobiologischen Fragestellungen hat er mir wertvolle Tipps gegeben.

Meinen Kollegen am Lehrstuhl, mit denen ich nicht nur in der Arbeit schöne Stunden verbringen konnte. Besonders erwähnt werden müssen hier (ich habe es versprochen) Dipl.-Ing. Kornel Vetterlein, Dipl.-Ing. Stefan Kreis und Dipl.-Ing. (FH) Martin Zarnkow. Sie hatten stets die schlagendsten Argumente.

Meiner Abteilungsleiterin Frau Dipl.-Ing. Ingrid Bohak, die immer ein offenes Auge auf meine Arbeit geworfen hat.

Herrn Dr. rer. nat. Stefan Leibhard, der mich in die Geheimnisse der PCR einführte. Von ihm habe ich viel über wissenschaftliches Arbeiten gelernt.

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	1
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	4
1 Einleitung	6
2 Stand des Wissens	8
2.1 Mikrobiologische Situation in Brauereien	8
2.2 Desoxyribonucleinsäure (DNA)	9
2.3 Internal transcribed spacer region (ITS)	11
2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	12
2.5 Primer	13
2.6 Einsatz der PCR in Brauereien	16
2.7 Wachstumskurven von Bakterien	17
3 Voranreicherung	19
3.1 Material und Methoden	19
3.1.1 Keime und Kultivierungsmethoden	19
3.1.2 Voranreicherungsmedium	20
3.1.3 Bestimmung der Voranreicherungszeit	20
3.1.4 Überprüfung auf DNA-Freiheit von NBB-C	21
3.2 Ergebnisse	21
3.2.1 Bestimmung der Voranreicherungszeit	21
3.2.2 Überprüfung auf DNA-Freiheit von NBB-C	26
3.2.3 Voranreicherung mit NBB-B.....	27
3.3 Diskussion der Voranreicherung	30
4 Zellaufschluß	31
4.1 Material und Methoden	31
4.1.1 Aufschlußmethode nach Lewington.....	31
4.1.2 Aufschlußmethode nach Bej.....	33
4.1.3 Direkter Zellaufschluß.....	34
4.1.4 Chelex-Aufschluß	35
4.1.5 Vergleich Chelex-Aufschluß und direkter Zellaufschluß	36
4.1.6 Optimierung des Chelex-Aufschlusses.....	36

4.2 Ergebnisse	37
4.2.1 Aufschlußmethode nach Lewington.....	37
4.2.2 Aufschlußmethode nach Bej.....	37
4.2.3 Direkter Zellaufschluß.....	37
4.2.4 Chelex-Aufschluß.....	37
4.2.5 Vergleich Chelex-Aufschluß und direkter Zellaufschluß.....	38
4.2.6 Optimierung des Chelex-Aufschlusses.....	39
4.2.7 Nachweisgrenze.....	44
4.2.8 Zellaufschluß mit NBB-B.....	46
4.3 Diskussion des Zellaufschlusses	47
5 PCR	48
5.1 Material und Methoden	48
5.1.1 Primer.....	48
5.1.2 PCR-Bedingungen und DNA-Analyse.....	48
5.1.3 Detektion der amplifizierten DNA.....	49
5.1.4 Identifizierung der amplifizierten DNA.....	49
5.2 Ergebnisse	51
5.2.1 Primer.....	51
5.2.2 Identifizierung der amplifizierten DNA.....	52
5.3 Diskussion der PCR	57
6 Überprüfung der Verfahren unter Praxisbedingungen und Pilotprojekte	58
6.1 Material und Methoden	58
6.1.1 Überprüfung der Verfahren unter Praxisbedingungen.....	58
6.1.2 Pilotprojekte in den Brauereien A und B.....	58
6.1.3 Pilotprojekt in der Brauerei C.....	59
6.2 Ergebnisse	59
6.2.1 Überprüfung der Verfahren unter Praxisbedingungen.....	59
6.2.2 1. Pilotprojekt in der Brauerei A.....	64
6.2.3 2. Pilotprojekt in der Brauerei A.....	70
6.2.4 Pilotprojekt in der Brauerei B.....	80
6.2.5 Brauerei C.....	83
6.3 Diskussion der Pilotprojekte	89
6.3.1 1. Pilotprojekt in Brauerei A.....	89
6.3.2 2. Pilotprojekt in Brauerei A.....	89
6.3.3 Pilotprojekt in Brauerei B.....	89
6.3.4 Pilotprojekt in Brauerei C.....	90

7 Diskussion	92
7.1 PCR-Amplifikation und Primer-Wahl.....	92
7.2 Zellaufschluß.....	94
7.3 Voranreicherung.....	94
7.4 Probenvorbereitung.....	95
7.5 Nachweisgrenze.....	95
7.6 Pilotprojekte	96
7.7 Kosten des Schnellnachweises	96
7.8 Beachtenswerte Punkte beim PCR-Schnellnachweis.....	98
8 Zusammenfassung	101
9 Literatur	103

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
° C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
A	Adenin
Abb.	Abbildung
BDR	Ausschankcontainer (Bierdrive)
bp	Basenpaare
C	Cytosin
Chr.	Christus
D	Dunkel
DM	Deutsche Mark
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DT	Drucktank
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EH	Edel Hell
EK-FA	Entkeimungsfilter Auslauf
FB	Festbier
FLK	Flaschenkeller
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GT	Gärtank
h	Stunde
H ₂ O	steriles Wasser
HCl	Salzsäure
ITS	Internal transcribed spacer region
kb	Kilobasenpaar: 1000 Basenpaare
KCl	Kaliumchlorid
KZE	Kurzzeiterhitzung
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
M	molar

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NBB-A	Nachweis von Bierschädlingen nach BACK, Agar
NBB-B	Nachweis von Bierschädlingen nach BACK, Bouillon
NBB-C	Nachweis von Bierschädlingen nach BACK, Konzentrat
NTP	Desoxynucleosidtriphosphate
o.B.	ohne Befund
P	Pils
<i>P.</i>	<i>Pediococcus</i>
PCR	Polymerase-Chain-Reaction, Polymerase-Ketten-Reaktion
PT	Puffertank
rDNA	ribosomale DNA
RAPD	Randomly Amplified Polymorphyc DNA
S	SVEDBERG-Einheit
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
t	Zeit
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
v	Volumen
VH	Helles Vollbier
w	Gewicht
WB	Weizenbier
Y	Cytosin oder Thymin (IUPAC-IUB Symbol)
z.B.	zum Beispiel
ZKG	Zylindronischer Gärtank

1 Einleitung

Bier ist ein sehr altes Getränk, dessen Geschichte sich durch Ausgrabungen und Funde über fast 5000 Jahre zurückverfolgen läßt. Die älteste Erwähnung erfährt Bier in einer Keilschrift in Mesopotamien aus dem Jahr 2800 vor Chr., worin den Arbeitskräften eine täglich Ration an Bier und Brot zugeteilt wird. Man hatte sehr zeitig bemerkt, dass das Bier frei von gefährlichen Keimen war und dass man auch Wasser, das sehr häufig nicht in einwandfreiem Zustand zur Verfügung stand, durch Gärung und die natürlichen Säuren, die dabei erzeugt werden, aufbereiten konnte. Im 15. Jahrhundert festigte sich die gewerbliche Stellung der Brauer. Mißernten und andere Umstände führten zuweilen dazu, bei Rohstoffknappheit andere Rohstoffe als die üblichen zu verwenden. Von einigen der verwendeten Ersatzkräuter ging sogar eine Gesundheitsgefährdung aus. Um solche Mißstände zu vermeiden, wurde durch obrigkeitliche Gebote 1516 festgelegt, dass für die Herstellung des Bieres nur mehr Malz, Hopfen und Wasser zu verwenden sei. Seit 1906 gilt dieses Reinheitsgebot, wonach Bier lediglich aus Gerstenmalz, Hopfen und Wasser hergestellt werden darf, in Deutschland mit Gesetzeskraft uneingeschränkt für untergärige Biere (20).

Durch die zunehmende Industrialisierung der Brauerei wurden mit der Zeit völlig neue Ansprüche an die mikrobiologischen Verhältnisse gestellt. Während früher die Mindesthaltbarkeitsdauer von einem Bier nur wenige Tage betrug, muß ein Bier heutzutage eine Haltbarkeitsdauer von 6 Monaten bis zu einem Jahr haben. Dazu ist eine Reinheit des Bieres in Hinblick auf bierschädliche Keime dringend vonnöten.

Um diese mikrobiologische Reinheit zu gewährleisten, sind in den letzten Jahren neue Untersuchungsmethoden auf Grundlage der PCR-Technik entstanden. In den letzten Jahrzehnten etablierte klassische Methoden, wie z.B. Anreicherungen in spezifischen Medien, haben aber immer noch aus Gründen des notwendigen Spurennachweises ihre Berechtigung und sind heutzutage weitverbreitet in den Brauereien.

Diese Arbeit zeigt ein neuartiges Verfahren zur Detektion von bierschädlichen Bakterien mit Hilfe der PCR-Technik, welches sich von den bisherigen Verfahren in Verwendung von universellen Primern und der Voranreicherung unter-

scheidet. Durch eine selektive Voranreicherung werden nur bierschädliche Keime vermehrt. Daher ist es möglich, universelle Primer zu benutzen, die durch ihrer Basensequenz alle Prokaryonten nachweisen.

Somit können mikrobiologische Kontaminationen innerhalb von 48 h detektiert werden. Anschließend können die so nachgewiesenen Kontaminationen mit Hilfe von Restriktionsenzymen identifiziert werden.

2 Stand des Wissens

2.1 Mikrobiologische Situation in Brauereien

Durch die besonderen selektiven Eigenschaften des Bieres, hat sich in Brauereien eine eigene spezifische Mikroflora ausgebildet (3). Während in Proben, die im Bereich der Würzebereitung und Angärung genommen wurden, sehr viele ubiquitäre Keime zu finden sind, haben im Jungbier und im fertigen Bier nur noch sehr wenige Mikroorganismen die Möglichkeit, sich zu vermehren. Die selektiven Eigenschaften sind insbesondere:

- anaerobe Atmosphäre
- niedriger pH-Wert
- Hopfenbitterstoffe
- Alkohol
- Mangel an bestimmten Nähr- und Wuchsstoffen
- niedrige Temperatur

Diese Faktoren bewirken einen weitgehenden Schutz vor mikrobiellem Verderb und verhindern das Auftreten von pathogenen Keimen.

Trotzdem gibt es einige Keime, die auch unter solchen selektiven Eigenschaften wachsen können, und dadurch das Bier verderben. Hierzu zählen vor allem Vertreter der Gattung *Lactobacillus* und *Pediococcus*. *Lactobacillus brevis*, *L. lindneri* und *Pediococcus damnosus* verursachen zusammen rund 80% der Reklamationen, die auf mikrobiellen Verderb zurückzuführen sind. Bei den bisherigen Verfahren zum Nachweis von bierschädlichen Bakterien wurde das Wachstum der Organismen auf Selektivmedien beobachtet oder durch Stoffwechselprodukte ein Umschlagen eines Indikators erreicht. Diese Verfahren sind in der Praxis bewährt und gewährleisten einen Spurennachweis von Kontaminationen im Bier. Der große Nachteil dieser klassischen Methoden liegt in dem hohen Zeitaufwand. Ergebnisse liegen erst nach 5-7 Tagen vor. Nach der Filtration des Bieres wird dieses in der Regel innerhalb von 48 Stunden verkauft. Daher liegen bei klassischen Nachweismethoden die Ergebnisse erst vor, nachdem das Bier bereits beim Kunden ist. Somit ist keine Möglichkeit mehr

gegeben, auf diese Ergebnisse zu reagieren, und z.B. durch eine erneute Pasterisation der Flasche eine Gewißheit über die Keimfreiheit des Bieres zu bekommen. Hier ist die Entwicklung eines neuen Verfahrens zur Überprüfung der biologischen Situation dringend geboten.

2.2 Desoxyribonucleinsäure (DNA)

Eine DNA-Kette ist ein langes, unverzweigtes Polymer, das aus nur vier verschiedenen Bausteinen zusammengesetzt ist. Dies sind die Desoxyribonucleotide, die die Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T) enthalten (Abb. 3). Nucleotide sind miteinander durch kovalente Phosphodiesterbindungen verbunden, die den 5'-Kohlenstoff einer Desoxyribosegruppe mit dem 3'-Kohlenstoff der nächsten verknüpft (Abb. 2) (1). Nach dem WATSON-CRICK-Modell sind die Polynucleotidstränge nach Art einer Doppelhelix um eine gedachte Achse gewunden (Abb. 1) (33). Um den Abständen und den Bindungsverhältnissen Rechnung zu tragen, muß dabei jedem Adenin ein Thymin und jedem Guanin ein Cytosin gegenüberstehen (Abb. 3) (24). Somit läßt sich aus einem Einzelstrang sehr leicht der komplementäre Strang rekonstruieren.

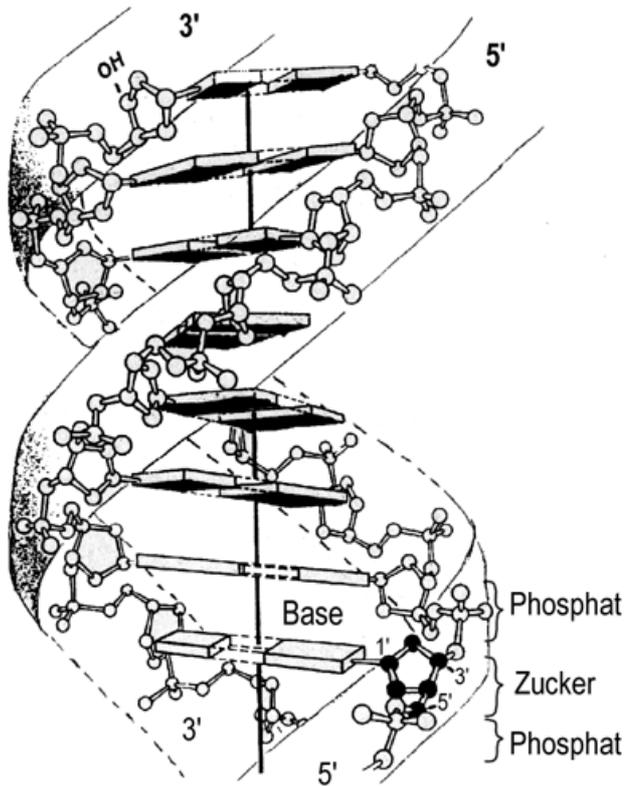


Abb. 1: Doppelhelix der DNA (29)

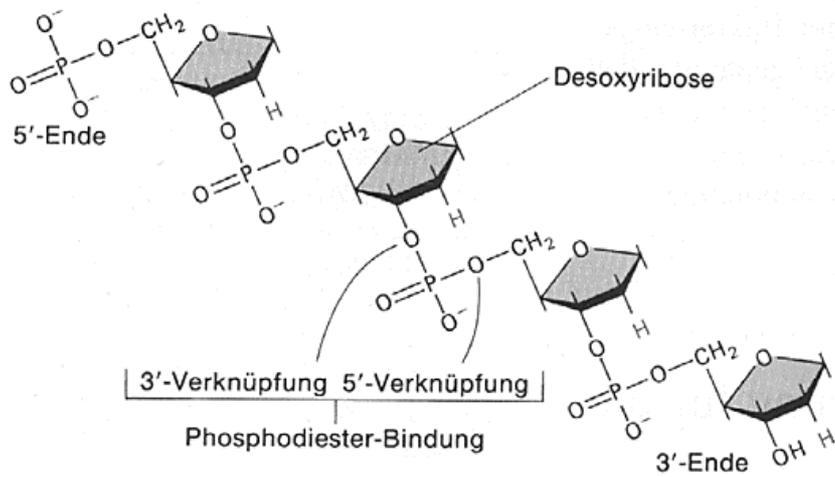


Abb. 2: Zucker-Phosphat-Gerüst der DNA (1)

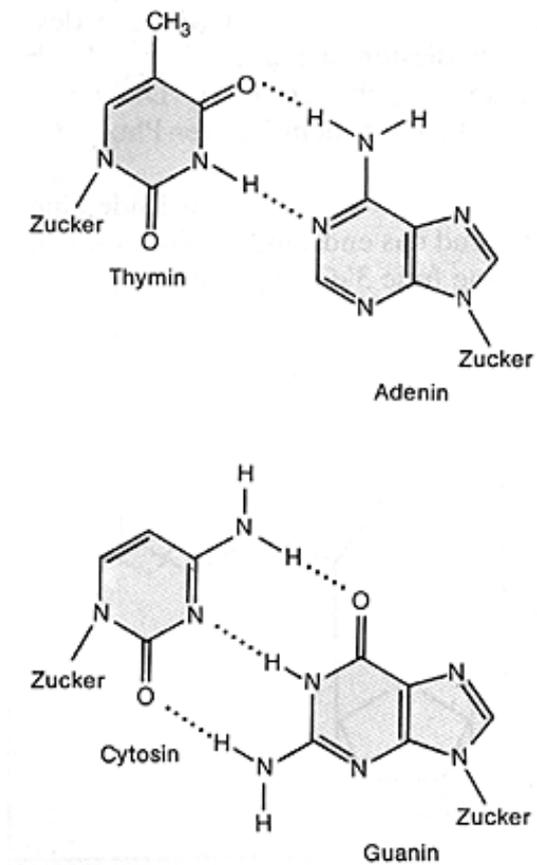


Abb. 3: Strukturformeln von Thymin, Adenin, Cytosin und Guanin (17)

2.3 Internal transcribed spacer region (ITS)

Die Ribosomen sind die Orte der Proteinsynthese und somit in allen Zellen enthalten. Sie sind ihrer Funktion nach sehr konservativ. Dieses gilt insbesondere für die ribosomale RNA (rRNA), da ihre Basensequenz weder durch die Degeneration des genetischen Codes noch durch Suppressor-Mutationen beeinflusst wird (24). Durch Analyse dieser hochkonservativen Merkmalstränge und ihren Vergleich was es möglich, einen phylogenetischen Stammbaum der Prokaryonten zu erarbeiten (34). Da die rRNA und damit auch die ribosomale DNA (rDNA) zum einen für einen Bakterienstamm gleich ist, sich jedoch Unterschiede zwischen den einzelnen Bakterien in dieser rDNA feststellen lassen, wird dieser Abschnitt der DNA häufig zur Entwicklung von spezifischen Primern be-

nutzt. Die Sequenz der ribosomalen DNA ist für viele Bakterienarten bekannt und in zugänglichen Datenbanken hinterlegt.

Die rDNA besteht aus zwei Untereinheiten, der 16S rDNA und der 23S rDNA. Zwischen diesen beiden Untereinheiten liegt die Internal Transcribed Spacer Region (ITS). Diese Region hat keine Bedeutung für die Synthetisierung von Aminosäuren und dient lediglich zur Trennung der 16S rDNA und der 23S rDNA. Dadurch haben Mutationen, d.h. Veränderungen an der DNA, in der ITS keine Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit eines Mikroorganismus. Sämtliche natürliche Mutationen in der ITS bleiben dadurch erhalten, so dass dieser Abschnitt der DNA hochvariabel ist und zur Identifizierung von Bakterien genutzt werden kann (4).

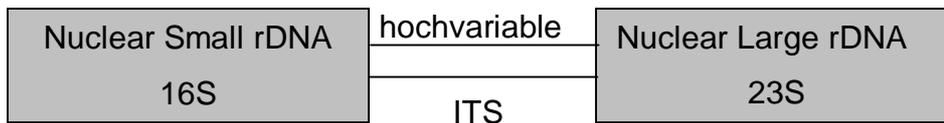


Abb. 4: Position der ITS in der rDNA

2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zuerst wird die Proben-DNA bei 93 ° C hitzedenaturiert. Die DNA liegt danach einzelsträngig vor. An diese komplementären Einzelstränge binden dann bei 30 - 60 ° C, je nach Länge und Basenkomposition die synthetisch erstellten Oligonukleotide (= Primerbindung). Das Primerpaar wird so ausgewählt, dass ihre Bindungsstellen auf der DNA (Strang und Gegenstrang) in einem für diese Technik optimalen Abstand (ca. 300 - 3000 Basenpaare) liegt. Die Taq-Polymerase erkennt die an die einzelsträngige DNA gebundenen Primer als Startpunkte und verlängert diese komplementär zum Matrizenstrang (= Kettenverlängerung). Diese Neusynthese findet bei der für die Taq-Polymerase optimale Temperatur von 72 ° C für 1-2 min statt. Nach diesem Schritt liegt der durch das Primerpaar bestimmte Bereich der DNA doppelsträngig vor, die gezielte Verdopplung spezifischer Sequenzen ist vollzogen. Durch Aneinanderreihung dieser Verdopplungszyklen (25-40 Zyklen) lassen sich ausgehend von

sehr wenigen DNA-Molekülen nahezu beliebig große Mengen an DNA-Amplifikaten erstellen, die dann weiteren Analysen unterzogen werden (Abb. 5) (16).

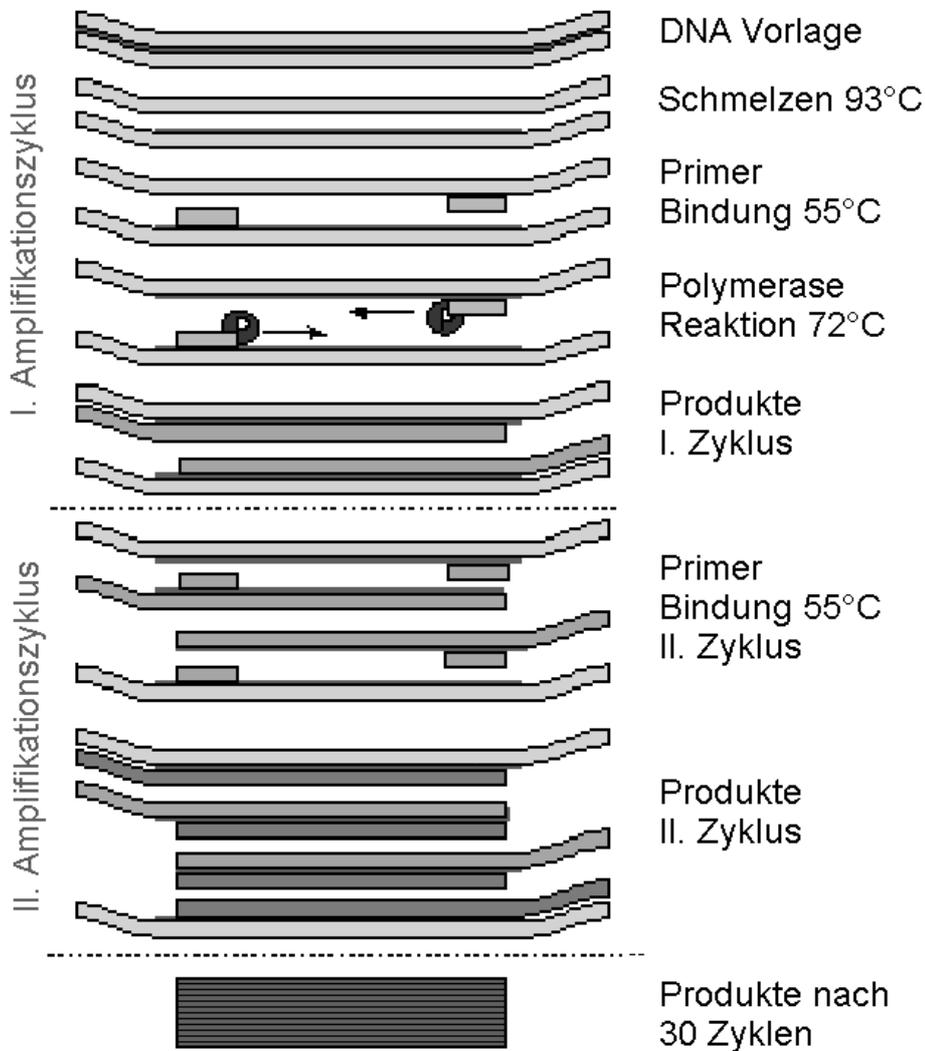


Abb. 5: Prinzip der PCR

2.5 Primer

Primer sind Oligonukleotide, die benötigt werden, um die PCR zu starten. Die Primer binden in den flankierenden Bereichen der Ziel-DNA. Ausgehend von den Primern wird die einzelsträngige DNA mit Desoxynucleosidtriphosphaten (NTPs) komplettiert (siehe 2.4). Im Bereich des Schnellnachweises unterscheidet man zwischen zwei Arten von Primern:

- a) spezifische Primer
- b) universelle Primer

Spezifische Primer sind so gewählt, dass sie sich nur an einer bestimmten Art (z.B. *L. brevis*) anlagern können. Diese Primer binden meist in der 16S rDNA oder der 23S rDNA. Ein DNA-Fragment, das man aufgrund von spezifischen Primern erhält, ist so zugleich eine Identifizierung des Organismus. Durch diese Identifizierung ist man sich sehr schnell über die Schädlichkeit eines Keimes im Klaren.

DNA-Sequenzuntersuchungen sind in Brauereien noch nicht sehr verbreitet. Bisher wurden Mikroorganismen nur durch ihr morphologisches Erscheinungsbild, das mikroskopische Bild, Färbemethoden, physiologisch-biochemische Tests und Wachstum auf spezifischen Nährböden unterschieden. Eine umfassende Untersuchung der DNA-Sequenzen wurde bislang noch nicht vorgenommen. Es ist daher möglich, dass sich verschiedene Stämme trotz morphologisch identischem Bild in der DNA-Sequenz unterscheiden. Dadurch besteht die Gefahr, dass spezifische Primer nur einen Teil der bierschädlichen Bakterien erfassen und es so zu falsch-negativen Befunden kommt. Die Sequenzen von spezifischen Primern sind für die meisten Mikroorganismen bekannt und in Datenbanken hinterlegt, die für jeden zugänglich sind.

Universelle Primer lagern sich an die DNA aller Prokaryonten an. Dadurch wird bei sämtlichen Prokaryonten DNA amplifiziert, die sich in einer anschließenden Elektrophorese allenfalls aufgrund der Länge der gebildeten Fragmente unterscheiden lassen. In den meisten Fällen ist es aber so, dass man nur aufgrund der gebildeten DNA keine Unterscheidung der verschiedenen Mikroorganismen treffen kann. Somit erhält man nur ein Signal, das anzeigt, ob sich irgendwelche Prokaryonten in der Lösung befinden oder nicht. Die Sequenzen der meisten universellen Primer sind ebenfalls bekannt und in Datenbanken hinterlegt. Sonst lassen sich die Sequenzen universeller Primer durch einen Vergleich der DNA-Sequenzen (DNA-Alignment) bestimmen.

Die Situation in Brauereien stellt sich so dar, dass der überwiegende Teil der zu untersuchenden Proben keine Kontamination mit bierschädlichen Keimen auf-

weist. Mit universellen Primern ist daher eine erste Untersuchung auf Keimfreiheit dieser Proben möglich. So kann man in den negativen Fällen die Untersuchungen beenden. Wenn man diese Primer nun so wählt, dass das zu amplifizierende DNA-Fragment variabel ist, ist eine weitere Identifizierung des erhaltenen DNA-Fragments möglich. Mit der Wahl von universellen Primern, die an der 16S rDNA und der 23S rDNA binden und daher die ITS (siehe 2.3) amplifizieren, ist diese weitere Identifizierung möglich. Da diese Primer in konservierten Regionen binden, werden alle bierschädlichen Keime von diesen Primern erfaßt.

Bei der Arbeit mit spezifischen Primern hat man zwei Möglichkeiten:

1. Für jede Probe wird ein Primer-Cocktail benutzt (7, 15, 31, 32) (Multiplex-PCR). Dieser Primer-Cocktail enthält sämtliche Primer, der für diese Untersuchung interessanten Keime. Aufgrund der Vielzahl der eingesetzten Primer, sinkt die Sensitivität in diesem Ansatz. Eine herabgesetzte Sensitivität bedeutet aber eine verlängerte Voranreicherungszeit, was dem Sinn eines Schnelldachweises widerspricht.
2. Die Probe wird auf mehrere PCR-Ansätze aufgeteilt und zu jedem Ansatz wird ein spezifisches Primerpaar hinzugefügt. Hier ist das Problem, dass die Taq-Polymerase sehr teuer ist, und dadurch sich die Analyse einer einzelnen Probe sehr verteuert, außerdem ist dieses Verfahren sehr arbeitsaufwändig.

2.6 Einsatz der PCR in Brauereien

Die PCR wird in Brauereien hauptsächlich für zwei Anwendungsgebiete eingesetzt:

1. Die Identifizierung von Schad- und Nutzkeimen,
2. Der Schnellnachweis von Schadkeimen.

Die Aufgabenstellung in diesen beiden Fällen unterscheidet sich grundlegend. Bei der Identifizierung wird eine bereits angereicherte Probe durch spezifische Primer auf die genetische Übereinstimmung mit bekannten Stämmen überprüft. Eine weitere Möglichkeit der Identifizierung ist der Nachweis mit RAPD-PCR, bei der unspezifische Primer an mehreren Stellen der DNA binden und dadurch ein Bandenmuster erzeugen, welches mit bekannten Bandenmustern von Musterstämmen verglichen werden kann. Hier ist allerdings auf die Reinheit des zu untersuchenden Mikroorganismusses in der vorangereicherten Probe zu achten. Das Problem bei der Identifizierung stellen die Wahl der richtigen Primer dar. Da eine sehr hohe Zellzahl vorhanden ist, spielt die Effektivität des Zellaufschlusses keine Rolle. Ebenso ist der zeitliche Faktor bei der Identifizierung nicht entscheidend.

Bei Schnellnachweis von Schadkeimen treten andere Probleme auf. Hier ist das Hauptproblem die geringe Zellzahl, die in der ursprünglichen Probe vorliegt. Bei Beginn des Schnellnachweisverfahrens ist es weiterhin nicht bekannt, welche Keime in der Probe vorliegen. Es kann ein Sammelsurium an unterschiedlichsten Keimen im Bier vorhanden sein, von denen jedoch nur ein Teil bierschädlich sein kann. Diese verschiedenen Keime unterscheiden sich nicht nur in ihrer Bierschädlichkeit, sondern auch in ihrem Wachstumsverhalten und ihren Wachstumseigenschaften. So ist der Nachweis von unschädlichen Keimen ebenso zu vermeiden, wie ein falsch-negativer Befund aufgrund eines zu langsamen Anwachsens in dem Voranreicherungsmedium.

2.7 Wachstumskurven von Bakterien

Werden Bakterien in eine Nährlösung eingimpft, so wachsen sie im allgemeinen so lange, bis ein Wachstumsfaktor ins Minimum gerät und das Wachstum begrenzt. Werden während dieses Vorganges keine Nährstoffe zu- oder abgeführt, so bezeichnet man das Wachstum in diesem vorgegebenen Lebensraum als statische Kultur. Das Wachstum in einem derartigen geschlossenen System gehorcht Gesetzmäßigkeiten. Das Wachstum einer Bakterienkultur wird in graphischer Darstellung anschaulich, wenn man die Logarithmen der Lebendzellzahl gegen die Zeit aufträgt. Eine typische Wachstumskurve (Abb. 6) hat sigmoide Gestalt und läßt mehrere Wachstumsphasen unterscheiden, die regelmäßig auftreten: Anlauf- (oder lag-) Phase, exponentielle (logarithmische) Phase, stationäre Phase und Absterbephase (24).

Anlaufphase: Die Anlaufphase umfaßt das Zeitintervall zwischen der Impfung und dem Erreichen der maximalen Teilungsrates. Die Dauer der Anlaufphase ist insbesondere von der Vorkultur und vom Alter des Impfmateri als sowie von der Eignung der Nährlösung abhängig. Bei der Voranreicherung im Rahmen eines Schnellnachweises stellt die Anlaufphase den Zeitraum zwischen Zugabe eines Voranreicherungsmediums und dem Erreichen der exponentiellen Phase dar.

Exponentielle Phase: Die exponentielle Phase ist durch eine konstante minimale Generationszeit charakterisiert. Die Generationszeit während der exponentiellen Phase ist eine für jede Bakterienart spezifische, milieuabhängige Größe. Bei vielen Bakterien sind Zellgröße und Zellproteingehalt während der exponentiellen Phase konstant; die Kultur besteht gewissermaßen aus „Standardzellen“. Ist dieser Sachverhalt eindeutig nachgewiesen, so nehmen Zellzahl, Proteine und Trockenmasse mit gleichen Raten zu.

Stationäre Phase: Die stationäre Phase stellt sich ein, wenn die Zellen nicht mehr wachsen. Die Wachstumsrate ist von der Substratkonzentration abhängig; infolgedessen tritt bei abnehmender Substratkonzentration bereits vor dem völligen Verbrauch des Substrats eine Herabsetzung der Wachstumsrate ein.

Absterbephase: Infolge von Substratmangel in einer statischen Kultur sterben die Bakterien ab.

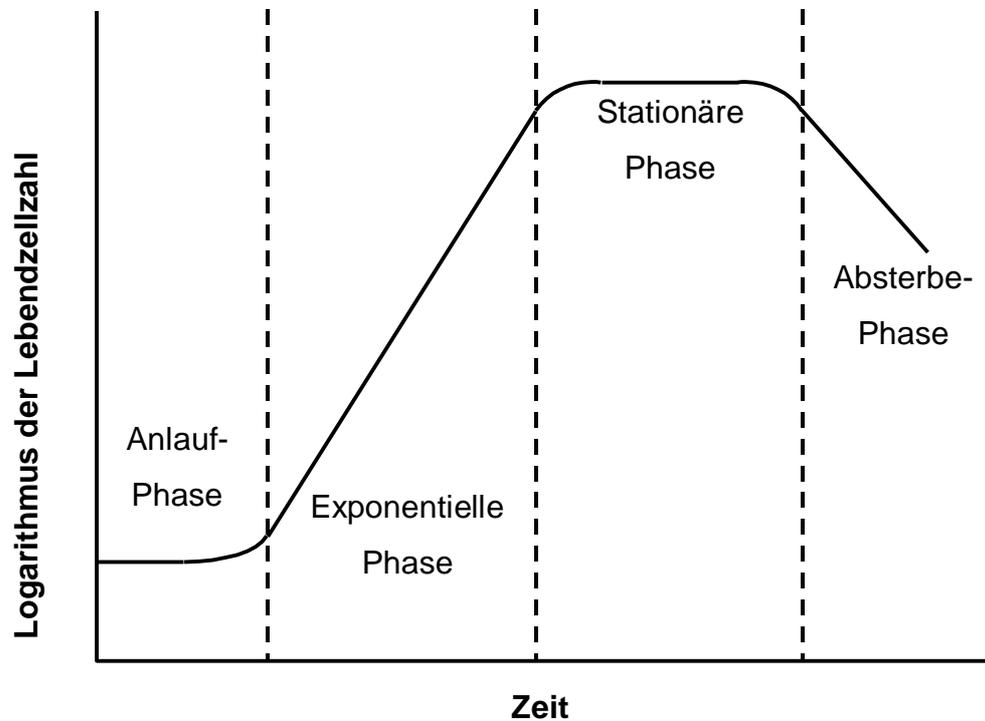


Abb. 6: Wachstumskurve einer Bakterienkultur

In dieser Untersuchung ist das Anwachsen einer Bakterienkultur bis zu einer bestimmten geringen Zellzahl interessant, so dass sich die Zellen stets entweder in der Anlauf-Phase oder in der exponentiellen Phase befinden. Da die gemessenen Keimzahlen sehr gering sind, kann man davon ausgehen, dass die Keime sich noch nicht im Übergang zur stationären Phase befinden und daher kein logarithmisches Wachstum mehr hätten.

3 Voranreicherung

Die Voranreicherung ist bei einem Schnellnachweis notwendig, da das Ziel eines jeden mikrobiologischen Nachweises die Identifizierung eines einzelnen Keimes (=Spurennachweis) sein muß. Um diesen einen Keim nachweisen zu können, ist eine Voranreicherung unumgänglich, da zum einen beim Zellaufschluß DNA verloren geht, zum anderen als auch für die PCR eine Mindestmenge an DNA vorhanden sein muß. Ein weiterer Vorteil der Voranreicherung ist die ausschließliche Vermehrung von lebenden Zellen. Die PCR weist lebende Zellen ebenso nach, wie tote Zellen. Durch die Voranreicherung werden die lebenden Zellen vermehrt, während sich die tote Zellen naturgemäß nicht mehr vermehren können und daher unter der Nachweisgrenze bleiben. Da in dieser Arbeit mit universellen Primern gearbeitet wird, ist eine spezifische Voranreicherung unabdingbar. Durch universelle Primer können bierschädliche Keime nicht von unschädlichen Keimen unterschieden werden. Um nun eine Differenzierung zu bekommen, muß die Voranreicherung spezifisch sein. NBB-C (Döhler-Euro Citrus, Darmstadt) ist in den europäischen Brauereien sehr verbreitet und hat sich hervorragend als Anreicherungsmedium zum Nachweis von bierschädlichen Bakterien bewährt. NBB-C (5% in Bier) ist in seiner Anwendung anderen spezifischen Voranreicherungsmedien, z.B. MRS überlegen (27). Durch den hohen Verbreitungsgrad von NBB in europäischen Brauereien muß sich das Laborpersonal nicht an andere unbekannte Nährmedien gewöhnen.

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Keime und Kultivierungsmethoden

Bei den Untersuchungen wurden als Beispielkeime *Lactobacillus brevis* (L32, interne Stammsammlungsnummer), *L. lindneri* (L2) und *Pediococcus damnosus* (P91) benutzt. Diese Keime stammen aus der institutseigenen Stammsamm-

lung. Diese drei Stämme verursachen über 85 % der mikrobiologischen Kontaminationen in Brauereien (3). Alle Keime wurde mit NBB-C-Proben aus kontaminiertem Bier gewonnen , mittels physiologisch-biochemischer Tests identifiziert, und bei -20 ° C in Glyzerin aufbewahrt.

3.1.2 Voranreicherungsmedium

Die Voranreicherung wurde mit NBB-C-Proben durchgeführt. 150 ml Bier und 9 ml NBB-C (5%) wurden in einer 180 ml Bügelverschlußflasche mit H₂O randvoll aufgefüllt (3). Diese Methode garantiert, dass nur obligate und potentielle Bier-schädlinge wachsen können und keine unschädlichen Bakterien das Ergebnis verfälschen können (3, 6, 8, 14, 23, 25).

Bei filtriertem Bier ist es auch möglich, das Bier zu membranfiltrieren und die Membran anschließend in NBB-Bouillon (NBB-B) zu inkubieren. Um die Eignung von NBB-B zu testen, wurde NBB-B mit unterschiedlichen Titern von *L. brevis* versetzt und sofort einem Zellaufschlußverfahren und der PCR unterworfen.

3.1.3 Bestimmung der Voranreicherungszeit

Die Zellen wurden in Bier mit einem Zusatz von 10 % NBB-B 2 Tage bei 28 ° C inkubiert. Das Medium wurde dann 3 Wochen bei 4 ° C gelagert, um eine Simulation der Lagerbedingungen zu erreichen. Nach 3 Wochen wurde die Keimzahl festgestellt und die Endkonzentration von ca. 1 Keim / ml im Voranreicherungsmedium eingestellt. Das Voranreicherungsmedium wurde bei 28 ° C inkubiert und alle 4 Stunden wurden aus 1 ml Voranreicherungsmedium eine NBB-A-Gußplatte hergestellt. Die Kolonien wurden nach 7 Tagen gezählt.

3.1.4 Überprüfung auf DNA-Freiheit von NBB-C

Bei dem Pilotversuch in der Brauerei A wurde eine hohe Anzahl an falsch-positiven Signalen festgestellt, so dass NBB-C auf eventuell vorhandene DNA untersucht wurde. Hierfür wurden 150 ml Sterilbier, 9 ml NBB-C aus verschiedenen Chargen mit H₂O auf 180 ml aufgefüllt. Dieses Medium wurde nun ohne Voranreicherung einem Zellaufschluß zugeführt und die PCR durchgeführt.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Bestimmung der Voranreicherungszeit

Das Voranreicherungsmedium NBB-C bietet gute Wachstumsbedingungen für alle bierschädlichen Bakterien. *Lactobacillus brevis* ist ein sehr schnell wachsendes Bakterium. Die lag-Phase beträgt nur 4 Stunden und die Generationszeit ist sehr kurz (Abb. 7). Aus einer Zelle entstehen innerhalb von 28 Stunden 1000 Zellen, die für eine Detektion mit der PCR notwendig sind. Sowohl *L. lindneri* als auch *Pediococcus damnosus* benötigen zwischen 18 und 22 Stunden, um die lag-Phase zu überwinden. Danach ist die Generationszeit so gering, dass für eine 1000fache Vermehrung mindestens 40 Stunden benötigt werden (Abb. 8, Abb. 9).

Eine Normierung der Ergebnisse bedeutet, dass die Zellzahlen der Wachstumskurven durch die Zellzahl bei $t = 0$ h geteilt werden. Bei einer gemessenen Zellzahl n kann man das Meßvolumen V_M , in diesen Untersuchungen 1 ml, durch n teilen, so dass man rechnerisch in diesem Volumen zu Beginn der Wachstumskurve ($V_B = V_M/n$) nur 1 Keim vorkommt. Wenn nun weiterhin dieses Volumen V_B rechnerisch für die Ermittlung der Zellzahl herangenommen wird, so erhält man das Wachstumsverhalten des Keimes ausgehend von einer lebenden Zelle.

Nach Auszählung der Gußplatten ergab sich für *L. brevis* folgende Werte:

Tab. 1: Ermittelte Zellzahlen von *L. brevis*

Zeit / h	Reihe 1 / Zellzahl	Reihe 2 / Zellzahl	Reihe 3 / Zellzahl
0	8	4	6
8	6	5	21
18	213	141	240
21	475	330	566
23	894	610	1000
25	1152	964	1700
27	2300	1280	2600

Indem man die Werte durch die Zellzahl bei $t = 0$ h teilt (normieren), bekommt man das Wachstumsverhalten eines einzelnen Keimes.

Tab. 2: Normierte Zellzahlen von *L. brevis*

Zeit / h	Reihe 1 Zellzahl normiert	Reihe 2 Zellzahl normiert	Reihe 3 Zellzahl normiert	Mittelwert normierter Zellzahlen	Standard- abweichung
0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
8	0,8	1,3	3,5	1,8	0,7
18	26,6	35,3	40,0	34,0	3,4
21	59,4	82,5	94,3	78,7	8,9
23	111,8	152,5	166,7	143,6	14,3
25	114,0	241,0	283,3	222,8	35,7
27	287,5	320,0	433,3	347,0	38,3

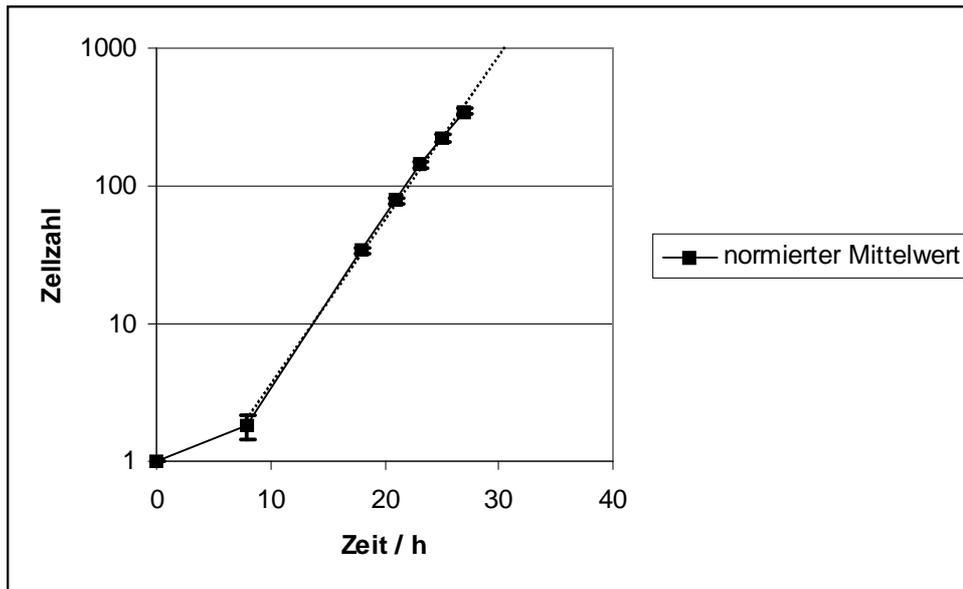


Abb. 7: Exponentielles Wachstum von *L. brevis*. Halblogarithmische Auftragung mit Extrapolation bis zu einer Zellzahl von 1000 Zellen

Für *L. lindneri* ergaben sich folgende Zellzahlen:

Tab. 3: Ermittelte Zellzahlen von *L. lindneri*

Zeit / h	Reihe 1 / Zellzahl	Reihe 2 / Zellzahl
0	56	65
8	85	74
18	106	93
21	132	117
23	218	199
25	370	370
27	666	642

Normiert ergeben sich damit folgende Zellzahlen:

Tab. 4: Normierte Zellzahlen von *L. lindneri*

Zeit / h	Reihe 1, Zellzahl normiert	Reihe 2, Zellzahl normiert	Mittelwert, normiert	Standardabweichung
0	1,0	1,0	1,0	0,0
8	1,5	1,1	1,3	0,1
18	1,9	1,4	1,7	0,2
21	2,4	1,8	2,1	0,2
23	3,9	3,1	3,5	0,3
25	6,6	5,7	6,1	0,3
27	11,9	9,9	10,9	0,7

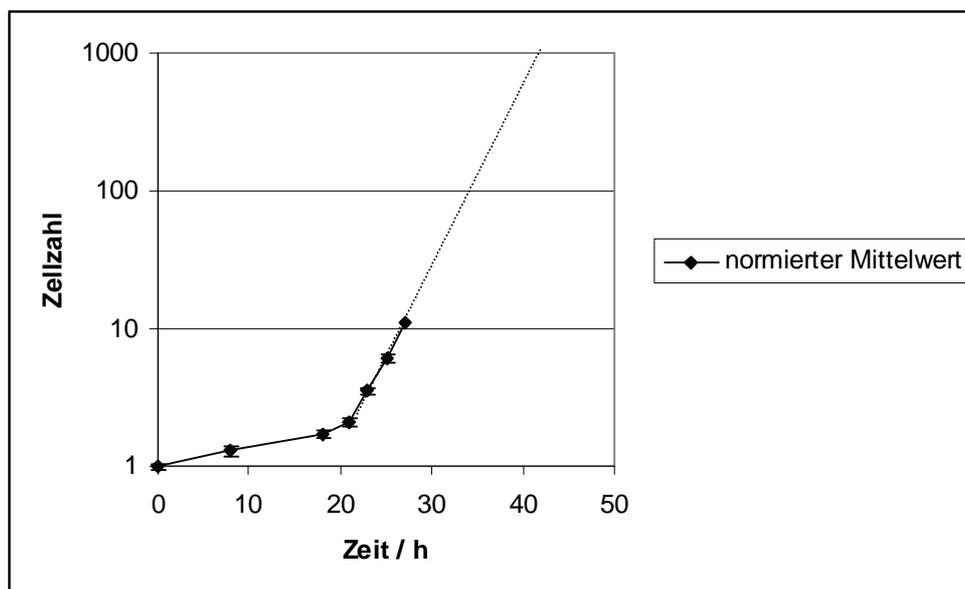


Abb. 8: Exponentielles Wachstum von *L. lindneri*. Halblogarithmische Auftragung mit einer Extrapolation bis 1000 Keimen.

Für *P. damnosus* ergaben sich folgende Zellzahlen:

Tab. 5: Ermittelte Zellzahlen von *P. damnosus*

Zeit / h	Reihe 1 / Zellzahl	Reihe 2 / Zellzahl	Reihe 3 / Zellzahl
0	21	13	21
8	36	31	33
18	46	43	48
21	82	94	101
23	160	169	200
25	252	279	314
27	521	469	611

Legt man nun eine Normierung an, so ergeben sich folgende Werte:

Tab. 6: Normierte Zellzahlen von *P. damnosus*

Zeit / h	Reihe 1 Zellzahl normiert	Reihe 2 Zellzahl normiert	Reihe 3 Zellzahl normiert	Mittelwert normierter Zellzahlen	Standard- abweichung
0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
8	1,7	2,4	1,6	1,9	0,4
18	2,2	3,3	2,3	2,6	0,6
21	3,9	7,2	4,8	5,3	1,7
23	7,6	13,0	9,5	10,0	2,7
25	12,0	21,5	15,0	16,1	4,8
27	24,8	36,1	29,1	30,0	5,7

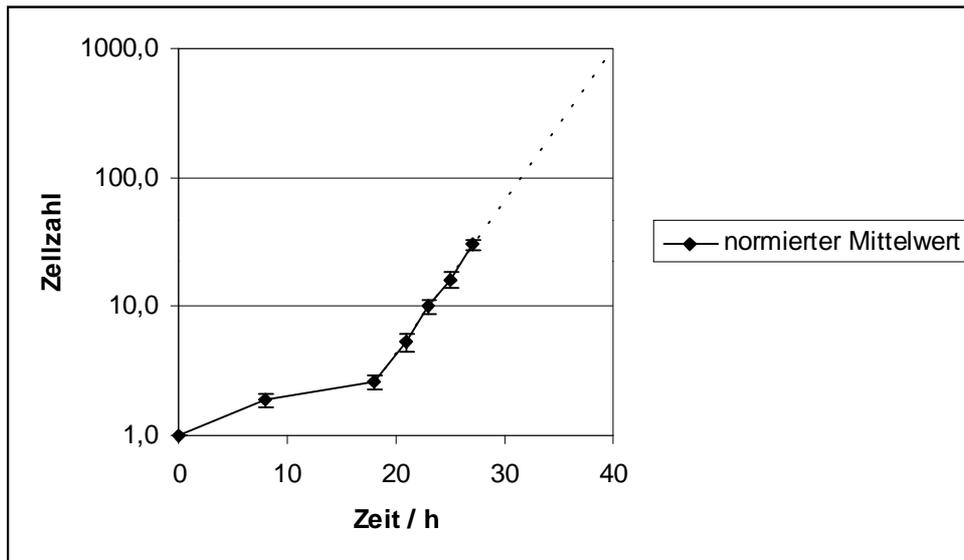


Abb. 9: Exponentielles Wachstum von *P. damnosus*

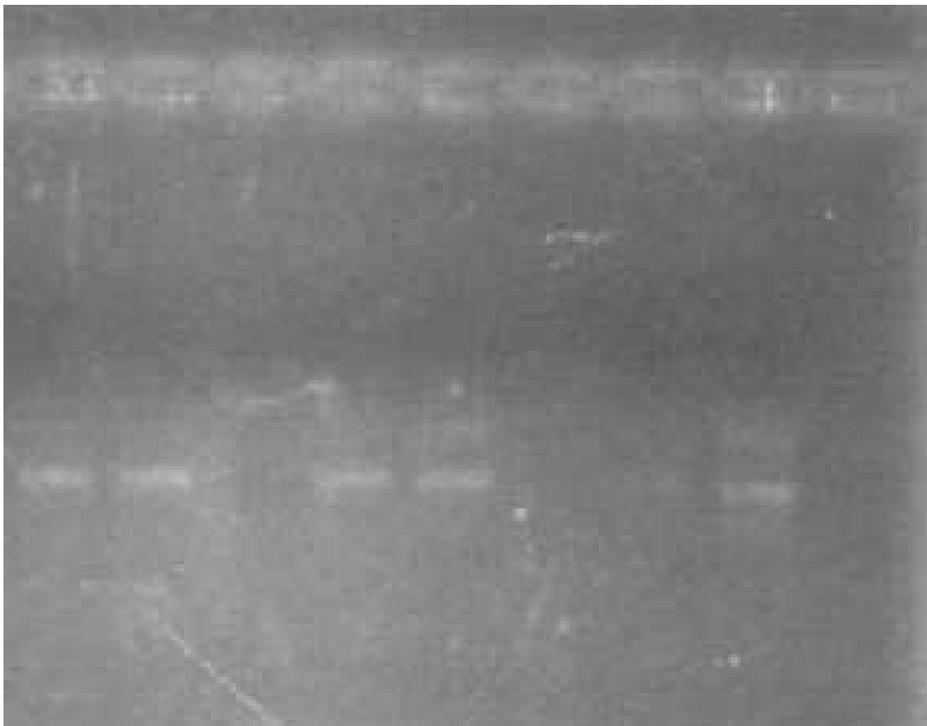
3.2.2 Überprüfung auf DNA-Freiheit von NBB-C

Bei der Untersuchung der verschiedenen Chargen von NBB-C stellte sich heraus, dass verschiedene Chargen ein positives PCR-Signal zeigen. Dies hängt wohl mit dem in NBB-C vorhandenen Würzeanteil zusammen. Es ist davon auszugehen, dass während der Produktion von NBB-C in dieser Würze verschiedene Mikroorganismen wachsen konnten, die am Ende durch Autoklavieren abgetötet wurden. Für die klassischen Verfahren genügt es vollkommen, ein solchermaßen autoklaviertes NBB-C zu nehmen, da die toten Würzebakterien keinen Einfluß mehr auf das Wachstum von bierschädlichen Bakterien ausüben. Da die PCR jedoch keinen Unterschied zwischen lebenden und toten Zellen machen kann, ist die hohe Zahl an falsch-positiven Ergebnissen bei dem Pilotprojekt in Brauerei A zu erklären.

3.2.3 Voranreicherung mit NBB-B

Bei den Untersuchungen der Voranreicherung mit NBB-B ergab sich eine extrem schlechte Nachweisgrenze, bzw. oftmals wurde keine DNA amplifiziert. Dies bedeutet, dass im NBB-B eine Substanz enthalten sein muß, die entweder den Zellaufschluß stört, oder die PCR negativ beeinflusst. Da sich dieses Phänomen bei verschiedenen Zellaufschlußverfahren zeigt, ist davon auszugehen, dass mit NBB-B die PCR gestört wird. Ein weiterer Störfaktor bei NBB-B ist der Eiweißanteil in dem Nährmedium. Da die Zellen durch Zentrifugation geerntet werden, lagert sich immer ein Eiweißmantel um die Zellen im Zentrifugenröhrchen. Um diesen Einfluß auszuschließen, wurde von der Firma Doehler-Eurocitus / Darmstadt ein membranfiltriertes NBB-B zur Verfügung gestellt. Leider störte auch dieses NBB-B die PCR und auf weitere Untersuchungen mit diesem Voranreicherungsmedium wurde daher verzichtet.

1 2 3 4 5 6 7 8 9



10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



Abb. 10: Ansatz von verschiedenen NBB-C-Chargen zur Überprüfung auf Keimfreiheit. Bahn 1-3: N 636 (interne Probenbezeichnung), Bahn 4-6: N 656, Bahn 7-9: N 669, Bahn 10-12: N 676, Bahn 13-15: N 697, Bahn 16-18: N 710. Bahn 19: Negativ-Kontrolle, Bahn 20: Positivkontrolle. Einsatzkonzentration von NBB-C innerhalb einer Charge 1% in der linken Bahn, 5% in der mittleren Bahn und 25% in der rechten Bahn



Abb. 11: Verdünnungsreihe von *L. brevis* in membranfiltriertem NBB-B. Bahn M: 1 kb-DNA Leiter, Bahn 1: $1 \cdot 10^2$ Zellen / Probe, Bahn 2: $1 \cdot 10^3$ Zellen / Probe, Bahn 3: $1 \cdot 10^4$ Zellen / Probe, Bahn 4: $1 \cdot 10^5$ Zellen / Probe

Es ist in Abb. 10 ersichtlich, dass die Chargen N 636, N 656, N 669, N 697 mit Fremd-DNA kontaminiert sind. Die Chargen N 710 und mit Abstrichen N 676 sind DNA-frei. Weiterhin ist zu sehen, dass eine zu hohe Konzentration an NBB-C den Zellaufschluß oder die PCR stört. Auch aus diesen Gründen ist auch eine Überdosierung von NBB-C zu vermeiden.

3.3 Diskussion der Voranreicherung

NBB-C in Bier stellt ein effektives und einfaches Voranreicherungsmedium dar. Sämtliche bierschädliche Bakterien wachsen sehr gut in diesem Medium an, zugleich werden unschädliche Keime unterdrückt. Aufgrund der bereits hohen Verbreitung von NBB-C in europäischen Brauereien, muß sich das Laborpersonal nicht mehr umstellen, bzw. kein neues Nährmedium bereitstellen. Ein Problem bei NBB-C stellt eine eventuell vorhandene Kontamination mit Fremd-DNA dar. Hier muß bereits produktionsseitig darauf geachtet werden, dass über den gesamten Herstellungsprozeß sterile Produktionsbedingungen herrschen, unabhängig von einem abschließenden Autoklavieren. Eine Kontamination mit Würzebakterien ist unbedingt zu vermeiden. Anwenderseitig ist es evident, jede neue Charge NBB-C auf eine Kontamination mit Fremd-DNA zu untersuchen. Denkbar wäre auch ein eigenes Produkt von „NBB-PCR“, bei der besonders auf die oben genannten Punkte geachtet wird. Eine Voranreicherung mit NBB-B ist bei den hier beschriebenen Verfahren nicht möglich, da Störsubstanzen für den Zellaufschluß oder die PCR im Produkt enthalten sind.

4 Zellaufschluß

Nach der Voranreicherung müssen die Zellen zuerst aufgeschlossen werden, damit die DNA frei liegt. Erst dann kann eine PCR stattfinden, da vorher die Taq-Polymerase und die NTPs keine Möglichkeit haben, an die DNA zu gelangen. Bei dem Zellaufschluß kann man zwischen einem Aufschluß mit Fällung und ohne Fällung unterscheiden. Bei einem Aufschluß mit Fällung liegt die DNA in Reinform vor und eventuell vorhandene Störsubstanzen sind abgetrennt worden. Für eine Fällung benötigt man wiederum einen zeit- und arbeitsaufwändigen Arbeitsschritt. Ohne diese Fällung werden auch Störsubstanzen zur PCR gebracht, welche die Sensitivität wieder herabsetzen können.

Der Zellaufschluß ist ein entscheidendes Merkmal für den PCR-Nachweis. Hier muß vor allem auf die Sensitivität der entwickelten Methode geachtet werden. Eine hohe Sensitivität des Zellaufschlusses bedeutet eine kurze Voranreicherungszeit, da weniger Zellen für einen sicheren Nachweis benötigt werden.

4.1 Material und Methoden

Beim Einengen der Zellen auf 1 ml Voranreicherungsmedium wurde ein Ansatz von 15 ml Voranreicherungsmedium 15 min bei 3300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in der noch anheftenden Restflüssigkeit resuspendiert (ca. 1 ml).

4.1.1 Aufschlußmethode nach Lewington

Bei dieser Methode werden die Zellen in einem ersten Schritt zuerst aufgeschlossen. Dazu werden zu dem Ansatz das Enzym Lysozym hinzugegeben, welches die Zellwände abbaut. Dann fügt man SDS hinzu, welches in die Zellwand eindringen kann. Durch die Zugabe von NaCl wird dieses SDS ausgefällt

und zerstört dadurch die Zellwand. Durch die anschließende Zentrifugation werden die unlöslichen Zellbestandteile entfernt, die DNA bleibt in Lösung. In einem zweiten Schritt wird die gelöste DNA mit Ethanol gefällt, indem ihre Hydrathülle durch Alkohol verdrängt wird. Die DNA fällt aus und schlägt sich durch Zentrifugieren an der Gefäßwand nieder. Nach dem Trocknen des Ethanols liegt die DNA in Reinform vor. Durch ein Lösen der DNA in einer geringen Menge H₂O wird die DNA aufkonzentriert und dadurch die Sensitivität des Zellaufschlusses erhöht. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, dass vorhandene Störsubstanzen durch Abtrennen der unlöslichen Bestandteile entfernt werden. Der Nachteil ist ein weiterer Arbeitsschritt, der Zeit kostet. Ebenfalls ist das Handling mit dieser Methode schwieriger und es werden mehr Chemikalien benötigt, als bei anderen Zellaufschlußverfahren. Durch die Benutzung von Chloroform-Isoamylalkohol fällt außerdem Sondermüll an, der teuer entsorgt werden muß.

Benutzte Chemikalien:

TES-Lösung:	50 mM Tris/HCl 50 mM NaCl 10 mM EDTA, pH 8,0
Lysozymlösung:	10 mg/ml Lysozym (Biomol, Hamburg) in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
SDS:	25 % Natriumdodecylsulfat (w/v)
NaCl	
Chisom:	Chloroform-Isoamylalkohol 24:1 (v/v)
Natriumacetat-EDTA-Lösung:	3 M Natriumacetat 10 mM EDTA, pH 7,0
Isopropanol	
70%iges Ethanol	

Die Zellen wurden durch Zentrifugation auf 1 ml Voranreicherungsmedium eingengt. Diese Probe wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 23000 g 5 min zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Das Pellet wurde mit 100 µl TES-Lösung suspendiert, mit 15 µl Lysozymlösung versetzt und zum

Zellaufschluß 30 min im Thermomixer bei 37 °C inkubiert.. Zur Vervollständigung der Lyse werden 40 µl des Detergens SDS zugegeben. Anschließend wird der Ansatz bei 65 °C 5 min inkubiert. Nach 10-sekündigem Whirlmixen werden 33 µl 5 M NaCl zugegeben und die Reaktionsgefäße eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach dem Auftauen und einem 10-sekündigen Whirlmixen wurden die Reaktionsgefäße bei 4 °C 20 min bei 12000 g zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Chisom vermischt. Durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 1000 g wurde die Phasentrennung beschleunigt. 100 µl der DNA-haltigen wäßrigen Phase wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die Ethanolfällung wurden 20 µl Natriumacetat-EDTA-Lösung und 400 µl Isopropanol zugegeben und die Reaktionsgefäße 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 23000 g 15 min zentrifugiert. Das Natriumacetat-EDTA-Isopropanolgemisch wurde abgeschüttet, 1 ml eiskaltes Ethanol zugegeben und nochmals 15 min 23000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Ethanol abgeschüttet und die Reaktionsgefäße bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wird in 10 µl H₂O suspendiert und 30 min bei Raumtemperatur gelöst (18).

4.1.2 Aufschlußmethode nach Bej

Hierbei werden die Zellen nur durch eine Lösung, die SDS und Proteinase K enthält, aufgeschlossen. SDS dringt in die Zellwand ein und erleichtert dadurch das Eindringen der Proteinase K. Proteinase K zerstört die Zellwand. In dem anschließenden Kochvorgang wird die Proteinase K inaktiviert, da sie sonst in der PCR die Taq-Polymerase zersetzen würde. SDS wird hier nicht wie im Zellaufschluß nach Lewington (siehe 4.1.1) ausgefällt und ist damit auch ein Bestandteil der Lösung, in der die PCR stattfindet.

Da kein Transfer der Lösung in ein anderes Reaktionsgefäß stattfindet, werden die Zellen hier quantitativ der PCR zugeführt (5).

Benutzte Chemikalien:

Lyse-Lösung: 20 mM Tris-HCl
50 mM KCl, pH 8,4
20 mM Dithiothreitol
1,8 µM SDS

Proteinase K: 10 mg/ml Proteinase K (Boehringer Mannheim)

Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt. Zu dem Pellet wurden 17,5 µl Lyse-Lösung und 0,5 µl Proteinase K gegeben. Der Ansatz wurde bei 37 °C 1,5 h inkubiert und dann 5 min gekocht, um die Proteinase K zu inaktivieren. Der gesamte Ansatz wurde zur PCR gegeben (5).

4.1.3 Direkter Zellaufschluß

Bei dieser Methode werden ähnlich wie beim Zellaufschluß nach Bej (4.1.2) die Zellen direkt mit Proteinase K aufgeschlossen. Da SDS wohl die PCR stört, wurde hier auf SDS und weitere Chemikalien verzichtet und der Zellaufschluß fand direkt in dem Puffer statt, in dem auch die PCR stattfindet. Die Proteinase K, die bei der PCR die Taq-Polymerase angreifen würde, wird durch einen Kochvorgang inaktiviert.

Benutzte Chemikalien:

10x-Puffer: 200 mM Tris-HCl
500 mM KCl, pH 8,4 (Life Technologies)

MgCl₂

Proteinase K: 10 mg/ml

Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt und mit 2,5 µl 10x-Puffer, 0,75 µl MgCl₂, 0,625 µl Proteinase K und 21,125 µl H₂O versetzt. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 60min wurde der Ansatz 10 min gekocht. 20 µl dieses Ansatzes wurden in die PCR überführt.

4.1.4 Chelex-Aufschluß

Chelex ist ein Harz, das Inhibitoren der PCR aus der Lösung entfernt. Chelex wird mittlerweile bei vielen DNA-Präparationen eingesetzt, wie z.B. bei einer DNA-Präparation aus menschlichem Speichel (28) oder aus Krabbenfleisch (19). Triton ist ein Detergenz, das aufgrund einer herabgesetzten Oberflächenspannung in die Membranen der Zellen eindringen kann, ähnlich wie SDS. Durch den anschließenden Kochvorgang wird zum einen die Proteinase K inaktiviert, und zum anderen durch das Triton die Zelle mechanisch aufgeschlossen. Eine Fällung findet bei dieser Präparation nicht statt, wodurch es auch keine DNA-Verluste durch diesen Schritt geben kann. Jedoch wird nicht der gesamte Ansatz zur PCR gegeben, so dass natürlicherweise hier ein Verlust an DNA auftritt.

Benutzte Chemikalien:

Chelex: 6 % (w/v) Chelex®-100 (Bio-Rad)
Proteinase K: 10 mg/ml (Boehringer Mannheim)
Triton: 1 % (v/v) Triton-X-100® (Merck)

50 ml der vorangereicherten Probe wurden mit 3300 g 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit der anhaftenden Flüssigkeit des Zentrifugenglases resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 23000 g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl Chelex und 1 µl Proteinase K resuspendiert und 10 min bei 56 °C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl Triton wurde der Ansatz 10 min gekocht. Nachdem der Ansatz 10 min in Eis gekühlt wurde, wurden die Reaktionsgefäße sofort 4 min mit 23000 g zentrifugiert. 2,5 µl des Überstandes wurden in die PCR eingesetzt.

4.1.5 Vergleich Chelex-Aufschluß und direkter Zellaufschluß

Die beiden besten Aufschlußverfahren wurden einem direkten Vergleich unterworfen. Dafür wurden aus einer Verdünnungsreihe jeweils ein Aliquot zum direkten Zellaufschluß und zum Chelex-Aufschluss gegeben. Der Aufschluß erfolgte dann wie in 4.1.3 und 4.1.4 beschrieben.

4.1.6 Optimierung des Chelex-Aufschlusses

Bei Chelex-Verfahren wurden folgende Parameter geändert:

- Chelex-Konzentration
 - a) 3 % (w/v)
 - b) 6 % (w/v)
 - c) 9 % (w/v)

- Triton-Konzentration
 - a) 1 % (v/v)
 - b) 3 % (v/v)

- Proteinase K-Konzentration
 - a) 0 µl Proteinase K (10 mg/ml)
 - b) 1 µl Proteinase K (10 mg/ml)
 - c) 2 µl Proteinase K (10 mg/ml)

- Inkubationen bei 37 ° C und 57 ° C

- Inkubationsdauer bei 57 ° C
 - a) 10 min
 - b) 30 min
 - c) 60 min

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Aufschlußmethode nach Lewington

Der Zellaufschluß nach Lewington erbrachte in der Sensitivität befriedigende Ergebnisse. Allerdings war der Zellaufschluß sehr kompliziert und zeitintensiv. Mit Isopropanol wurde auch ein Stoff benutzt, der Sondermüll darstellt. Aus diesen Gründen wurde dieses Verfahren wieder verworfen.

4.2.2 Aufschlußmethode nach Bej

Bei Vorversuchen mit diesem Zellaufschluß waren die Ergebnisse sehr unbefriedigend, so dass hier auch keine weiteren Optimierungsversuche stattfanden.

4.2.3 Direkter Zellaufschluß

Dieses Verfahren erfüllt alle Punkte, die ein Zellaufschlußverfahren mitbringen muß. Dieser Aufschluß ist in seiner Handhabung sehr einfach, trotzdem ist dieses Verfahren sehr sensitiv und schnell. Dieses Verfahren wurde daher mit dem Chelex-Aufschluß in der Sensitivität verglichen. Aufgrund der etwas höheren Sensitivität des Chelex-Aufschlusses wurde der direkte Zellaufschluß nicht weiter in der Arbeit benutzt.

4.2.4 Chelex-Aufschluß

Der Chelex-Aufschluß stellt das optimale Aufschlußverfahren in den Untersuchungen dar. Der Zellaufschluß kann innerhalb von 2 h für 24 Proben gesche-

hen, die Handhabung ist sehr einfach und dadurch auch durch Laborpersonal in den Brauereien durchzuführen. Es entsteht bei diesem Verfahren kein Sondermüll, der kostenintensiv entsorgt werden müßte.

4.2.5 Vergleich Chelex-Aufschluß und direkter Zellaufschluß

Der direkte Vergleich zwischen dem Chelex-Aufschluß und dem direkten Zellaufschluß zeigt, dass die Sensitivität des Chelex-Aufschlusses etwas höher ist, als die des direkten Zellaufschlusses (Abb. 12). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde entschieden, den Chelex-Aufschluß weiter zu optimieren (4.2.6).

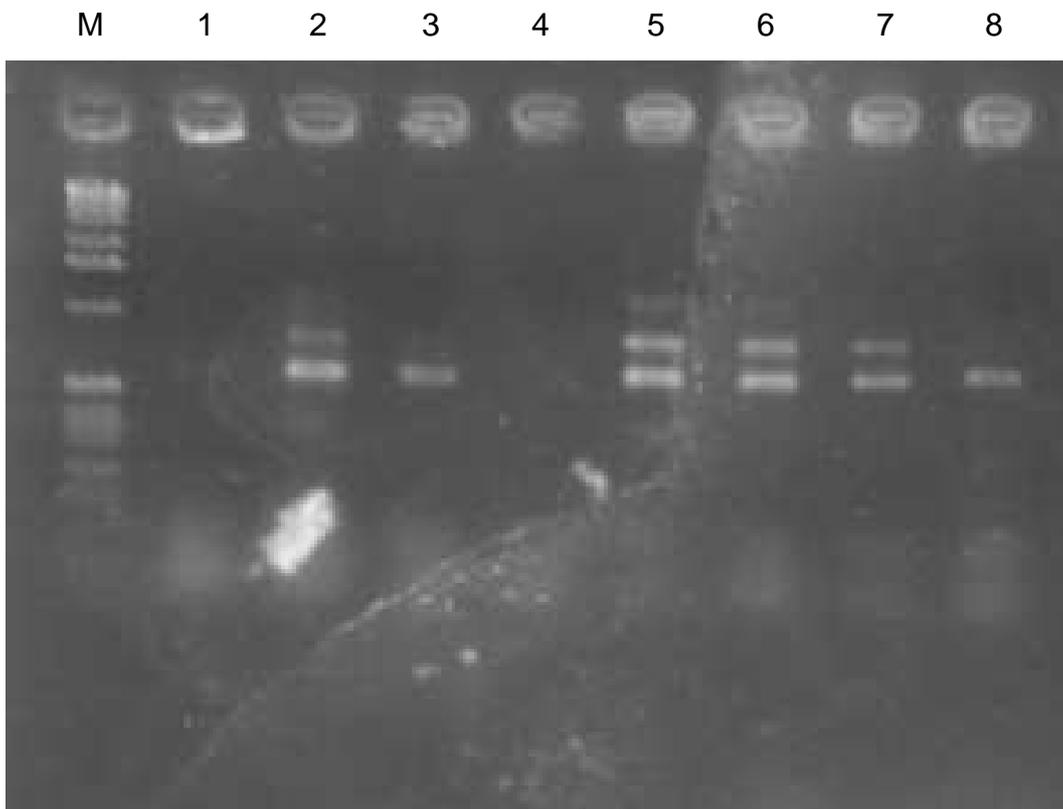


Abb. 12: Vergleich zwischen Chelex-Aufschluß und direktem Zellaufschluß bei einer Verdünnungsreihe von *L. brevis*. Bahn M: 1 kb DNA Ladder, Bahn 1-4: Verdünnungsreihe mit direktem Zellaufschluß, Bahn 5-8: Verdünnungsreihe mit Chelex-Aufschluß

4.2.6 Optimierung des Chelex-Aufschlusses

Bei einer Verdünnungsreihe von *L. brevis* wurde die Chelex-Konzentration zwischen 3 %, 6 % und 9 % variiert.

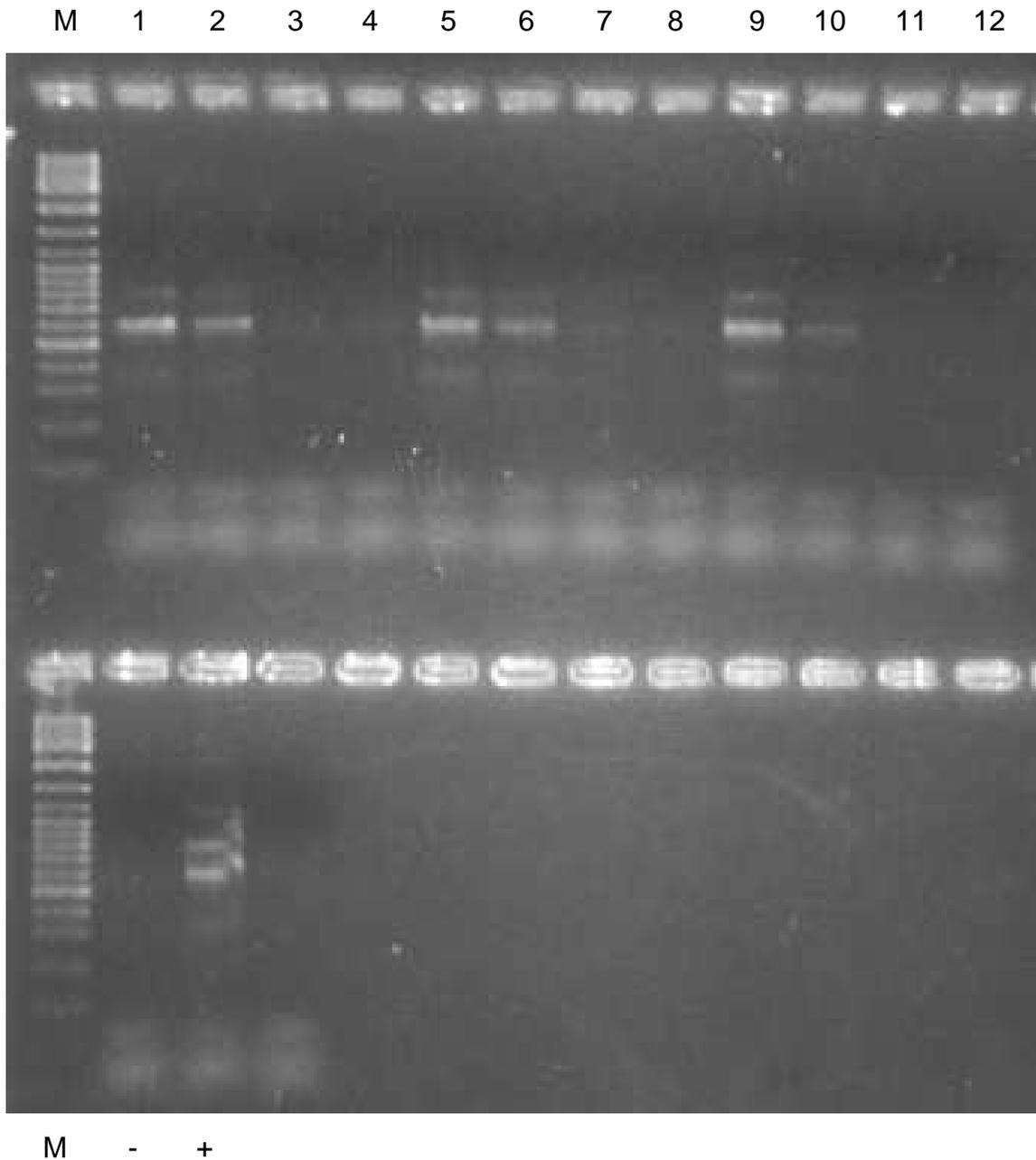


Abb. 13: Variation der Chelex-Konzentration bei einer Verdünnungsreihe von *L. brevis*. Bahn M: 1 kb DNA Ladder, Bahn 1-4: 3 % Chelex, Bahn 5-8: 6 % Chelex, Bahn 9-12: 9 % Chelex. -: Negativ-Kontrolle, +: Positiv-Kontrolle

Abb. 13 zeigt ein Optimum bei einer Chelex-Konzentration von 6 %. Eine geringere Chelex-Konzentration bindet nicht vollständig die Störsubstanzen in der PCR, eine zu hohe Konzentration an Chelex stört die PCR.

Es wurde eine Triton-Konzentration von 1 % und eine von 3 % verglichen.



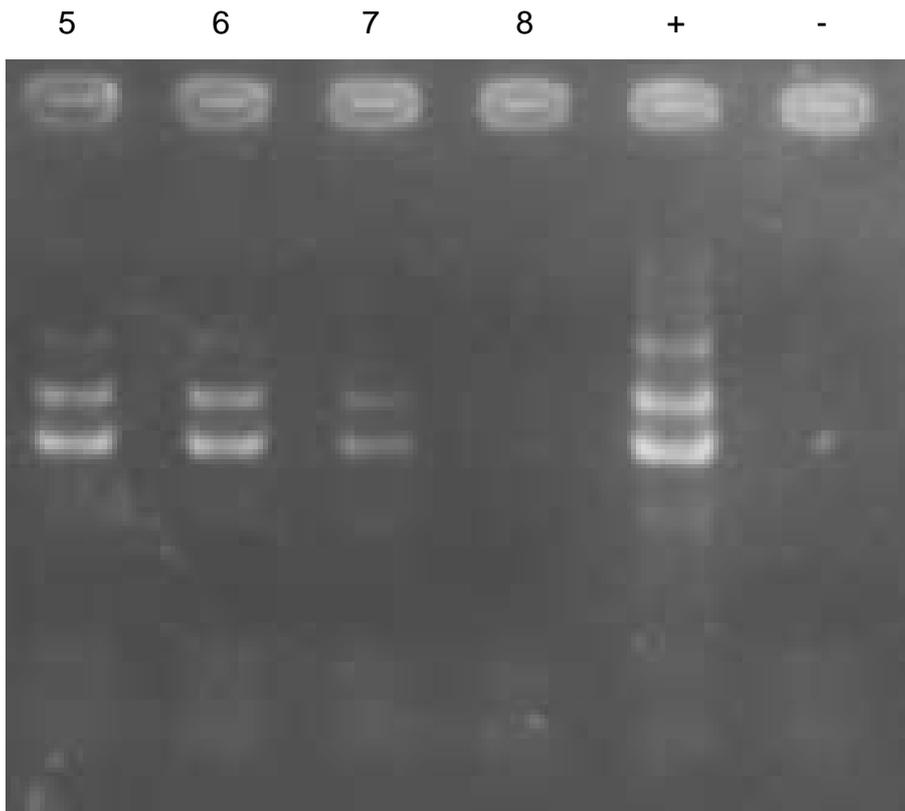
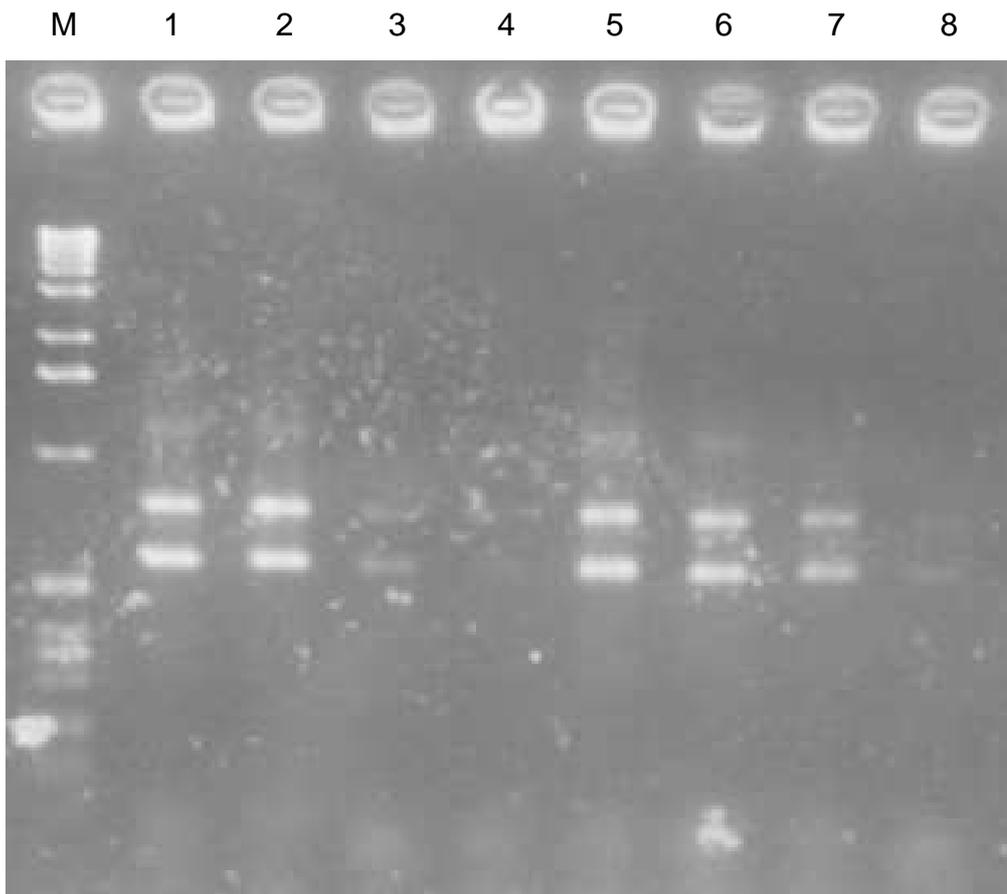


Abb. 14: Variation der Triton-Konzentration bei einer Verdünnungsreihe von *L. brevis*. Bahn 1-4: 1 % Triton, Bahn 5-8: 3 % Triton, +: Positiv-Kontrolle, -: Negativ-Kontrolle

In Abb. 14 ist eine höhere Sensitivität bei einer Konzentration von 1 % Triton zu erkennen. Die hängt wohl damit zusammen, dass zu hohe Konzentrationen an Triton die PCR stören können.

Die Menge an Proteinase K (10 mg/ml) wurde zwischen 0 µl, 1 µl und 2 µl verändert. Eine höhere Konzentration ist aus wirtschaftlichen Gründen abzulehnen.



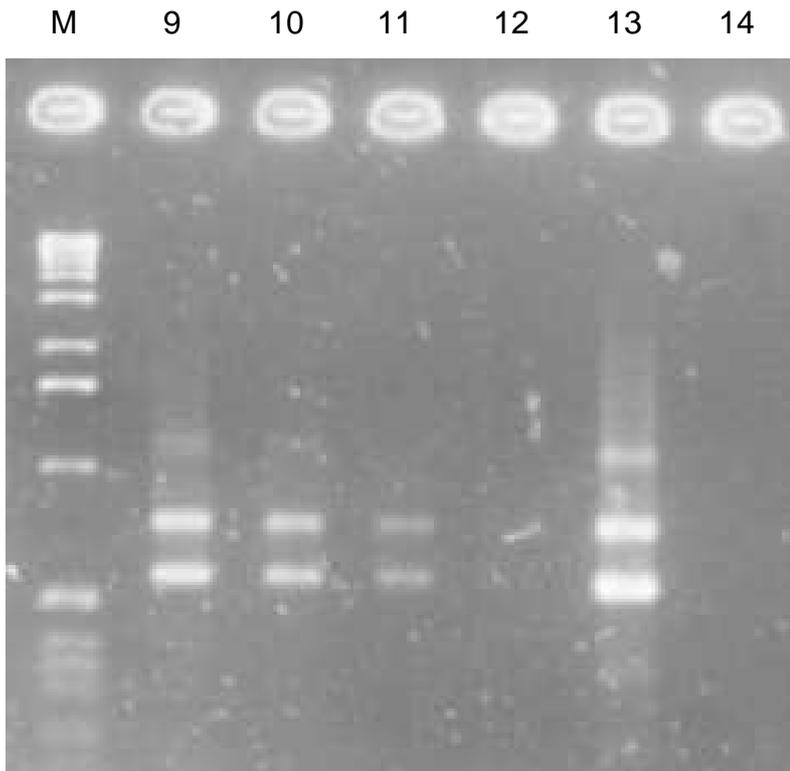


Abb. 15: Variation der Proteinase K-Menge bei einer Verdünnungsreihe von *L. brevis*. Bahn M: 1 kb DNA Ladder, Bahn 1-4: 2 µl Proteinase K, Bahn 5-8: 1 µl Proteinase K, Bahn 9-12: 0 µl Proteinase K, Bahn 13: Positiv-Kontrolle, Bahn 14: Negativ-Kontrolle

Abb. 15 zeigt zwischen einer Proteinase K-Menge von 2 µl und 1 µl keinen Unterschied. Bei einem Weglassen von Proteinase K verschlechtert sich etwas die Sensitivität. Daher ist die optimale Proteinase K-Menge 1 µl.

Es wurde untersucht, inwieweit sich die Dauer der Inkubation bei 57 °C auf die Sensitivität des Zellaufschlusses auswirkt. Dafür wurden Verdünnungsreihen 10 min, 30 min und 60 min bei 57 °C inkubiert.

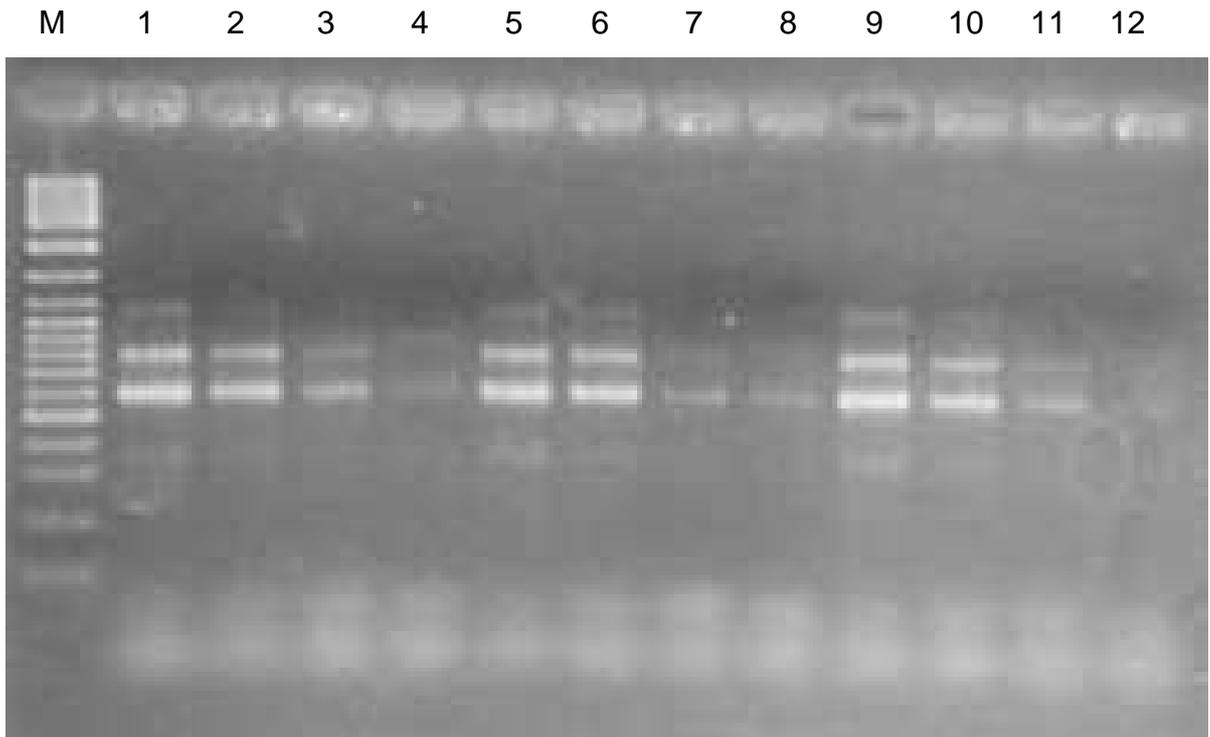


Abb. 16: Variation der Inkubationszeit bei 57 °C bei einer Verdünnungsreihe von *L. brevis*. Bahn M: 1 kb DNA Ladder, Bahn 1-4: 10 min, Bahn 5-8: 30 min, Bahn 9-12: 60 min

Wie in Abb. 16 zu sehen ist, ändert sich die Sensitivität bei einer gesteigerten Inkubationszeit bei 57 °C nicht. Da das Ziel ist, einen möglichst schnellen Zellaufschluß zu erreichen, genügt bereits eine Inkubation von 10 min.

4.2.7 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze beträgt für *Lactobacillus brevis*, *L. lindneri* und *Pediococcus damnosus* 1000 Keime pro 50 ml (Abb. 17).

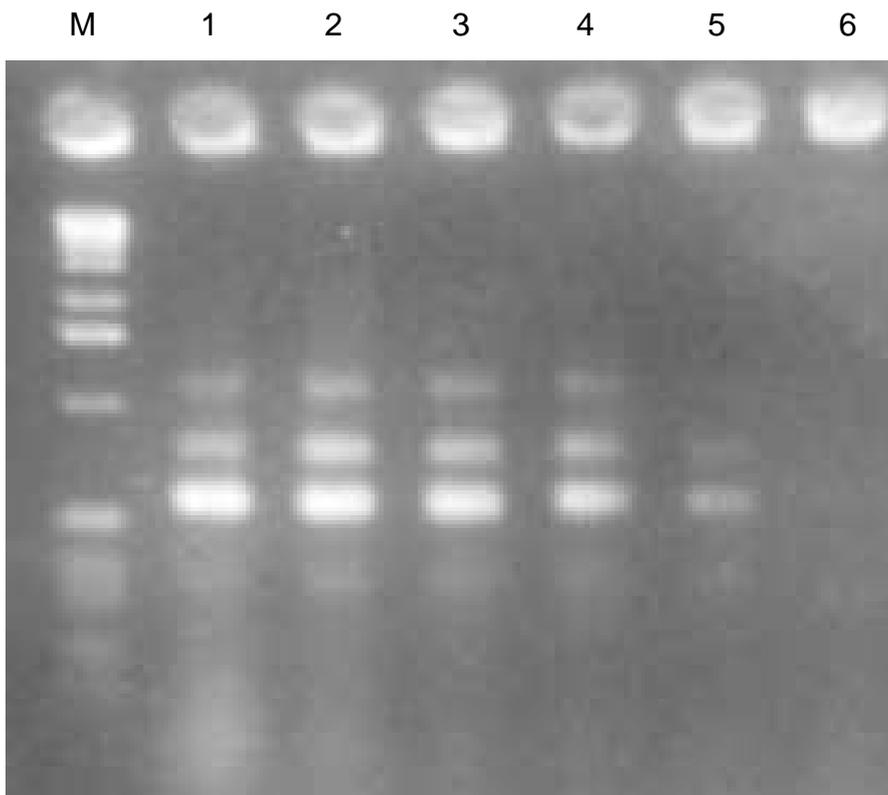


Abb. 17: Nachweisgrenze für *L. brevis*. Gesamtkeimzahl in 50 ml Voranreicherungsmedium (NBB-C, Bier, H₂O). Bahn M: 1 kb DNA Ladder, Bahn 1: $1 \cdot 10^7$ Zellen, Bahn 2: $1 \cdot 10^6$ Zellen, Bahn 3: $1 \cdot 10^5$ Zellen, Bahn 4: $1 \cdot 10^4$ Zellen, Bahn 5: $1 \cdot 10^3$ Zellen, Bahn 6: $1 \cdot 10^2$ Zellen



Abb. 18: Nachweisgrenze für *P. damnosus*. Gesamtkeimzahl in 50 ml Voranreicherungsmedium: Bahn 1: $5 \cdot 10^6$ Zellen, Bahn 2: $5 \cdot 10^5$ Zellen, Bahn 3: $5 \cdot 10^4$ Zellen, Bahn 4: $5 \cdot 10^3$ Zellen

4.2.8 Zellaufschluß mit NBB-B

Bei einer Voranreicherung mit NBB-B wurden bei dem folgenden Zellaufschluß sehr viel schlechtere Mindestkeimzahlen, die für einen Nachweis nötig sind, festgestellt, als mit NBB-C. Daher wurde auf eine weitere Untersuchung der Voranreicherung mit NBB-B verzichtet.

4.3 Diskussion des Zellaufschlusses

Die Sensitivität des Zellaufschlusses ist entscheidend für die Dauer der Voranreicherung und damit für die gesamte Dauer des Schnellnachweises. Als am geeignetsten hat sich der Chelex-Aufschluß (siehe 4.1.4) herausgestellt, der in diesen Untersuchungen optimiert wurde. Für die Optimierung wurden die Parameter Chelex-Konzentration, Triton-Konzentration, Proteinase-K-Konzentration, Inkubationszeit und Inkubationstemperatur variiert. Mit dem so optimierten Verfahren ist eine Sensitivität von 1000 Keimen/Probe ermittelt worden. Dies ist für einen Schnellnachweis innerhalb von 48 h ausreichend. Der zeitliche Aufwand von 2 h erlaubt einen Zellaufschluß und die PCR innerhalb eines Arbeitstages. Bei den anderen untersuchten Zellaufschlußverfahren gab es verschiedene Probleme. Entweder war die Sensitivität befriedigend, allerdings war das Handling zu kompliziert, wie beim Zellaufschluß nach Lewington, oder das Zellaufschlußverfahren war recht simpel, allerdings war die Sensitivität nicht sehr gut, wie beim Zellaufschluß nach Bej oder Nakagawa.

5 PCR

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Primer

Universelle Primer, die an der 16S rDNA und der 23S rDNA binden, wurden bei der PCR eingesetzt (Tab. 7). Primer 16SL ist ein selbst-konstruierter Primer, der an einem konservierten Teil der 16S rDNA bindet. Die Sequenz wurde durch Sequenzvergleich bestimmt. Die amplifizierte DNA zwischen der 16S rDNA und der 23S rDNA ist aufgrund der ITS hochvariabel (4, 11, 27). Alle Primer wurden von Metabion / München synthetisiert.

Tab. 7: Sequenzen der benutzten Primer

Primer	Sequenz (5'→ 3')	Position	Orientierung	Referenz
16SL	TGYAGGCTGCAACTCGCCT	16S	vorwärts	selbst konstruiert
23-1B(T)	GGGTTCCCCCATTCGGA	23S	rückwärts	(29)

5.1.2 PCR-Bedingungen und DNA-Analyse

Die PCR wurden mit dem GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer) durchgeführt. Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt. Der Ansatz enthält 1x Puffer (10x Puffer enthält 200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl)(Life Technologies), 1,5 mM MgCl₂ (Gibco BRL), 0,2 mM NTP (Peqlab), 0,1 µmol jeden Primers, 1,5 units Taq-Polymerase und 2,5 µl DNA. Die Ansätze wurden bei 94 °C 7min denaturiert, dann folgten 30 Amplifikationszyklen, die

1 min bei 94 ° C, 1 min bei 52 ° C und 1 min bei 72 ° C durchliefen. Die Reaktion wurde vervollständigt mit einer 10minütigen Extension bei 72 ° C.

Da nur mit einem Primerpaar gearbeitet wurde, und auch die übrigen Reagenzien bis auf die DNA die selben waren, war es möglich, mit einem Mastermix zu arbeiten. Unter einem Mastermix versteht man, alle Reagenzien außer der DNA in einem Reaktionsgefäß zu mischen und daraus die entsprechende Menge (hier 22,5 µl) in die PCR-Reaktionsgefäße zu geben. Anschließend wird die DNA dazugegeben.

5.1.3 Detektion der amplifizierten DNA

Die PCR-Produkte wurden mit Gelelektrophorese detektiert. Die DNA wurde in einem 2 %igen Agarose-Gel getrennt. Das Gel wurde dann mit Ethidium-Bromid (0,1 % v/v) für 30 min gefärbt und die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Hierbei lagert sich das Ethidium-Bromid an die doppelsträngige DNA an. Da Ethidium-Bromid fluoresziert, ist eine Detektion unter UV-Licht möglich. Für die Dokumentation wurde ein Foto gemacht.

5.1.4 Identifizierung der amplifizierten DNA

Da die amplifizierte DNA variabel ist, wird eine Identifizierung durch einen Restriktionsenzymverdau durchgeführt (vgl. 2.3) (10). Um die geeigneten Restriktionsenzyme für den Restriktionsverdau zu bestimmen, wurde das jeweils kürzeste amplifizierte DNA-Fragment (Short-ITS) mit Hilfe eines Kits (Qiagen) aus dem Agarose-Gel eluiert und die Sequenz durch Medigenomix / München ermittelt. Die Sequenz für die Short-ITS für *L. brevis*, *L. lindneri* und *P. damnosus* lauten:

L. brevis:

TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC GGCCTTGTA
 CACACCGCCC GTCACACCAT GAGAGTTTGT AACACCCAAA GCCGGTGAGA
 TAACCTTCGG GAGTCAGCCG TCTAAGGTGG GACAGATGAT TAGGGTGAAG
 TCGTAACAAG GTAGCCGTAG GAGAACCTGC GGCTGGATCA CCTCCTTTCT
 AAGGAATATA CGGAGGCTAC ACATACTTGT TGAAACAATG TTCAGTTTTG
 AGGGGCTTAC CTCTCTAAAC TTGTTCTTTG AAAACTAGAT ATTATCAATT
 ATTTTCCTTT AATTATTAAG ATAATTAAAC CGAGAAACAA CTGCTTGTTT
 TTGAGTTTTT TAATTAGTTT ATCGCTAATA CTCAATTAAT TTGACGATCA
 CGAAGTGACC GTTAGGTAA GTTATGAAGG GCGCATGGTG GATGCCTTGG
 TACTAGGAGC CGATGAAGGA CGGGACTAAC ACCGATATGC TTCGGGGAGC
 TGTACGT

L. lindneri:

TGAAGTTGGA ATCCGCTAGT AATCGTGGAT CAGCATGCCA CGGTGAATAC
 GTTCCCAGGT CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA
 CCCAAAGTCG GTTGGATAAC CTTTACGGAG TCCGCCGCCT AAGGTGGGAC
 AGATGATTAG GGTGAAGTCG TAACAAGGTA GCCGTAGGAG AACCTGCGGC
 TGGATCACCT CCTTTCTAAG GAAAAATTCG GAACTTACAC CGATCAAAAT
 CTTGCTCAGT TTTGAGAGTA TCTACTCTCA GACTTTGTTC TTTGAAAAC
 AGATAATATT ATTTTCTGTA AAAATTATAT TTTTAATATA ATTTCAACCG
 AGAAATAACC ATTGTGTTAT TTGAGTTTTT TAAATTAATA GTTTAATCGC
 TAAACTCAAT AATTTATAAT CCGAAGGATT ATAGGTTAAG TTAAAAAGGG
 CGCATGGTGA ATGCCTTGGT ACTAGGAGCC GATGAAGGAC GGAACTAACA
 CCGATATGCT TCGGGGAGCT GTACGTAAGC TTT

P. damnosus:

GTAATCGCGG ATCAGCATGC CGCGGTGAAT ACGTTCCCGG GCCTTGTACA
 CACCGCCCGT CACACCATGA GAGTTTGTA CACCCAAAGC CGGTGGAGTA
 ACCTTCGGGA GCTAGCCGTC TAAGGTGGGA CAGATGATTG GGGTGAAGTC
 GTAACAAGGT AGCCGTAGGA GAACCTGCGG CTGGATCACC TCCTTTCTAA
 GGATATTTAG AAACGGAAAC CTACACATAT GTCGAAACTT TGTTTAGTTT
 TGAGAGGTCT ACTCTCAAAA TTTGTTCTTT GAAAACATAA TAATATCGAA
 AAATTTTCTA ATTTTAATTA TCAGATAATT AAACCGAGAA CATTGCGTTT
 TATAGAGTTT TAAAACAAGA TTAGTTCAA AATAATCGCT AAACCTCAAAA
 CCACTTTATC TTTGATAAAG TTAGGTAAAG TTATAAAGGG CGCATGGTGA
 ATGCCTTGGT ACTAGGAGCC GATGAAGGAC GGGACTAACA CCGATATGCT

TCGGGGAGCT GTAAGTAAGC TTTGATCCGG AGATTTC CGA ATGGGGG

Nach Vergleich dieser Sequenzen mit den Schnittstellen von Restriktionsenzymen wurden zwei Restriktionsenzyme ausgewählt: *Dde I* und *Sau3a I* (beide Boehringer Mannheim). Bei der Auswahl der Restriktionsenzyme wurde darauf geachtet, dass jedes Enzym in der ITS eines jeden Keimes mindestens einmal schneidet und dass die erwarteten Banden sich gut unterscheiden lassen.

20 µl des PCR-Produktes wurden mit 10 Units Restriktionsendonuklease bei 37 ° C 90min verdaut.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Primer

Die universellen Primer 16 SL und 23 1-B(T) wurden verwendet. Diese Primer binden an alle getesteten bierschädlichen Bakterien (Abb. 19). Eine biologische Säuerung lieferte keine falsch-negativen Befunde. Da nach der biologischen Säuerung ein Kochen der DNA im sauren Bereich stattfindet, ist davon auszugehen, dass dort die DNA von *L. amylovorus* zerstört wurde.

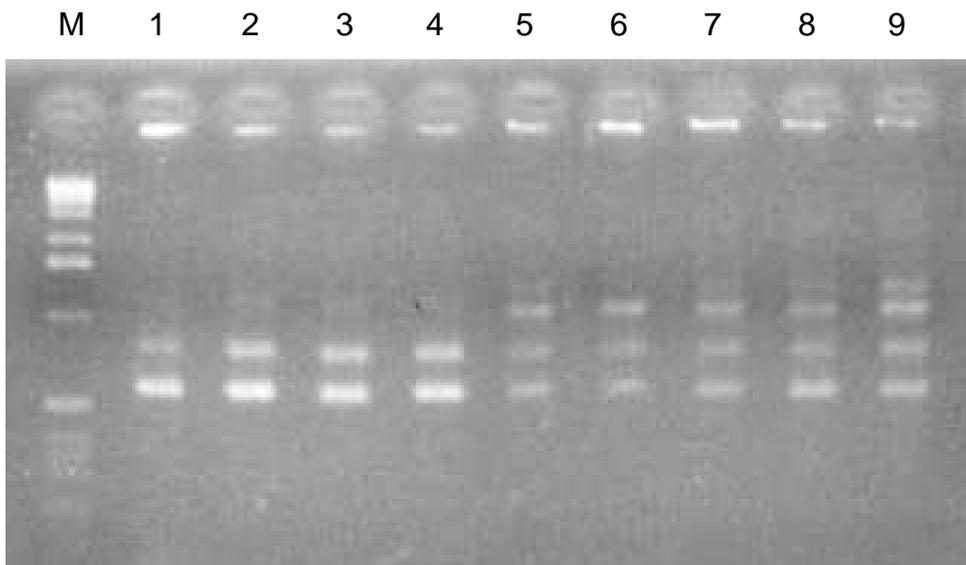


Abb. 19: Signale von bierschädlichen Bakterien bei Benutzung von universellen Primern 16SL und 23-1 B(T). Bahn M: 1 kb DNA Ladder, Bahn 1: *Lactobacillus brevis* (L32), Bahn 2: *L. brevis* (L43), Bahn 3: *L. frigidus* (L96), Bahn 4: *L. frigidus* (L150/2), Bahn 5: *L. lindneri* (L2), Bahn 6: *L. lindneri* (L7), Bahn 7: *L. lindneri* (L23), Bahn 8: *L. lindneri* (L748), Bahn 9: *L. lindneri* (L771)

5.2.2 Identifizierung der amplifizierten DNA

Aufgrund der bekannten Sequenz konnte man ein zu erwartendes Bild des Restriktionsenzymverdaus berechnen. Dafür berechnete man die Länge der DNA-Fragmente, die durch einen Restriktionsenzymverdaus entstanden, und trug diese Längen in ein Diagramm ein.

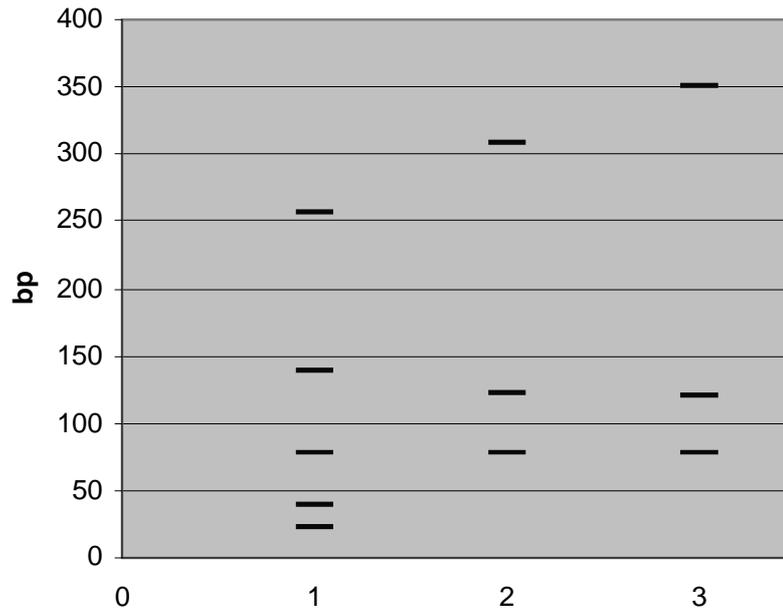


Abb. 20: Erwartetes Bandenmuster bei einem Restriktionsenzymverdau der short-ITS mit *Dde I*. Bahn 1: *L. brevis*, Bahn 2: *L. lindneri*, Bahn 3: *P. damnosus*

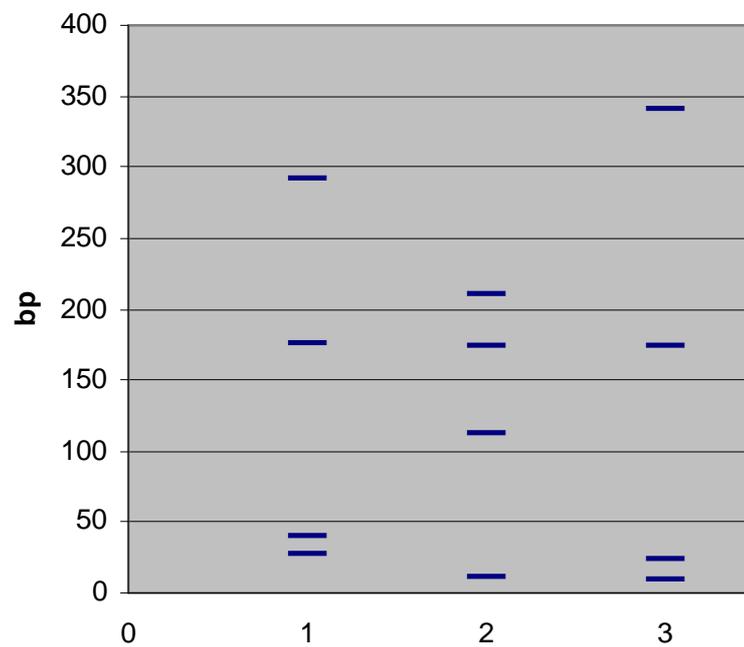


Abb. 21: Erwartetes Bandenmuster bei einem Restriktionsenzymverdau der short-ITS mit *Sau3a I*. Bahn 1: *L. brevis*, Bahn 2: *L. lindneri*, Bahn 3: *P. damnosus*

Da die amplifizierte DNA zwischen den 16SL und 23 1-B(T) Primern variabel ist, kann man mit Hilfe von Restriktionsenzymen eine Unterscheidung der amplifizierten DNA treffen.

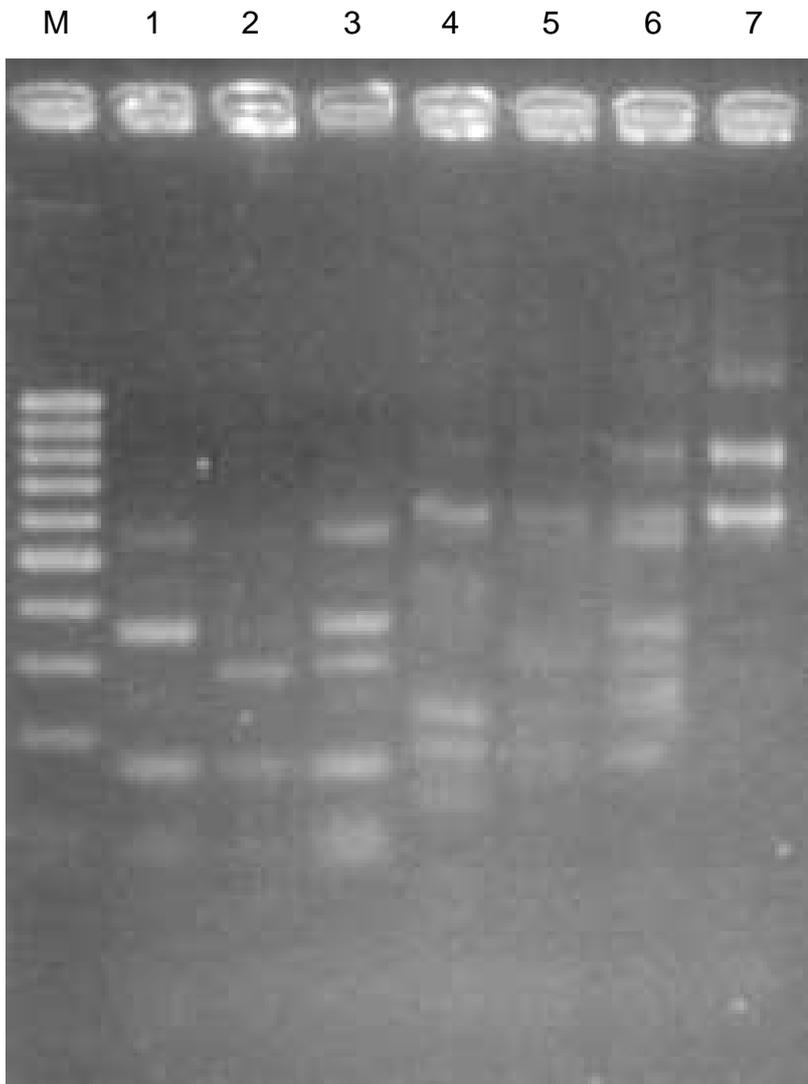


Abb. 22: Restriktionsenzymverdau mit *Dde I* und *Sau3a I*. Bahn M: 100 bp DNA Ladder, Bahn 1: *L. brevis* verdaut mit *Dde I*, Bahn 2: *L. lindneri* verdaut mit *Dde I*, Bahn 3: *P. damnosus* verdaut mit *Dde I*, Bahn 4: *L. brevis* verdaut mit *Sau3a I*, Bahn 5: *L. lindneri* verdaut mit *Sau3a I*, Bahn 6: *P. damnosus* verdaut mit *Sau3a I*, Bahn 7: *L. brevis* unverdaut

Bei einem Vergleich zwischen *Sau3a I* und *Dde I* zeigte sich ein sehr viel klareres Bild bei *Dde I* als bei *Sau3a I* (Abb. 22). Außerdem war zu sehen, dass *Sau3a I* die amplifizierte DNA nicht vollständig geschnitten hat (Abb. 22, Bahn 4-6). Wenn man die Salzbedingungen eines PCR-Puffers mit den zu den Restriktionsenzymen dazugehörigen Puffern vergleicht, so sieht man, dass sich aufgrund dieser Bedingungen *Dde I* besser eignet als *Sau3a I*.

Tab. 8: Salzbedingungen des PCR-Puffers und der zu den Restriktionsenzymen gehörenden Enzymen

	PCR-Puffer	H (<i>Dde I</i>)	A (<i>Sau 3a I</i>)
Tris-HCl	20 mM	50 mM	-
Tris-Acetat	-	-	33 mM
MgCl ₂	1,5 mM	10 mM	-
Kalium-Acetat	-	-	66 mM
NaCl	-	100 mM	-
KCl	50 mM	-	-
Dithioerythritol (DTE)	-	1 mM	-
Dithiothreitol (DTT)	-	-	0,5 mM
pH	8,4	7,5	7,9

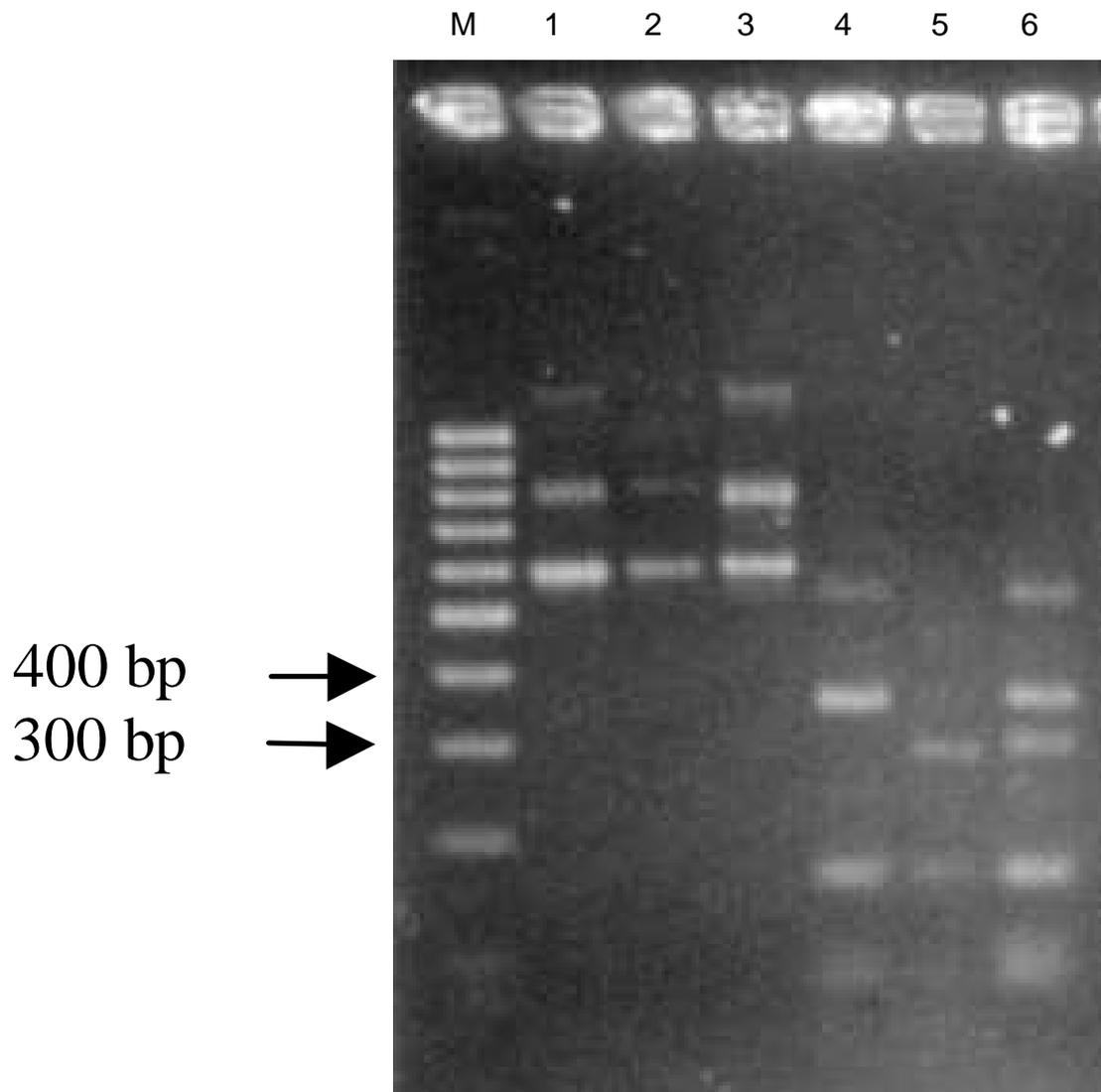


Abb. 23: Restriktionsenzymverdau mit *Dde I* der amplifizierten DNA. Bahn M: 100 bp DNA Ladder, Bahn 1: *L. brevis* ohne Verdau, Bahn 2: *L. lindneri* ohne Verdau, Bahn 3: *P. damnosus* ohne Verdau, Bahn 4: *L. brevis* mit Verdau, Bahn 5: *L. lindneri* mit Verdau, Bahn 6: *P. damnosus* mit Verdau

Das von den Vorhersagen abweichende Bild lässt sich damit erklären, dass nicht nur die kürzeste Bande, von der die Sequenz bestimmt wurde, geschnitten wurde, sondern auch die längeren Banden. Die Sequenz dieser Banden ist unbekannt und kann daher zu anderen Schnittmuster führen, als vorhergesagt. Im Bereich von 380 bp und 300 bp zeigt sich ein klarer Unterschied zwischen *L. brevis*, *L. lindneri* und *P. damnosus*. *L. brevis* zeigt bei 380 bp eine Bande, jedoch keine bei 300 bp. *L. lindneri* hingegen zeigt eine Bande bei 300 bp, aber

keine bei 380 bp. Beim Bandenmuster *P. damnosus* zeigt sich sowohl bei 300 bp als auch bei 380 bp eine Bande.

5.3 Diskussion der PCR

Die Primer 16SL und 23-1(B)-T amplifizieren die ITS aller Prokaryonten, daher auch die ITS der bierschädlichen Keime. Eine Unterscheidung anhand der amplifizierten DNA-Fragmente ist nicht möglich. Durch einen Restriktionsenzymverdau kann man die DNA von *L. brevis*, *L. lindneri* und *P. damnosus* eindeutig unterscheiden. Eine Eluierung der DNA-Fragmente aus dem Agarose-Gel wurde versucht, jedoch benötigt man eine sehr viel größere Menge an DNA (PCR-Ansatz 100 µl) als bei einem Schnellnachweis zur Verfügung steht (25 µl). So müßte die eluierte DNA einer weiteren PCR unterworfen werden, die jedoch wieder sehr zeit- und kostenaufwändig wäre. Daher wird das Restriktionsenzym direkt zu dem PCR-Ansatz gegeben, was für *Sau3a I* zu schlechteren Reaktionsbedingungen führt und ein Verdau mit diesem Enzym nicht ermöglicht. Die Pufferbedingungen des PCR-Puffers und des Puffers von *Dde I* sind ähnlich und ein Verdau ist mit diesem Enzym möglich. Eine Unterscheidung nach dem Restriktionsenzymverdau ist mit *Dde I* zwischen *L. brevis*, *L. lindneri* und *P. damnosus* möglich.

6 Überprüfung der Verfahren unter Praxisbedingungen und Pilotprojekte

6.1 Material und Methoden

6.1.1 Überprüfung der Verfahren unter Praxisbedingungen

Zur Ermittlung der Zuverlässigkeit des direkten Zellaufschlusses (vgl. 4.1.3) wurden Bierproben mit H₂O und NBB-C (vgl. 3.1.2) für eine Voranreicherung (Gesamtvolumen 15 ml) vorbereitet, dann wurden entweder 0, 1.000 oder 10.000 Zellen / Probe hinzugefügt mit jeweils den Keimen *L. brevis* und *P. damnosus*. Diese Probe wurde nun sofort einem Zellaufschluß und der PCR unterworfen, und die Ergebnisse mit den vorher unbekanntem Kontaminationen verglichen.

6.1.2 Pilotprojekte in den Brauereien A und B

Die Pilotprojekte wurden direkt vor Ort in den Brauereien durchgeführt. Bei den Pilotprojekten wurden parallel Proben für die normale Betriebskontrolle gezogen und für einen Schnellnachweis mit PCR. Die Proben aus dem Filtratbereich der Brauerei wurden einer Voranreicherung mit NBB-C (vgl. 3.1.2) unterworfen. Nach mindestens 40 h wurden von den Proben 15 ml dem Chelex-Aufschluß (vgl. 4.1.4) und der PCR zugeführt, 1 ml wurde in 10 ml NBB-B gegeben und eine Woche bei 28 ° C inkubiert.

6.1.3 Pilotprojekt in der Brauerei C

Hierzu wurde ein älteres Chelex-Aufschlußverfahren benutzt. Dazu wurden 15 ml Voranreicherungsmedium bei 4.500 U/min zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Nun wurden zu dem getrockneten Pellet 30 µl H₂O gegeben. Insgesamt 49 µl wurden in ein Reaktionsgefäß übergeführt, mit 50 µl Chelex (6%, w/w) und 1 µl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und anschließend 1 h bei 57 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz 10min gekocht und nachdem der Ansatz auf Eis abgekühlt wurde, 3 min zentrifugiert. 2,5 µl des Überstandes wurden in die PCR eingesetzt. Zusätzlich wurden einige Proben mit Spuren von *L. brevis* oder *P. damnosus* versetzt.

6.2 Ergebnisse

6.2.1 Überprüfung der Verfahren unter Praxisbedingungen

Der Vergleich zwischen den Banden und den tatsächlichen Kontaminationen brachte folgende Ergebnisse:

Lfd. Nummer	Keimzahl/Probe	Keimart	Signal
1	1.000	<i>L. brevis</i>	schwach
13	1.000	<i>L. brevis</i>	schwach
15	1.000	<i>L. brevis</i>	schwach
16	1.000	<i>L. brevis</i>	schwach
21	1.000	<i>L. brevis</i>	schwach
28	1.000	<i>L. brevis</i>	schwach
30	1.000	<i>L. brevis</i>	kein
39	1.000	<i>L. brevis</i>	schwach
45	1.000	<i>L. brevis</i>	kein

46	1.000	<i>L. brevis</i>	kein
52	1.000	<i>L. brevis</i>	schwach
53	1.000	<i>L. brevis</i>	kein
68	1.000	<i>L. brevis</i>	kein
75	1.000	<i>L. brevis</i>	kein
2	10.000	<i>L. brevis</i>	deutlich
3	10.000	<i>L. brevis</i>	deutlich
9	10.000	<i>L. brevis</i>	deutlich
18	10.000	<i>L. brevis</i>	deutlich
19	10.000	<i>L. brevis</i>	deutlich
26	10.000	<i>L. brevis</i>	deutlich
31	10.000	<i>L. brevis</i>	deutlich
34	10.000	<i>L. brevis</i>	deutlich
41	10.000	<i>L. brevis</i>	deutlich
43	10.000	<i>L. brevis</i>	deutlich
51	10.000	<i>L. brevis</i>	deutlich
56	10.000	<i>L. brevis</i>	deutlich
59	10.000	<i>L. brevis</i>	deutlich
65	10.000	<i>L. brevis</i>	deutlich
70	10.000	<i>L. brevis</i>	kein
4	1.000	<i>P. damnosus</i>	schwach
7	1.000	<i>P. damnosus</i>	schwach
12	1.000	<i>P. damnosus</i>	schwach
27	1.000	<i>P. damnosus</i>	schwach
42	1.000	<i>P. damnosus</i>	kein
55	1.000	<i>P. damnosus</i>	kein
57	1.000	<i>P. damnosus</i>	kein
58	1.000	<i>P. damnosus</i>	schwach
71	1.000	<i>P. damnosus</i>	kein
77	1.000	<i>P. damnosus</i>	kein
80	1.000	<i>P. damnosus</i>	kein
89	1.000	<i>P. damnosus</i>	kein
93	1.000	<i>P. damnosus</i>	kein

95	1.000	<i>P. damnosus</i>	kein
99	1.000	<i>P. damnosus</i>	kein
8	10.000	<i>P. damnosus</i>	deutlich
10	10.000	<i>P. damnosus</i>	deutlich
11	10.000	<i>P. damnosus</i>	schwach
17	10.000	<i>P. damnosus</i>	deutlich
33	10.000	<i>P. damnosus</i>	deutlich
37	10.000	<i>P. damnosus</i>	deutlich
44	10.000	<i>P. damnosus</i>	deutlich
50	10.000	<i>P. damnosus</i>	deutlich
54	10.000	<i>P. damnosus</i>	deutlich
60	10.000	<i>P. damnosus</i>	deutlich
69	10.000	<i>P. damnosus</i>	kein
73	10.000	<i>P. damnosus</i>	schwach
88	10.000	<i>P. damnosus</i>	kein
96	10.000	<i>P. damnosus</i>	schwach
100	10.000	<i>P. damnosus</i>	schwach
5	0	-	kein
6	0	-	kein
14	0	-	schwach
20	0	-	kein
22	0	-	kein
23	0	-	kein
24	0	-	kein
25	0	-	deutlich
29	0	-	kein
32	0	-	kein
35	0	-	kein
36	0	-	kein
40	0	-	kein
47	0	-	kein
48	0	-	kein
49	0	-	kein

61	0	-	kein
62	0	-	kein
63	0	-	deutlich
64	0	-	kein
66	0	-	kein
67	0	-	kein
72	0	-	kein
74	0	-	kein
76	0	-	kein
78	0	-	kein
79	0	-	kein
81	0	-	kein
82	0	-	kein
83	0	-	kein
84	0	-	kein
85	0	-	kein
86	0	-	kein
87	0	-	kein
90	0	-	kein
91	0	-	kein
92	0	-	kein
94	0	-	kein
97	0	-	kein
98	0	-	kein

Eine Auswertung ergab folgende Trefferquote:

L. brevis, 1.000 Keime, 14 Proben

8 Proben positiv = 57 %

6 Proben negativ = 43 %

L. brevis, 10.000 Keime, 15 Proben

14 Proben positiv = 93 %

1 Probe negativ = 7 %

P. damnosus, 1.000 Keime, 15 Proben

5 Proben positiv = 33 %

10 Proben negativ = 67 %

P. damnosus, 10.000, 15 Proben

13 Proben positiv = 87 %

2 Proben negativ = 13 %

Ohne Keime, 40 Proben

3 Proben positiv = 7 %

37 Proben negativ = 93 %

Aufgeteilt zwischen den Proben mit 1.000 Keimen / Probe und denen mit 10.000 Keimen / Probe ergibt sich folgendes Bild:

1.000 Zellen, 29 Proben

13 Proben positiv = 45 %

16 Proben negativ = 55 %

10.000 Zellen, 30 Proben

27 Proben positiv = 90 %

3 Proben negativ = 10 %

Man kann auch zwischen *L. brevis* und *P. damnosus* unterscheiden:

L. brevis, 29 Proben

22 Proben positiv = 76 %

7 Proben negativ = 24 %

P. damnosus, 30 Proben

18 positiv = 60 %

12 negativ = 40 %

Wie erwartet sieht man, dass 10.000 Keime / Probe sehr viel leichter zu entdecken sind, als eine Zellzahl von 1.000 Keimen / Probe. Hier stößt der direkte Zellaufschluß an seine Grenzen. *L. brevis* ist leichter zu detektieren, als *P. damnosus*. Dies hängt wohl mit der Stäbchenform des Mikroorganismusses zusammen, die leichter aufzuschließen geht, als die Kokkenform von *P. damnosus*.

6.2.2 1. Pilotprojekt in der Brauerei A

Tab. 9: Ergebnisse des Pilotversuches in der Brauerei A

Lfd. Nr.	Probenahmeort	Sorte	PCR	NBB-B
1	DT	Dunkles	Befund	o. B.
2	DT	Dunkles	Befund	o. B.
3	DT	Märzen	o. B.	o. B.
4	DT	Pils	o. B.	o. B.
5	DT	Pils	o. B.	o. B.
6	DT	Pils	o. B.	o. B.
7	DT	Märzen	o. B.	o. B.
8	DT	Pils	o. B.	o. B.
9	DT	Pils	o. B.	o. B.
10	DT	Dunkles	Befund	o. B.
11	DT	Helles Vollbier	Befund	o. B.
12	DT	Märzen	o. B.	o. B.
13	DT	Pils	Befund	o. B.
14	DT	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
15	DT	Helles Vollbier	Befund	o. B.
16	DT	Helles Vollbier	Befund	o. B.

17	DT	Edel Hell	o. B.	Befund
18	DT	Edel Hell	o. B.	Befund
19	DT	Edel Hell	o. B.	Befund
20	DT	Dunkles	o. B.	Befund
21	DT	Festbier	Befund	o. B.
22	DT	Edel Hell	o. B.	Befund
23	DT	Edel Hell	o. B.	Befund
24	DT	Festbier	Befund	o. B.
25	DT	Weißbier	o. B.	o. B.
26	DT	Helles Vollbier	Befund	Befund
27	DT	Helles Vollbier	Befund	o. B.
28	BDR	Helles Vollbier	Befund	Befund
29	BDR	Helles Vollbier	Befund	Befund
30	BDR	Helles Vollbier	Befund	o. B.
31	BDR	Helles Vollbier	Befund	o. B.
32	BDR	Helles Vollbier	Befund	Befund
33	Filter 1 - KG Aus	Helles	Befund	o. B.
34	Filter 1 - Haffmanns	Helles	o. B.	Befund
35	SEN	Märzen	o. B.	o. B.
36	Birk-stfl.		o. B.	o. B.
37	DT	Weißbier	Befund	Befund
38	DT	Weißbier	Befund	Befund
39	DT	Leichtbier	o. B.	o. B.
40	DT	Weißbier	o. B.	Befund
41	DT	Helles Vollbier	Befund	o. B.
42	DT	Edel Hell	o. B.	Befund
43	DT	Edel Hell	o. B.	Befund
44	DT	Edel Hell	Befund	Befund
45	DT	Edel Hell	Befund	Befund
46	DT	Helles Vollbier	Befund	Befund
47	DT	Weißbier	o. B.	Befund
48	DT	Helles Vollbier	o. B.	Befund
49	DT	Helles Vollbier	o. B.	Befund

50	DT	Helles Vollbier	o. B.	Befund
51	DT	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
52	BDR	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
53	BDR	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
54	BDR	Helles Vollbier	Befund	o. B.
55	DT	Pils	o. B.	o. B.
56	DT	Pils	o. B.	o. B.
57	DT	Pils	o. B.	o. B.
58	DT	Pils	o. B.	o. B.
59	DT	Pils	o. B.	o. B.
60	DT	Weißbier	o. B.	Befund
61	DT	Weißbier	o. B.	Befund
62	DT	Festbier	Befund	Befund
63	DT	Festbier	o. B.	o. B.
64	DT	Helles Vollbier	Befund	Befund
65	DT	Festbier	o. B.	Befund
66	DT	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
67	DT	Helles Vollbier	o. B.	Befund
68	BDR	Helles Vollbier	Befund	Befund
69	BDR	Helles Vollbier	Befund	o. B.
70	BDR	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
71	BDR	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
72	BDR	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
73	BDR	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
74	BDR	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
75	Neubecker	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
76	Neubecker	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
77	Neubecker	Helles Vollbier	Befund	o. B.
78	Neubecker	Helles Vollbier	Befund	o. B.
79	SEN	Edel Hell	o. B.	Befund
80	Weigel	Festbier	o. B.	Befund
81	DT	Helles Vollbier	Befund	Befund
82	DT	Edel Hell	Befund	o. B.

83	DT	Edel Hell	o. B.	o. B.
84	DT	Edel Hell	Befund	o. B.
85	DT	Festbier	o. B.	o. B.
86	DT	Festbier	o. B.	o. B.
87	DT	Weißbier	o. B.	Befund
88	DT	Weißbier	o. B.	Befund
89	DT	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
90	DT	Helles Vollbier	o. B.	Befund
91	DT	Helles Vollbier	o. B.	Befund
92	BDR	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
93	BDR	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
94	BDR	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
95	BDR	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
96	SEN	Helles	o. B.	o. B.
97	Weigel	Märzen	Befund	o. B.
98	Weigel	Märzen	Befund	o. B.
99	Filter 2	Helles	o. B.	o. B.
100	DT	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
101	DT	Helles Vollbier	o. B.	Befund
102	DT	Märzen	o. B.	o. B.
103	DT	Dunkles	o. B.	o. B.
104	DT	Edel Hell	o. B.	o. B.
105	DT	Edel Hell	o. B.	o. B.
106	DT	Dunkles	o. B.	Befund
107	DT	Festbier	o. B.	o. B.
108	DT	Festbier	o. B.	o. B.
109	DT	Märzen	Befund	Befund
110	DT	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
111	BDR	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
112	BDR	Helles Vollbier	Befund	o. B.
113	BDR	Helles Vollbier	Befund	o. B.
114	BDR	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
115	BDR	Helles Vollbier	o. B.	o. B.

116	BDR	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
117	BDR	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
118	DT	Pils	o. B.	Befund
119	DT	Helles Vollbier	o. B.	Befund
120	DT	Helles Vollbier	Befund	Befund
121	DT	Helles Vollbier	Befund	o. B.
122	DT	Bockbier	o. B.	o. B.
123	DT	Festbier	o. B.	o. B.
124	DT	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
125	DT	Pils	o. B.	o. B.
126	DT	Pils	o. B.	o. B.
127	DT	Pils	o. B.	o. B.
128	DT	Pils	o. B.	o. B.
129	DT	Salvator	o. B.	o. B.
130	DT	Pils	o. B.	o. B.
131	DT	Festbier	o. B.	o. B.
132	DT	Weißbier	o. B.	Befund
133	DT	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
134	DT	Helles Vollbier	o. B.	o. B.
135	Filter 1	Festbier	o. B.	Befund
136	Filter 1	Festbier	o. B.	o. B.
137	Filter 2	Pils	o. B.	o. B.
138	SEN	Helles	o. B.	o. B.
139	Weigel	Dunkles	o. B.	o. B.
140	DT	Leichtbier	Befund	Befund

Dies ergibt folgende Verteilung (Anzahl / %):

Richtig-positiv: 16 / 11,4

Richtig-negativ: 69 / 49,2

Falsch-positiv: 25 / 17,9

Falsch-negativ: 30 / 21,4

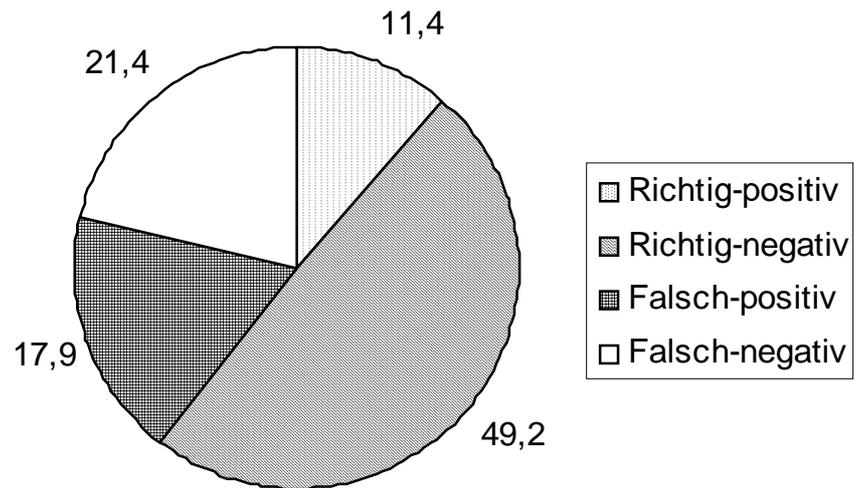


Abb. 24: Grafische Darstellung der Ergebnisse des Pilotprojektes in der Brauerei A

6.2.3 2. Pilotprojekt in der Brauerei A

In der Brauerei A wurde ein weiteres Pilotprojekt durchgeführt.

Tab. 10: Ergebnisse des 2. Pilotversuches in der Brauerei A

Lfd. Nr.	Bezeichnung	Biersorte	Befund NBB-B	PCR
8	GT 1	Hefeweißbier	vereinzelt Kokken	Ja
9	GT 2	Hefeweißbier	o.B.	Ja
10	DT 2	Hefeweißbier	<i>L. brevis</i>	Ja
11	Flasche	Hefeweißbier	o.B.	Ja
12	LT 128	Original	o.B.	Nein
13	LT 133	Festbier	o.B.	Nein
14	LT 134	Festbier	o.B.	Nein
15	LT 135	Festbier	o.B.	Nein
16	Nullprobe	Hell	o.B.	Nein
17	GT 2	Hefeweißbier	<i>L. brevis</i>	Ja
18	LT 133	Festbier	<i>L. brevis</i>	Ja
19	LT 135	Festbier	o.B.	Nein
20	ZKG 18	Original	<i>L. brevis</i>	Nein
21	Filter Auslauf	Original	o.B.	Nein
22	DT 4	Original	o.B.	Nein
23	DT 5	Original	<i>L. brevis</i>	Ja
24	Nullprobe	Hell	o.B.	Nein
25	ZKG 17	Original	<i>L. brevis</i>	Nein
26	ZKG 20	Original	<i>L. brevis</i>	Nein
27	DT 2	Hefeweißbier	<i>L. brevis</i>	Ja
28	DT 5	Original	<i>L. brevis</i> + <i>L. lindneri</i>	Nein
29	Keg Einlauf		<i>L. brevis</i>	Nein
30	Flasche 1	Original	o.B.	Nein
31	Flasche 2	Original	<i>L. lindneri</i> + <i>L. casei</i>	Nein

32	LT 101	Pils	<i>L. brevis</i>	Nein
33	LT 102	Pils	o.B.	Nein
34	LT 104	Pils	<i>L. brevis</i>	Nein
35	DT 1	Hefeweißbier	<i>L. brevis</i>	Ja
36	DT 3	Pils	<i>L. brevis</i>	Ja
37	DT 4	Original	o.B.	Nein
38	Flasche	Hefeweißbier	o.B.	Ja
39	Keg Einlauf	Pils	o.B.	Nein
40	Nullprobe	Spaten Hell	o.B.	Nein
41	ZKG 17	Original	<i>L. brevis</i>	Ja
42	ZKG 20	Pils	o.B.	Nein
43	LT 103	Pils	o.B.	Nein
44	LT 104	Pils	o.B.	Nein
45	LT 117	Dunkles	<i>L. brevis</i>	Ja
46	LT 118	Dunkles	o.B.	Nein
47	DT 3	Pils	o.B.	Nein
48	Keg Einlauf	Hefeweißbier	o.B.	Nein
49	Flasche	Kristallweißbier (USA)	o.B.	Nein
50	Nullprobe	Spaten Hell	<i>L. brevis</i>	Ja
51	GT 1	Hefeweißbier	Enterobacter	Ja
52	GT 3	Hefeweißbier	o.B.	Nein
53	ZKG 17	Original	<i>L. brevis</i>	Nein
54	ZKG 20	Pils	o.B.	Nein
55	DT 4	Original	o.B.	Nein
56	DT 5	Original	o.B.	Nein
57	Filter Auslauf		o.B.	Nein
58	Keg Einlauf	Hefeweißbier	<i>L. brevis</i>	Ja
59	Filter Auslauf		o.B.	Nein
60	DT 3	Festbier	o.B.	Nein
61	DT 5	Original	o.B.	Nein
62	Keg Einlauf	Hefeweißbier	<i>L. lindneri</i>	Ja
63	Flasche	Original	o.B.	Nein

64	Nullprobe	Spaten Hell	o.B.	Nein
65	GT 1	Hefeweißbier	o.B.	Ja
66	GT 2	Hefeweißbier	o.B.	Ja
67	ZKG 18	Original	<i>L. brevis</i>	Ja
68	ZKG 19	Pils	Schimmelpilze	Nein
69	DT 1	Hefeweißbier	o.B.	Nein
70	DT 3	Original	o.B.	Nein
71	Keg Einlauf	Hefeweißbier	Lactobacillen	Ja
72	Flasche (kaputt)	Hefeweißbier	Essigsäureb.	Nein

Die Fotos zu den in Tab. 10 dargestellten Bilder sind wie folgt:

M 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

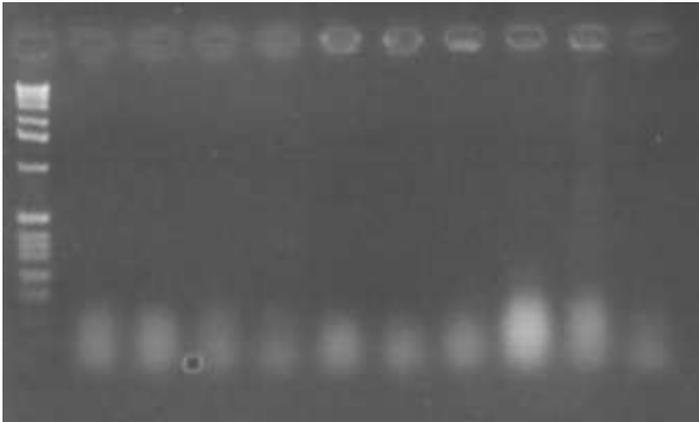


M 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27



Abb. 25: Lfd. Nr. 8-27 des 2. Pilotprojektes in Brauerei A

M 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37



M 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47

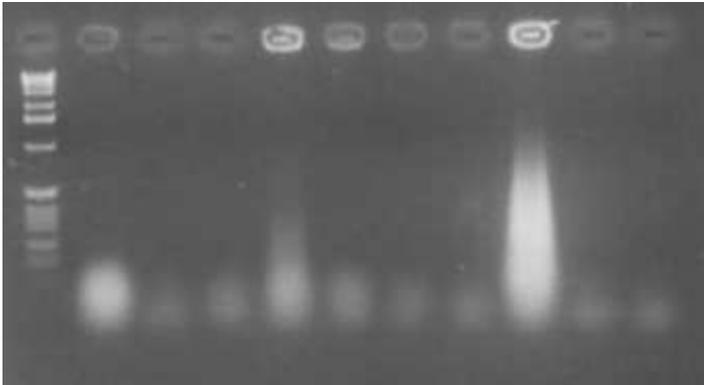
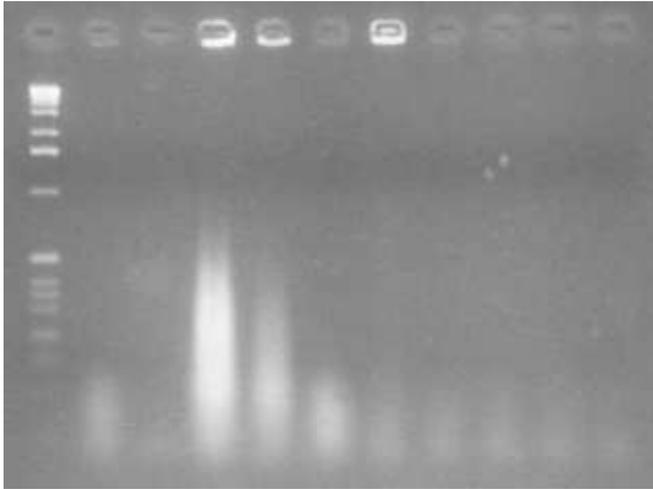


Abb. 26: Lfd. Nr. 28-47 des 2. Pilotprojektes in Brauerei A

M 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57



M 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67

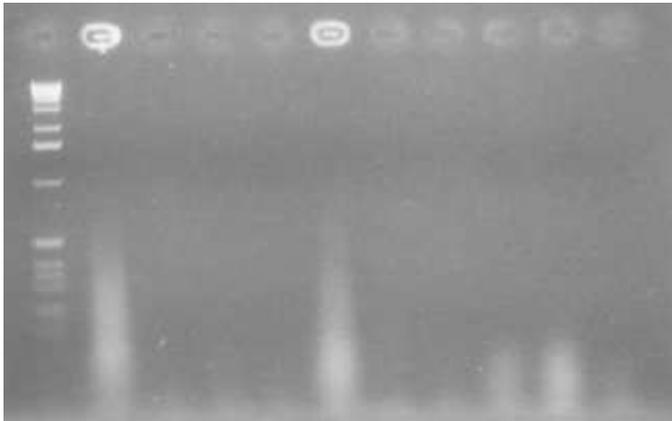


Abb. 27: Lfd. Nr. 48-67 des 2. Pilotprojektes in Brauerei A

M 68 69 70 71 72 - + - +

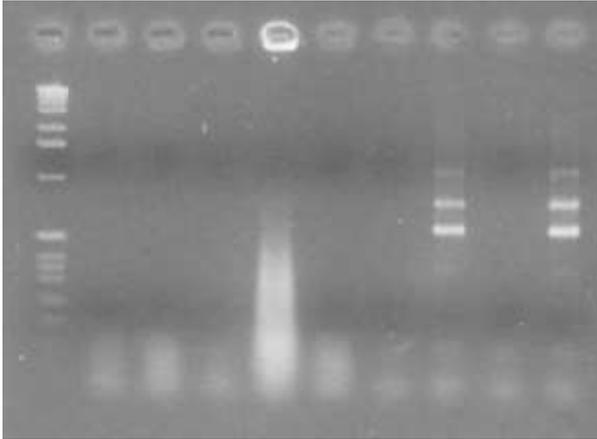


Abb. 28: Lfd. Nr. 68-72 des 2. Pilotprojektes in Brauerei A , Negativ-Kontrolle des Zellaufschlusses, Positiv-Kontrolle des Zellaufschlusses, Negativ-Kontrolle der PCR, Positiv-Kontrolle der PCR

Zusammengefaßt ergibt sich damit eine Verteilung (in %):

Richtig-positiv:24,6

Richtig-negativ:53,8

Falsch-positiv:7,7

Falsch-negativ:13,8

Als Diagramm ausgedrückt:

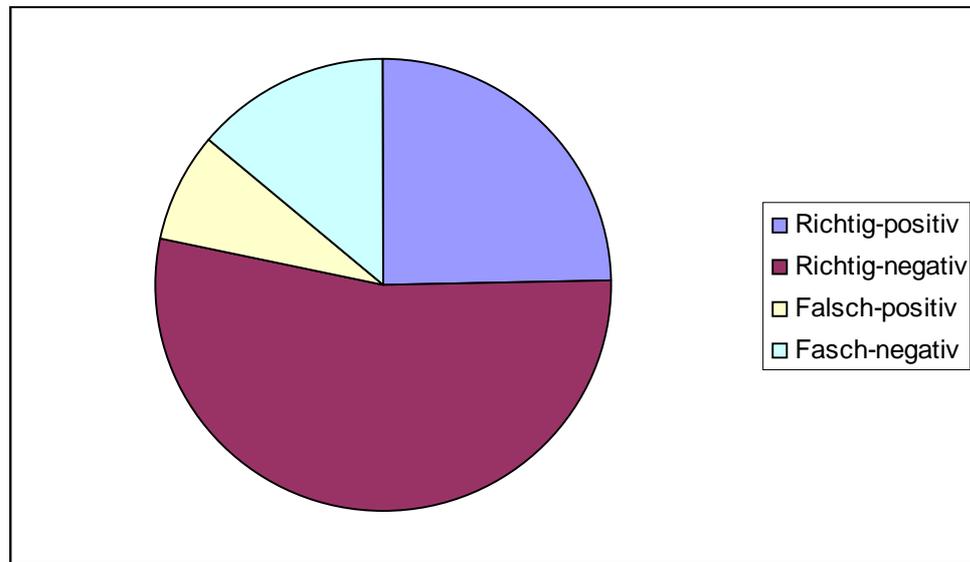


Abb. 29: Graphische Darstellung der Ergebnisse des 2. Pilotprojektes in Brauerei A

Wenn man die Ergebnisse in die verschiedenen Gefäße unterteilt, so bekommt man folgende Verteilung:

Richtig-positiv: PCR und NBB-Nachweis zeigen eine Kontamination an

Richtig-negativ: PCR und NBB-Nachweis zeigen keine Kontamination an

Falsch-positiv: PCR zeigt eine Kontamination an, NBB zeigt keine Kontamination an

Falsch-negativ: PCR zeigt keine Kontamination an, NBB zeigt eine Kontamination an

Tab. 11: Teilergebnis des 2. Pilotprojektes in Brauerei A, Gärtank

Gärtank	n		n
PCR-positiv	6	Richtig-positiv	3
PCR-negativ	1	Richtig-negativ	1
NBB-positiv	3	Falsch-positiv	3
NBB-negativ	4	Falsch-negativ	0

Tab. 12: Teilergebnis des 2. Pilotprojektes in Brauerei A, Drucktank

Drucktank	n		n
PCR-positiv	5	Richtig-positiv	5
PCR-negativ	10	Richtig-negativ	9
NBB-positiv	6	Falsch-positiv	0
NBB-negativ	9	Falsch-negativ	1

Tab. 13: Teilergebnis des 2. Pilotprojektes in Brauerei A, Lagertank

Lagertank	n		n
PCR-positiv	2	Richtig-positiv	2
PCR-negativ	11	Richtig-negativ	9
NBB-positiv	4	Falsch-positiv	0
NBB-negativ	9	Falsch-negativ	2

Tab. 14: Teilergebnis des 2. Pilotprojektes in Brauerei A, ZKG

ZKG	n		n
PCR-positiv	2	Richtig-positiv	2
PCR-negativ	7	Richtig-negativ	3
NBB-positiv	6	Falsch-positiv	0
NBB-negativ	3	Falsch-negativ	4

Tab. 15: Teilergebnis des 2. Pilotprojektes in Brauerei A, Flasche

Flasche	n		n
PCR-positiv	2	Richtig-positiv	0
PCR-negativ	4	Richtig-negativ	3
NBB-positiv	5	Falsch-positiv	2
NBB-negativ	1	Falsch-negativ	1

Tab. 16: Teilergebnis des 2. Pilotprojektes in Brauerei A, Keg-Einlauf

Keg-Einlauf	n		n
PCR-positiv	3	Richtig-positiv	3
PCR-negativ	3	Richtig-negativ	2
NBB-positiv	4	Falsch-positiv	0
NBB-negativ	2	Falsch-negativ	1

Tab. 17: Teilergebnis des 2. Pilotprojektes in Brauerei A, Filter Auslauf

Filter Auslauf	n		n
PCR-positiv	0	Richtig-positiv	0
PCR-negativ	3	Richtig-negativ	3
NBB-positiv	0	Falsch-positiv	0
NBB-negativ	3	Falsch-negativ	0

Tab. 18: Teilergebnis des 2. Pilotprojektes in Brauerei A, Nullprobe

Nullprobe	n		n
PCR-positiv	1	Richtig-positiv	4
PCR-negativ	4	Richtig-negativ	1
NBB-positiv	1	Falsch-positiv	0
NBB-negativ	4	Falsch-negativ	0

Es ist auch möglich, die Ergebnisse den verschiedenen Biersorten zuzuordnen.

Tab. 19: Teilergebnis des 2. Pilotprojektes in Brauerei A, Festbier

Festbier	n		n
PCR-positiv	1	Richtig-positiv	1
PCR-negativ	5	Richtig-negativ	5
NBB-positiv	1	Falsch-positiv	0
NBB-negativ	5	Falsch-negativ	0

Tab. 20: Teilergebnis des 2. Pilotprojektes in Brauerei A, Weißbier

Weißbier	n		n
PCR-positiv	14	Richtig-positiv	9
PCR-negativ	4	Richtig-negativ	4
NBB-positiv	9	Falsch-positiv	5
NBB-negativ	9	Falsch-negativ	0

Tab. 21: Teilergebnis des 2. Pilotprojektes in Brauerei A, Original

Original	n		n
PCR-positiv	3	Richtig-positiv	3
PCR-negativ	16	Richtig-negativ	10
NBB-positiv	9	Falsch-positiv	0
NBB-negativ	10	Falsch-negativ	6

Tab. 22: Teilergebnis des 2. Pilotprojektes in Brauerei A, Pils

Pils	n		n
PCR-positiv	1	Richtig-positiv	1
PCR-negativ	10	Richtig-negativ	8
NBB-positiv	3	Falsch-positiv	0
NBB-negativ	8	Falsch-negativ	2

6.2.4 Pilotprojekt in der Brauerei B

Tab. 23: Ergebnisse des Pilotprojektes in der Brauerei B

Lfd. Nr.	Biersorte	Gebinde	Infiziert	NBB-B	PCR
1	Hefeweißbier	GT	<i>P. damnosus</i>	<i>L. brevis</i>	Nein
2	Hefeweißbier	GT	Nein	<i>L. brevis</i>	Nein
3	Wohn Hefeweißbier	Flasche	<i>P. damnosus</i>	Pediokokken	Nein
4	Wohn Hefeweißbier	Flasche	Nein	o.B.	Nein
5	0-Probe	Flasche	Nein	o.B.	Nein
6	Hefeweißbier	GT	Nein	<i>L. brevis</i>	Nein
7	Original	LT	Nein	o.B.	Nein
8	Original	LT	Nein	o.B.	Nein

9	Original	LT	Nein	o.B.	Ja
10	Hefeweißbier	Flasche	<i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i>	Nein
11	0-Probe	Flasche	<i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i>	Ja
12	0-Probe	Flasche	Nein	o.B.	Nein
13	Original	Filter- Auslauf	Nein	o.B.	Nein
14	Original	DT	Nein	o.B.	Nein
15	Original	DT	Nein	o.B.	Nein
16	Hefeweißbier	DT	Nein	Essigsäure	Nein
17	Hefeweißbier	Keg- Einlauf	Nein	o.B.	Nein
18	Hefeweißbier	Flasche	<i>L. brevis</i>	o.B.	Nein
19	Hefeweißbier	Flasche	Nein	o.B.	Nein
20	0-Probe	Flasche	Nein	o.B.	Nein
21	0-Probe	Flasche	<i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i>	Ja
22	Hefeweißbier	GT	Nein	o.B.	Nein
23	Hefeweißbier	GT	Nein	Enterobacter	Nein
24	Hefeweißbier	Keg- Einlauf	Nein	o.B.	Nein
25	0-Probe	Flasche	<i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i>	Ja
26	0-Probe	Flasche	Nein	o.B.	Nein
27	Pils	Filter- Auslauf	Nein	o.B.	Nein
28	Pils	DT	Nein	Essigsäure	Nein
29	Original	DT	Nein	Enterobacter	Ja, schwach
30	Original	DT	Nein	Enterobacter	Nein
31	Hefeweißbier	DT	Nein	Essigsäure	Nein
32	Hefeweißbier	DT	Nein	Kokken	Nein
33	Hefeweißbier	Keg- Einlauf	Nein	o.B.	Nein

Die zu der Tab. 23 gehörenden Bilder:

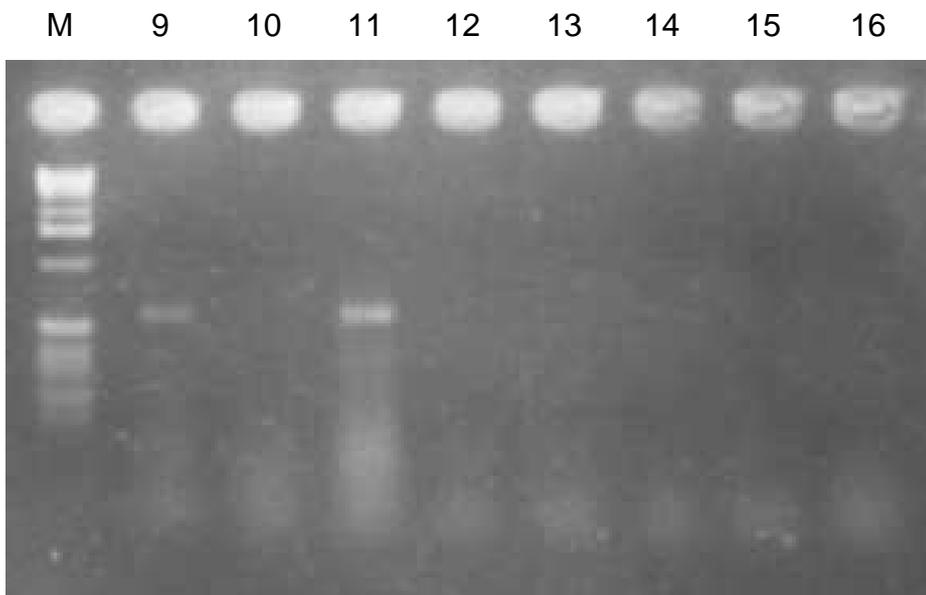
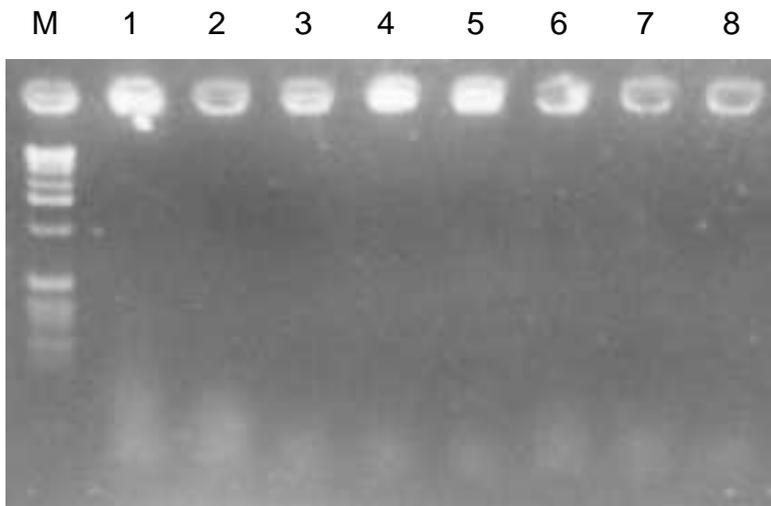


Abb. 30: Banden des Pilotversuchs in Brauerei B, Bahn M: 1 kb DNA Ladder, Bahn 1-8: Lfd. Nr. 1-8, Bahn 9-16: Lfd. Nr. 9-16

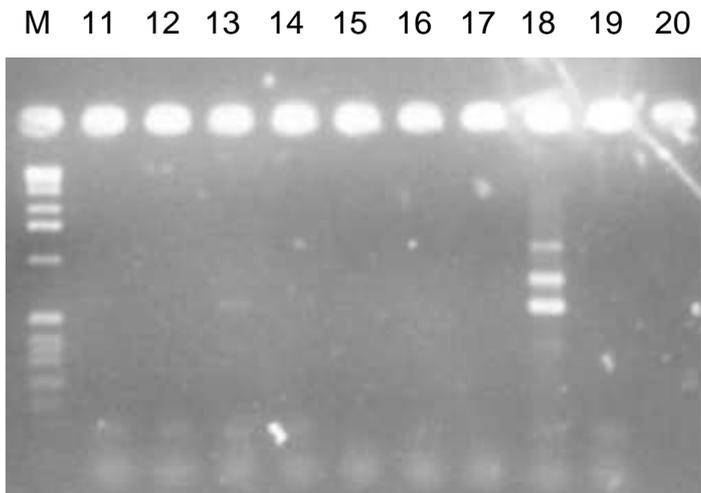
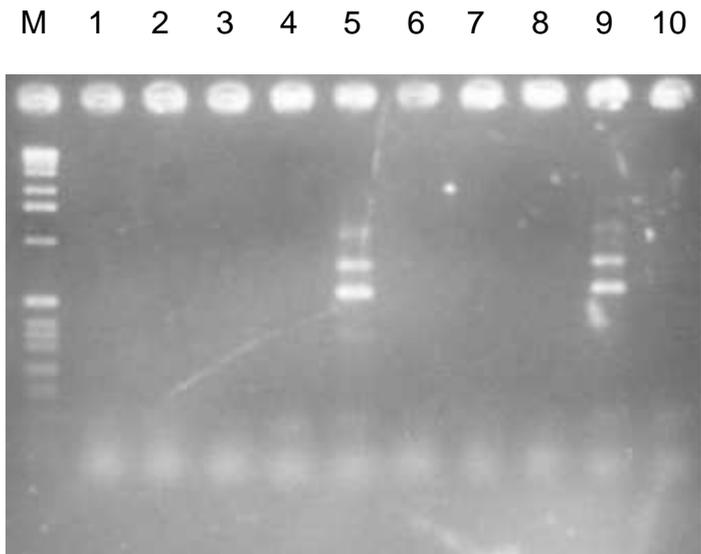


Abb. 31: Banden des Pilotversuchs in Brauerei B, Bahn M: 1 kb DNA Ladder, Bahn 1-10: Lfd. Nr. 17-26, Bahn 11-17: Lfd. Nr. 27-33, Bahn 18: Positiv-Kontrolle, Bahn 19: Negativ-Kontrolle

6.2.5 Brauerei C

Bei dem Pilotversuch in Brauerei C wurde auf eine weitere Inkubation des restlichen NBB-Cs verzichtet, da sich mit Entnahme der für die PCR notwendigen Menge die anaerobe Atmosphäre in eine aerobe umgewandelt hätte, und eventuell vorhandene aerobe Begleitorganismen einen falsch-positiven Befund geliefert hätten.

Die Korrelation zwischen der PCR und NBB-B ist sehr gut. Eventuell auftretende schwache Banden bei der PCR wurden als negatives Ergebnis gewertet (siehe 6.3.4).

Tab. 24: Ergebnisse des Pilotversuchs in der Brauerei C

Lfd. Nr.	Probenahmeort	Sorte	PCR	NBB-B
1	Keg I 30l	Premium	schwach	o.B.
2	Keg Einlauf	Pils	o.B.	o.B.
3	Füller Einlauf	Premium	Befund	Befund
4	Keg I 30l	Pils	o.B.	o.B.
5	DT 21	Pils	o.B.	o.B.
6	DT 22	Premium	o.B.	o.B.
7	DT 27	Premium	schwach	o.B.
8	Füller Einlauf	Premium	o.B.	o.B.
9	Füller Einlauf	Premium	schwach	o.B.
10	Keg I	Premium	o.B.	o.B.
11	Produktionsflasche	Premium	o.B.	o.B.
12	Sterile Flasche	Premium	schwach	o.B.
13	PT Flk.	Premium	o.B.	o.B.
14	DT 27	Premium	o.B.	o.B.
15	DT 26	Pils	o.B.	o.B.
16	Keg I 30l	Pils	schwach	o.B.
17	PT Flk.	Pils	o.B.	o.B.
18	EK-FA	Pils	Befund	o.B.
19	EK-FA	Pils, Premium, Export	schwach	o.B.
20	Füller Einlauf	Pils	Befund	Befund

21	Produktions Flasche	Pils	Befund	Befund
22	Sterile Flasche	Pils	schwach	o.B.
23	DT 23	Premium	o.B.	o.B.
25	DT 25	Export	o.B.	o.B.
26	DT 26	Pils	o.B.	o.B.
27	KEG I	Pils	o.B.	o.B.
28	EK-FA	Pils	o.B.	o.B.
29	PT-KEG	Pils	o.B.	Befund
30	PT-FLK	Pils	o.B.	o.B.
31	Füller Einlauf	Pils	o.B.	o.B.
32	Sterile Flasche	Pils	o.B.	o.B.
34	DT 21	Pils	o.B.	o.B.
35	DT 23	Premium	o.B.	o.B.
36	DT 24	Pils	o.B.	o.B.
37	Keg I	Pils	o.B.	o.B.
38	DT 21	Pils	schwach	o.B.
39	DT 23	Premium	o.B.	o.B.
40	DT 24	Pils	o.B.	o.B.
41	DT 25	Export	o.B.	o.B.

Damit ergibt sich folgende Verteilung (Anzahl / %):

Richtig-positiv (PCR und NBB-B zeigen Befund): 3 / 7,7

Richtig-negativ (PCR und NBB-B zeigen o. B. bzw. schwach): 35 / 89,7

Falsch-positiv (PCR zeigt Befund, NBB-B zeigt o. B): 1 / 2,6

Falsch-negativ (PCR zeigt o. B bzw. schwach, NBB-B zeigt Befund): 0 / 0

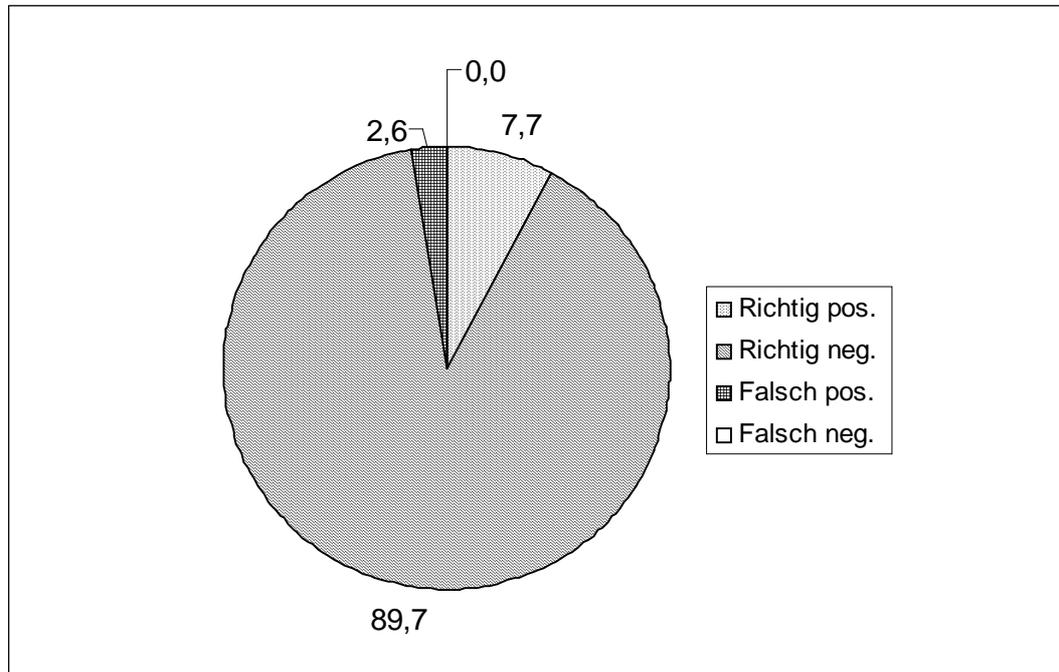


Abb. 32: Grafische Darstellung der Ergebnisse des Pilotprojektes in Brauerei C

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

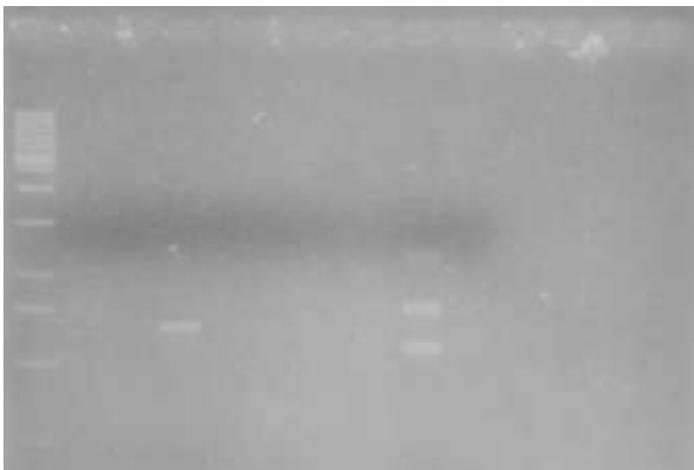


Abb. 33: Banden des Pilotversuchs in Brauerei C. Bahn M: 1kb DNA Ladder, Bahn 1-7, Lfd. Nr. 1-7, Bahn 8: Positiv-Kontrolle, Bahn 9: Negativ-Kontrolle, Bahn 3: positiv, Bahn 1+7: schwach, Rest: negativ.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

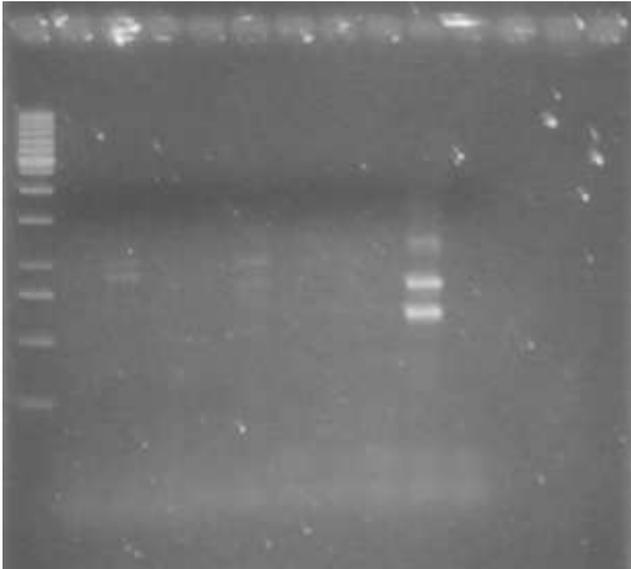


Abb. 34: Banden des Pilotversuches in Brauerei C. Bahn M: 1 kb DNA Ladder, Bahn 1-8, Lfd. Nr. 8-15, Bahn 9: Positiv-Kontrolle, Bahn 10: Negativ-Kontrolle, Bahn 2: schwach, Bahn 5: schwach, Rest: negativ.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

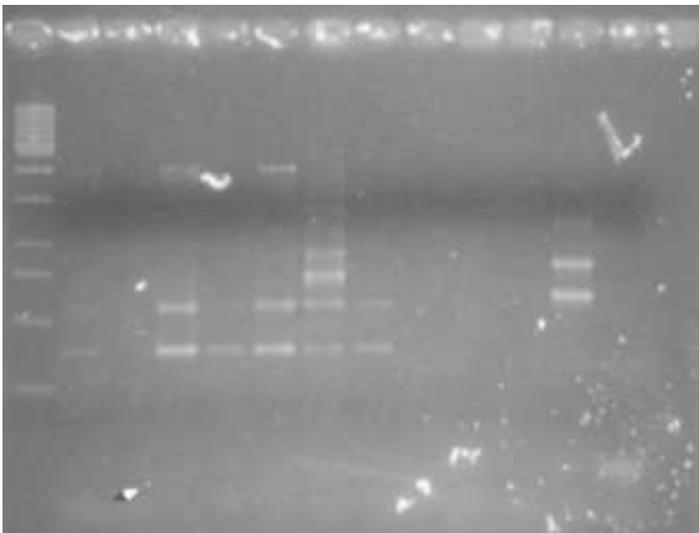


Abb. 35: Banden des Pilotversuchs in Brauerei C. Bahn M: 1kb DNA Ladder, Bahn 1-10, Lfd. Nr. 16-26, Bahn 11: Positiv-Kontrolle, Bahn 12: Negativ-Kontrolle, Bahn 1, 4, 7: schwach, Bahn 3, 5,6: schwach, Rest: negativ, Lfd. Nr. 24: Keine PCR.

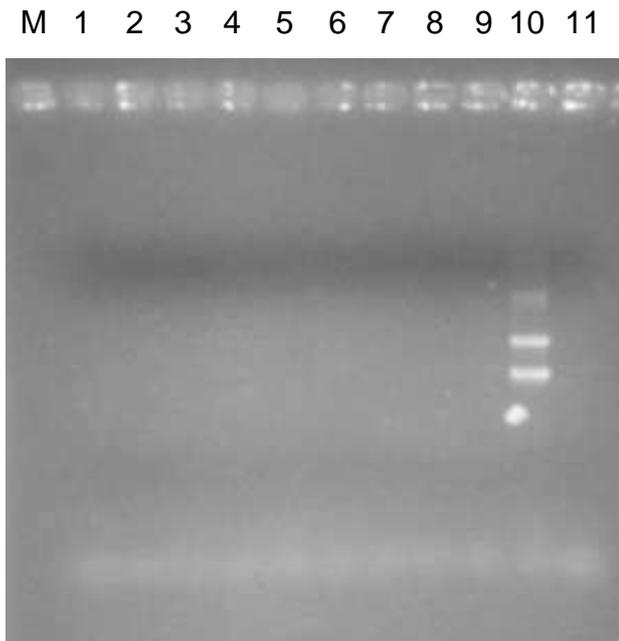


Abb. 36: Banden des Pilotversuchs in Brauerei C. Bahn M: 1 kb DNA Ladder, Bahn 1-9, Lfd. Nr. 27-36, Bahn 10: Positiv-Kontrolle, Bahn 11: Negativ-Kontrolle, Alle Bahnen: negativ, Lfd. Nr. 33: Keine PCR.

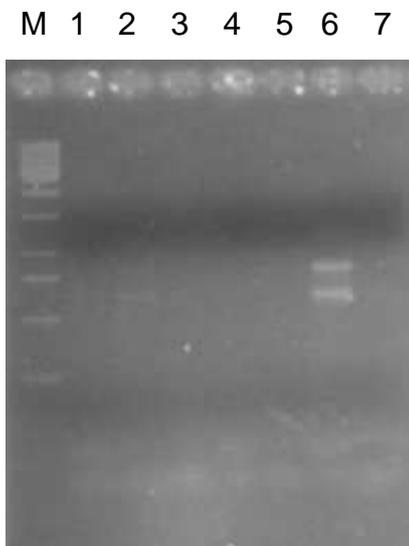


Abb. 37: Banden des Pilotversuchs in Brauerei C. Bahn M: 1 kb DNA Ladder, Bahn 1-5, Lfd. Nr. 37-41, Bahn 6: Positiv-Kontrolle, Bahn 7: Negativ-Kontrolle, Bahn 2: schwach, Rest: negativ.

6.3 Diskussion der Pilotprojekte

6.3.1 1. Pilotprojekt in Brauerei A

Hier ist die PCR nicht optimal gelaufen, wie man an den verschmierten Banden sehen kann. Es konnte daher nur unterschieden werden, ob die Banden stark vorhanden waren oder nicht. Insgesamt ist dieses Pilotprojekt nicht wie gewünscht verlaufen. Der Grund für dieses Versagen der PCR liegt wie später festgestellt wurde bei der Taq-Polymerase, da für weitere Versuche eine neue Taq-Polymerase verwendet wurde, mit der dann wieder bessere Ergebnisse erzielt wurden. Es ist möglich, dass die sehr temperaturabhängige Taq-Polymerase zu lange bei Raumtemperaturen gelagert wurde und daher an Aktivität eingebüßt hat.

6.3.2 2. Pilotprojekt in Brauerei A

Auffällig beim 2. Pilotprojekt in Brauerei A waren die sehr häufigen falsch-positiven Ergebnisse. Da häufig an einem Versuchstag sämtliche Proben bei der PCR ein positives Signal ergaben, wurde das NBB-C auf eventuell vorhandene DNA überprüft (siehe 3.1.4, 3.2.2). Da dadurch gezeigt werden konnte, dass das NBB-C Kontaminationen mit Fremd-DNA aufwies, läßt sich eine Beurteilung dieser Ergebnisse nur sehr bedingt verwenden.

6.3.3 Pilotprojekt in Brauerei B

In Brauerei B wurde noch mit einem unmodifiziertem Chelex-Aufschluß gearbeitet. Hier zeigte sich eine mangelhafte Korrelation zwischen den Ergebnissen der PCR und den Ergebnissen des klassischen Nachweises. Weiterhin wurde hier noch versucht, auch in Weißbieren Kontaminationen nachzuweisen. Dies war jedoch aufgrund der hohen Biomasse der Hefen unmöglich. Hier verhindern der hohe Überschuß an Hefen einen effektiven Zellaufschluß und machen da-

her einen PCR-Nachweis unmöglich. Daher wurde in den weiteren Versuchen auf die Untersuchung von Unfiltrat verzichtet.

6.3.4 Pilotprojekt in Brauerei C

Hier sind aufgrund einer vorherigen Überprüfung der NBB-C-Charge keine falsch-positiven Ergebnisse aufgrund des Voranreicherungsmediums aufgetreten. Auffallend hier sind noch einige schwache Signale. Diese Proben lieferten jedoch bei der Anreicherung mit NBB-B keinen positiven Befund. Hier kann man davon ausgehen, dass sich bei der Probenahme oder Probenverarbeitung außerhalb der Anreicherung am Flaschenhals zwischen Glas und Gummidichtung des Bügelverschlusses Flüssigkeit angesammelt hat, und in dieser Flüssigkeit konnten Bakterien wachsen. Bei dem klassischen Nachweisverfahren können diese Keime durch Hitze nach dem Öffnen der Bügelverschlusflasche abgetötet werden. Es ist aber möglich, dass trotzdem beim Überführen des Voranreicherungsmediums abgetötete Keime in das Zentrifugegefäß überführt werden und dadurch ein falsch-positives Signal sich ergibt (Abb. 38).

Eine Entnahme der Voranreicherung mit einer Pipette wird hier sicherlich zu einem besseren Ergebnis führen.

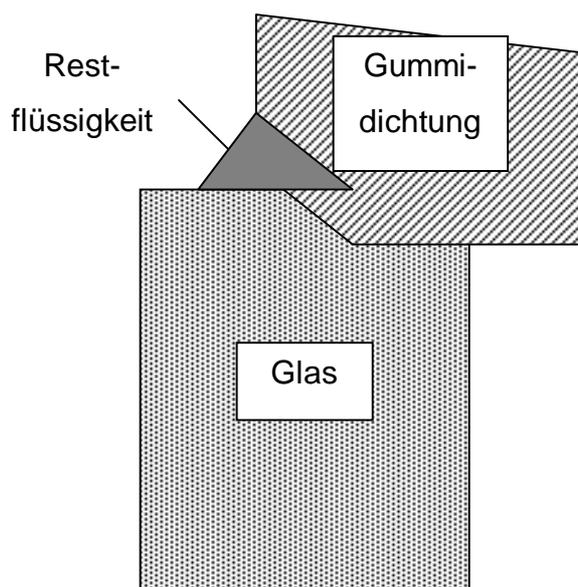


Abb. 38: Kontaminationsgrund für falsch-positive Signale

Wenn man dieses beachtet, und nur schwache Signale als negativen Befund der PCR deutet, so ist bei diesem Pilotprojekt eine sehr hohe Korrelation zwischen den Ergebnissen der PCR und der Auswertung der NBB-B festzustellen. Von 37 Proben sind 89,7 % richtig-negativ, 7,7 % richtig-positiv und nur 2,6 % falsch-positiv (= 1 Probe). Es traten keine falsch-negativen Proben auf.

7 Diskussion

7.1 PCR-Amplifikation und Primer-Wahl

Universelle Primer wurden aus verschiedenen Gründen benutzt. Es ist bei der Probenahme unbekannt, welcher Keim eventuell im Bier vorhanden ist. Es gibt ca. 20 verschiedene Arten, die das Bier schaden können (Tab. 25). Bei einer Multiplex-PCR sinkt die Sensitivität und eine längere Voranreicherungszeit ist notwendig. Wenn für jeden spezifischen Primer ein Reaktionsgefäß benutzt wird, so ist dies für die Proben, die in einer Brauerei anfallen, sehr aufwändig und teuer. Aus diesen Gründen ist ein Nachweis von bierschädlichen Bakterien mit spezifischen Primern nicht praktikabel. Weiterhin besteht bei spezifischen Primern die Gefahr von falsch-negativen Ergebnissen, aufgrund von genetisch falschen Klassifizierungen.

Mit universellen Primern können die Proben innerhalb von 48 Stunden auf Keimfreiheit überprüft werden. Aufgrund der spezifischen Voranreicherung bedeutet jedes Signal eine Kontamination durch ein bierschädliches Bakterium. Die amplifizierte DNA ist hochvariabel und eine weitere Identifizierung ist möglich, falls dies gewünscht ist (4). Eine biologische Säuerung bewirkt keine falsch-positiven Ergebnisse. Es konnte in dieser Untersuchung gezeigt werden, dass die amplifizierte ITS durch einen einfachen Restriktionsenzymverdau unterschieden werden konnte.

Tab. 25: Bierschädliche Keime und ihre Schädlichkeitskategorie (3)

Name	Schädlichkeits-Kategorie	Häufigkeit der Arten bei Reklamationen im Bier in %
<i>L. brevis</i>	I	35
<i>L. lindneri</i>	I	25
<i>L. brevisimilis</i>	I	3
<i>L. frigidus</i>	I	2
<i>L. coryniformis</i>	I	3
<i>L. casei</i>	I	2
<i>L. plantarum</i>	II	1
<i>Zymomonas mobilis</i>	II	< 1
<i>Enterobacter agglomerans</i>	III	< 1
<i>Obesumbacterium proteus</i>	III	< 1
<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i> <i>Pectinatus frisingensis</i>	I	4
<i>Micrococcus kristinae</i>	II	< 1
<i>P. damnosus</i>	I	17
<i>P. inopinatus</i>	II	1
<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus raffinolactis</i>	II	1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Leuconostoc paramesenteriodes</i>	II	< 1
<i>Megasphaera cerevisiae</i>	I	2

I: obligat bierschädlich

II: potentiell bierschädlich

III: indirekt bierschädlich

7.2 Zellaufschluß

Mehrere Zellaufschlußverfahren wurden getestet. Um die Methoden zu vergleichen, wurde Wert auf 4 Punkte gelegt: Sensitivität, Zeit, Kosten und Bedienung. Die Sensitivität des Verfahrens muß so hoch wie möglich sein, da sie entscheidend für die Dauer der Voranreicherung ist. Der Zellaufschluß selbst sollte für einen Schnellaufweis möglichst rasch erfolgen sein. Es muß möglich sein, den Zellaufschluß, die PCR und den Nachweis der DNA innerhalb eines Arbeitstages durchzuführen. Wenn die Methode in Brauereien eingeführt werden soll, so sollten die Kosten gering und die Handhabung einfach sein. Es sollten auch keine toxischen Materialien verwendet werden. Der entwickelte Zellaufschluß eignet sich aus diesen Gründen sehr gut für eine Anwendung in Brauereien. Sowohl die verwendeten Chemikalien Triton-X-100 und Chelex® als auch das verwendete Enzym Proteinase K sind ungiftig und ohne weitere Sicherheitsmaßnahmen verwendbar. Die verwendeten Gerätschaften sind: Zentrifuge, Whirlmixer, Temperierbad und Kochplatte. Diese Gerätschaften sind in gut ausgestatteten Labors vorhanden und müssen nicht noch neu gekauft werden. Die Handhabung ist äußerst einfach und nach einer kurzen Einarbeitungszeit erzielt man reproduzierbare Ergebnisse.

7.3 Voranreicherung

Bereits ein lebender bierschädlicher Keim kann unter entsprechenden Bedingungen zu einer Schädigung des Bieres führen. Also muß jeder mikrobiologischer Nachweis in Brauereien diesen einen Keim / Probe detektieren. Mit einem Keim ist es nicht möglich, einen Nachweis mit PCR zu führen, da es beim Zellaufschluß immer zu einem Verlust an DNA kommt und auch für die PCR eine Mindestmenge an DNA vorhanden sein muß. Daher muß die Probe vorangereichert werden.

Als Voranreicherungsmedium hat sich NBB-C aus verschiedenen Gründen als geeignet herausgestellt. Dieses Medium fördert das Wachstum von bierschädlichen Bakterien und inhibiert harmlose Begleitorganismen, die zu falsch-

positiven Ergebnissen führen würden, wenn universelle Primer benutzt werden. Weiterhin ist eine anaerobe Atmosphäre gegeben, die die Selektivität des Voranreicherungsmedium unterstützen. Um eine gute statistische Aussage des Resultates zu erlangen, ist es auch wichtig, ein möglichst großes Probevolumen zu untersuchen.

NBB-C ist in europäischen Brauereien weit verbreitet und bekannt. Da die Voranreicherung für einen Nachweis mit PCR der gleiche ist, wie der klassische Nachweis mit NBB-C, ist eine Einarbeitung des Laborpersonals nicht nötig.

Da NBB-C die DNA von abgetöteten Würzebakterien enthalten kann, ist eine vorherige Kontrolle der Charge auf DNA-Freiheit unumgänglich. Vorgesehen ist jedoch speziell für PCR-Nachweisverfahren ein spezielles NBB-C im Handel zur Verfügung zu stellen.

7.4 Probenvorbereitung

Die untersuchten Keime in diesem Projekt waren *Lactobacillus brevis*, *L. lindneri* und *Pediococcus damnosus*. *L. brevis* ist der am häufigsten vorkommende bierschädliche Keim. *L. lindneri* und *P. damnosus* sind bekannt als sehr langsam wachsende Keime. Es müssen aber alle lebenden bierschädlichen Keime entdeckt werden. Deshalb muß die Art mit dem schlechtesten Wachstumspotential zugrunde gelegt werden. Die Keime liegen im abgefüllten Bier in der lag-Phase vor. Um die Lagerung des Bieres zu simulieren, müssen die Keime in die lag-Phase gebracht werden. Sowohl die Zeit, die zur Überwindung der lag-Phase benötigt wird, als auch die Generationszeit bestimmen die Wachstumszeit.

7.5 Nachweisgrenze

Um die Sensitivität des Zellaufschlusses und der PCR zu bestimmen, wurden die Zellzahl in einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Eine PCR unterscheidet

nicht zwischen lebenden und toten Zellen. Daher muß die Gesamtkeimzahl bestimmt werden. Je nach Lagerbedingungen unterscheidet sich diese Zahl von der Zahl der lebenden Zellen.

7.6 Pilotprojekte

Die Pilotprojekte dienten zur Überprüfung der Einsatzfähigkeit des PCR-Schnellnachweises in der Praxis. Während beim Pilotprojekt in Brauerei A die Kontamination von NBB-C mit Fremd-DNA die Aussagekraft der Ergebnisse stark störten, konnte mit dem Pilotprojekt in Brauerei B eine starke Korrelation zwischen den Ergebnissen der PCR und einer klassischen Anreicherung festgestellt werden. Hier wurde gezeigt, dass man auf die gleichen Ergebnisse kommt, wie bei einem konventionellen Nachweisverfahren, jedoch kann man die Zeit um 60 - 70% reduzieren (von 5 - 7 Tagen auf 48 h). Damit steht der Brauwirtschaft ein effektives Mittel zur Verfügung, um Spurenkontaminationen möglichst frühzeitig zu entdecken, um so eine sichere Produktqualität zu gewährleisten.

7.7 Kosten des Schnellnachweises

Die Kosten für Verbrauchsmaterial liegen bei vorliegenden PCR-Schnellnachweis bei ca. 2,07 DM / Probe. Im einzelnen sind dies:

Tab. 26: Variable Kosten für den PCR-Schnellnachweis.

Material (Menge pro Probe)	Kosten pro PCR	Kosten pro Probe (bei 20 Proben / PCR)
NBB-C (9 ml)	11,20 DM	0,56 DM
Proteinase K (10µg)	0,24 DM	0,012 DM
Chelex	0,68 DM	0,034 DM
Taq, Puffer, NTP	24,18 DM	1,209 DM
Agarose-Gel	1,92 DM	0,096 DM
Polaroid-Foto	2,14 DM	0,107 DM
Kleinteile (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, usw.)	1,00 DM	0,05 DM
Gesamt	41,36 DM	2,068 DM

Die Kosten für die Gerätschaften, die zusätzlich zum normalen Laborequipment angeschafft werden müssen, sind:

Tab. 27: Kosten für zusätzliche Gerätschaften für den PCR-Schnellnachweis

Material	Kosten
eigener Pipettensatz	1000,- DM
PCR-Block	9000,- DM
Plastik (Racks, PCR-Tubes, usw.)	1000,- DM
UV-Schirm	2000,- DM
Polaroid-Kamera	2000,- DM
Elektrophorese (Power-Supply und Elektrophoresekammer)	2500,- DM
Schüttler für Ethidium-Bromid	1000,- DM
Gesamt	18500,- DM

Bei einer Annahme von 60 Proben / Woche und der Annahme einer 5jährigen Laufzeit, so ergibt sich ein Kostensatz von 1,19 DM /Probe.

Eine Laborkraft ist ca. 12 h/ Woche durch die PCR gebunden. Bei einem Brutogehalt von 30,- DM / h sind dies 6,- DM Arbeitsgehalt / Probe.

Die Gesamtkosten belaufen sich daher auf 9,26 DM / Probe.

7.8 Beachtenswerte Punkte beim PCR-Schnellnachweis

Beim PCR-Schnellnachweis sind einige Punkte besonders zu beachten, die hier nochmals zusammengefaßt aufgeführt werden sollen:

- a) Vermeiden von Überlaufen des Bügelverschlußflasche bei der Herstellung der Voranreicherung

Wenn das Voranreicherungsmedium in der Bügelverschlußflasche überläuft, so können sich zwischen dem Gummi und der Bügelverschlußflasche Keime entwickeln, die dann fälschlicherweise bei Überführen der Voranreicherung in die Zentrifugenröhrchen mitkommen können, und so falsch-positive Signale auslösen können. Ein vorheriges Abflambieren des Randes tötet zwar die Keime ab, was für die klassischen Verfahren ausreichend ist, jedoch ist die DNA weiterhin vorhanden und es resultieren falsche Ergebnisse daraus.

- b) Vorheriges Homogenisieren der Voranreicherung

Da sich die Bakterien in der Voranreicherung häufig im Bodensatz absetzen, ist es wichtig, dass dieser Bodensatz aufgeschüttelt wird.

- c) Homogenisieren der Chelex-Lösung

Chelex besteht aus vielen kleinen Harzkügelchen, die sehr schnell in einer Lösung zu Boden sinken. Daher muß mit einer Eppendorf-Pipette

vor jeder Entnahme von Chelex-Lösung, diese durchmischt werden, da sonst die Chelex-Konzentration im Reaktionsgefäß nicht stimmt.

d) Verhindern von Wassereinbruch in die Reaktionsgefäße

Beim Kochen der Reaktionsgefäße muß darauf geachtet werden, dass die Wasserhöhe im Kochgefäß unterhalb der Öffnung der Reaktionsgefäße liegt, da sonst die Gefahr eines Wassereinbruchs in die Reaktionsgefäße besteht, und keine Aussage mehr möglich ist.

e) Ausrichtung der Reaktionsgefäße

Beim Zentrifugieren der Reaktionsgefäße ist auf eine einheitliche Ausrichtung der Reaktionsgefäße zu achten, damit bekannt ist, wo sich das Pellet befindet.

f) Behandlung der PCR-Reagenzien

Es ist dringend darauf zu achten, dass die Taq-Polymerase nicht länger als unbedingt notwendig bei Raumtemperatur gelagert wird. Am besten funktioniert es so, dass der Mastermix ohne die Taq-Polymerase hergestellt wird, und erst unmittelbar vor dem Verteilen auf die PCR-Reaktionsgefäße die Taq-Polymerase hinzugegeben wird. Der ganze Vorgang sollte auf Eis durchgeführt werden. Da eine Eismaschine recht teuer ist und nicht in jeder Brauerei vorhanden ist, ist es auch möglich, das Vorbereiten der PCR auf Eispacks durchzuführen.

Bei den Primern ist ein zu häufiges Auftauen und Einfrieren zu vermeiden. Hier ist es ratsam, nach Erhalt und Ausmischung der Primer diese zu aliquotieren und dann einzufrieren, so dass man die Primer nur noch ein- bis zweimal auftauen muß.

g) Arbeiten mit Ethidium-Bromid

Beim Arbeiten mit Ethidium-Bromid ist darauf zu achten, dass nur mit Nitril-Handschuhen gearbeitet wird. Da sich Ethidium-Bromid in die DNA einlagert, ist dieser Stoff im höchsten Maße cancerogen. Die benutzten Handschuhe sind als Sondermüll getrennt zu entsorgen. Eine Kontamination mit Ethidium-Bromid von anderen Gegenständen außer-

halb der Dunkelkammer ist unbedingt zu verhindern. Ratsam ist es hier, sich von vornherein im Klaren zu sein, welche Gegenstände mit Ethidium-Bromid in Berührung kommen (z.B. UV-Schirm, Fotoapparat, Schüttler) und welche nicht (z.B. Transportgefäß für die unangefärbten Gele).

8 Zusammenfassung

In der heutigen Zeit werden immer größere Anforderungen an ein Bier gestellt. So muß ein Bier eine Mindesthaltbarkeit von 6 Monaten, teilweise von 12 Monaten aufweisen. Dies ist in mikrobiologischer Sicht nur durch eine vollkommene Abwesenheit von bierschädlichen Bakterien zu erreichen. Bereits ein bierschädlicher Keim kann unter ungünstigen Voraussetzungen ein Bier verderben. In den Brauereien haben sich zum Nachweis von bierschädlichen Bakterien bisher Flüssiganreicherungen in spezifischen Nährmedien und Membranfiltrationen mit Verbringen der Membran auf verschiedene Medien bewährt. Der Vorteil dieser Methoden ist die hohe Sicherheit beim Spurennachweis, der große Nachteil ist jedoch ein enormer Zeitbedarf zwischen Probenahme und Auswertung. Dies ist insbesondere im Bereich nach der Filtration des Bieres problematisch, da die Ergebnisse erst nach Verkauf des Bieres vorliegen und somit keine Einflußmöglichkeiten der Brauerei mehr gegeben sind.

Die hier vorgestellte Methode für den Nachweis von bierschädlichen Bakterien mit PCR erlaubt einen schnellen und sicheren Nachweis. Bei der Entwicklung wurden verschiedene Teilbereiche der Arbeit getrennt voneinander behandelt. Dies sind die Voranreicherung, der Zellaufschluß, die PCR und die Erprobung der Laborergebnisse in der Praxis. Daher wurde auch die Gliederung der Arbeit in diese Teiluntersuchungen unterteilt. Dies dient der Übersichtlichkeit der Arbeit.

Der Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Schnelldachweismethoden mit der PCR-Technik ist die Verwendung von universellen Primern. Damit ist ein schneller, sicherer und kostengünstiger Nachweis auf Keimfreiheit gewährleistet. Das grundlegend Neue an dieser Arbeit ist die Entwicklung und Zusammenführung von einem einfachen aber sensitiven Zellaufschluß und einer PCR mit universellen Primern unter der Berücksichtigung der Matrix Bier und NBB-C. Die Voranreicherung mit NBB-C gewährleistet ein Wachstum von bierschädlichen Keimen, während harmlose Begleitorganismen im Wachstum gehemmt werden. Eine 40-stündige Voranreicherung der Probe ist nötig, damit auch die am schwersten wachsenden Keime, wie *L. lindneri* und *P. damnosus* ausgehend von einer Zelle, die in der lag-Phase vorliegt, auf 1000 Zellen kommen.

Diese 1000 Zellen / Probe sind die Nachweisgrenze, die sich mit dem hier vorgestellten Verfahren erreichen lassen. Durch die spezifische Voranreicherung werden nur bierschädliche Keime vermehrt. Daher sind sämtliche Keime, die durch die universellen Primern detektiert werden, bieschädlicher Natur. Der entwickelte Zellaufschluß ist einfach, schnell und sensitiv und damit in Brauereilaboratorien effektiv einsetzbar.

9 Literatur

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis J., Raff, M., Roberts, K., und Watson, J. D., *Molekularbiologie der Zelle*, 3. Auflage, Wiley/VCH, Weinheim, 1995.
2. Amillis, M., Francino, O., Jansa, M., und Sanchez, A., Isolation of genomic DNA from milk samples by using Chelex resin. *Journal of Dairy Research*. 64: 231-238, 1997.
3. Back, W. : *Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie*, Band I, Verlag Hans Carl, Nürnberg, 1994.
4. Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., L.K. und Gannon, F., The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl.* 1: 51-56, 1991.
5. Bej, A.K., Steffan, R.J., DiCesare, J., Haff, L., und Atlas, R.M., Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 307-314, 1990.
6. Dachs, E., NBB - Nachweismedium für bierschädliche Bakterien. *Brauwelt* 121,46:1778-1784, 1981.
7. DiMichele, L.J., und Lewis M.J., Rapid, species-specific detection of lactic acid bacteria from beer using the polymerase chain reaction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 51/2: 63-66, 1999.
8. Dürr P., Luftkeimindikation bierschädlicher Bakterien. *Brauwelt* 123, 39: 1652-1659, 1983.
9. Gouws, P.A., Visser, M., und Brözel, V.S., A polymerase chain reaction procedure for the detection of *Salmonella* spp. within 24 hours. *J. Food Prot.* 61:1039-1042, 1998.
10. Graham, T., Golsteyn-Thomas, E.J., Gannon, V. P.-J., und Thomas J.E., Genus- and species-specific detection of *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction essays targeting the 16S/23S intergenetic spacer region of the rRNA operon. *Can. J. Microbiol.* 42: 1155-1162, 1996.
11. Gürtler, V., und Barrie, H.D., Typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142: 3-16, 1995.

12. Herman, L.M.F., Vaerewijck, M.J.M., Moermans, R. J. B., und Waes, G. Ma. A. V. J., Identification and detection of *Bacillus sporothermodurans* spores in 1, 10, and 100 milliliters of raw milk by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* Aug.: 3139-3143, 1997.
13. Jaulhac, B., Reyrolle, M., Sodahlon, Y. K., Jarraud, S., und Kubina, M., Comparison of sample preparation methods for detection of *Legionella pneumophila* in culture-positive bronchoalveolar lavage fluids by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36/7: 2120-2122, 1998.
14. Jespersen, L., und Jakobsen, M., Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiology.* 33:139-155; 1996.
15. Juvonen R., Satokari, R., Mallison, K., und Haikara A., Detection of spoilage bacteria in beer by polymerase chain reaction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57:99-103, 1999.
16. Leibhard, S., Nickel, A., Back, W., Bohak, I., Smida, J., Hieber, L., Eckardt-Schupp, F., Arbitrary-PCR: Eine neue Methode zum raschen Nachweis und zur raschen Identifizierung von Brauereiorganismen. *Monatsschrift für Brauwissenschaft.* 7/8: 224-231, 1995.
17. Lewin B.: *Gene*, 2. Auflage, Wiley/VCH, Weinheim, 1991.
18. Lewington, J., Greenaway, S.D., und Spillane B.J., Rapid small scale preparation of bacterial genomic DNA, suitable for cloning and hybridization analysis. *Letters in Applied Microbiology.* 5:51-53, 1987.
19. Khan, A. A., und Cerniglia C. E., Rapid and sensitive method for the detection of *Aeromonas caviae* and *Aeromons trota* by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology.* 24: 233 - 239, 1997.
20. Kunze, W., *Technologie Brauer und Mäzer*, 8. Auflage, VLB Berlin, Verlagsabteilung, Berlin: 19-20, 1998.
21. Mullis, K. B., und Faloona, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350, 1987.
22. Nakagawa, T., Shimada, M., Mukai, H., Azada, K., Kato, I., Fujino, K., und Sato, T., Detection of alcohol-tolerant hiochi bacteria by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* Feb.: 637-640, 1994.

23. Priest, F.G., und Campbell, I., Gram-positive Brewery Bacteria. In *Brewing Microbiology*. Elsevier Applied Science, London und New York: 121-154, 1987.
24. Schlegel, H. G., *Allgemeine Mikrobiologie*, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1992.
25. Silberhumer, H., und Jäger, P., Zum Nachweis von bierschädlichen Bakterien mit NBB-Konzentrat. *Mitteilungen der Versuchsstation für das Gärungsgewerbe in Wien*, 5/6: 60-62, 1983.
26. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., und Holt, J.G., Regular, nonsporulating gram-positive rods. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore und Tokyo. Vol.2, pp.1208-1260, 1986.
27. Storgårds, E., Suihko, M.-L., Pot, B., Vanhonacker, K., Janssens, D., Broomfield, P.L.E., und Banks, J.G., Detection and identification of *Lactobacillus lindneri* from brewery environments. *J. Inst. Brew.* Jan.-Feb.; 104: 47-54; 1998.
28. Sweet, D., Lorente, M., Valenzuela, A., Lorente, J.A., und Alvarez, J.C., Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method. *Forensic Science International*, 83: 167-177, 1996.
29. Tilsala-Timisjarvi, A., und Alatossava, T., Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int. J. Food Microbiol.* Mar. 18; 35(1): 49-56, 1997.
30. Trachsel, H.: *Einführung in die Molekularbiologie - Skript für Studierende der Human- und Veterinärmedizin*, Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Bern, 1996.
31. Tsuchiya, Y., Kaneda, H., Kano, Y., und Koshina, S., Detection of beer spoilage Organisms by polymerase chain reaction technology, *J. Am. Soc. Brew. Chem*, 50/2: 64-67, 1992
32. Vogeser, G., Winnewisser, W., und Geiger, E., Anwendungen der PCR im Brauereibereich, *Brauwelt*, 33: 1635-1637, 1995.
33. Watson, J. D., Crick, F. H. C., Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737-738, 1953.
34. Woese, C. R., Bacterial Evolution, *Microbiol. Rev.*, 51: 221-272, 1987