

Technische Universität München
Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II

**Entwicklung und Optimierung von PCR-Methoden zur
Detektion und Identifizierung von brauereirelevanten Mikro-
organismen zur Routine-Anwendung in Brauereien**

Andreas Brandl

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

Doktor - Ingenieurs

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dr.-Ing. habil. Ulrich Kulozik

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Eberhard Geiger

2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudi F. Vogel

3. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Frank-Jürgen Methner,
Technische Universität Berlin

Die Dissertation wurde am 27.03.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 29.06.2006 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von August 2001 bis März 2005 während meiner Tätigkeit am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II der Technischen Universität München in Weihenstephan.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Eberhard Geiger für die Bereitstellung des Themas sowie des Arbeitsplatzes bedanken. Sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit sowie die anregenden und angenehmen Diskussionen trugen maßgeblich zum Gelingen der Arbeit bei.

Frau Dr. Gudrun Vogeser, Dipl.-Ing. Thomas Schuhbeck und Dr.-Ing. Andreas Scherer möchte ich danken für die fachliche Unterstützung in molekularbiologischen Fragestellungen. An dieser Stelle möchte ich auch die Teilnehmer des EU-Projektes „BREWPROC“ für die erfolgreiche Kooperation und die zahlreichen Inspirationen im Hinblick auf meine Arbeit erwähnen.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern und Kollegen des Lehrstuhls für die gute Zusammenarbeit und die jederzeit vorhandene Unterstützung. Der freundschaftliche und kollegiale Geist am Lehrstuhl sorgten stets die nötige Motivation und für ein angenehmes und unbeschwertes Arbeiten.

Besonders hervorheben möchte ich hierbei den Einsatz von Petra Greim, Analilia Nowak, Susan Illing und Jacqueline Lorenz ohne deren Unterstützung die Vielzahl an Versuchen nicht durchführbar gewesen wäre.

Für den reibungslosen Ablauf von bürokratischen Formalitäten und finanziellen Abläufen bin ich Frau Christel Volkhart und Frau Hildegard Giebels zu großem Dank verpflichtet.

Die im Rahmen meiner Versuche durchgeführten Semester- bzw. Diplomarbeiten von Andreas Zeller, Armin Dirscherl, Panit Kitsubun, Martin Nagel und Darko Zimmer hatten ebenfalls entscheidenden Anteil am Entstehen der vorliegenden Arbeit.

Für Mithilfe bei der Korrektur der Arbeit möchte ich mich bei Dr.-Ing. Urs Wellhoener recht herzlich bedanken.

Meiner Freundin Beate Hack gilt ein besonders inniger Dank für ihre Unterstützung während des ganzen Entstehungszeitraums der Arbeit. Ihr Verständnis und ihre Geduld gaben mir die nötige Sicherheit und Rückhalt für meine tägliche Arbeit.

Abschließend möchte ich meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung und das große Vertrauen, das sie in mich gesetzt haben, danken. Ihre finanzielle und menschliche Unterstützung während all der Jahre, bildeten den Grundstein für einen erfolgreichen Ausbildungsweg. Aus diesem Grund möchte ich die vorliegende Arbeit meinen Eltern Sieglinde und Fritz Brandl widmen.

Inhaltsverzeichnis	
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 EINLEITUNG	1
2 MATERIAL UND METHODEN	4
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	4
2.1.1 Kultivierung, Voranreicherung und Stammhaltung von Mikroorganismen	4
2.1.2 DNA Präparation	4
2.1.3 PCR	4
2.1.4 Elektrophorese und Auswertung	5
2.2 Reagenzien und Chemikalien	5
2.2.1 Medienzusätze zur Kultivierung von Mikroorganismen	5
2.2.2 DNA Präparation	5
2.2.3 PCR	5
2.2.4 Gelelektrophorese	6
2.3 Nährmedien	6
2.3.1 Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien	6
2.3.2 Nährmedien zur Kultivierung von Fremdhefen	7
2.4 Mikroorganismen, Stammhaltung und Kultivierung	7
2.5 Voranreicherung bierschädlicher Bakterien	10
2.5.1 Verwendete Nährmedien	10
2.5.2 Animpfen	11
2.5.3 Anreicherung und Wachstumskontrolle von Filtratproben	11
2.5.4 Anreicherung und Wachstumskontrolle von Unfiltratproben	12
2.6 Voranreicherung brauereirelevanter Fremdhefen	12
2.6.1 Verwendete Nährmedien	12
2.6.2 Animpfen	12
2.6.3 Anreicherung von Hefen in MYPG, MYPG + CuSO ₄ und EV-Bier	13
2.6.4 Anreicherung und Wachstumskontrolle der Fremdhefen in Unfiltrat	13
2.7 DNA-Isolationsmethoden für unterschiedliche Probenarten	13
2.7.1 Gewinnung aufgereinigter gDNA	14
2.7.2 DNA-Isolation für bierschädliche Bakterien aus filtrierbaren Proben	14
2.7.2.1 PCMF-Filteraufschluss	14
2.7.2.2 DNA-Isolation mittels CellTrap-Filter	14
2.7.3 DNA-Isolation für bierschädliche Bakterien aus unfiltrierbaren Proben	15
2.7.3.1 Kugelaufschluss-B (Kugelaufschluss für Bakterien)	15
2.7.3.2 Kochaufschluss-B (Kochaufschluss für Bakterien)	16
2.7.3.3 InstaGene Matrix	16
2.7.3.4 Bugs´n Beads	16
2.7.4 DNA-Isolation von bierschädlichen Bakterien aus Ernte- und Anstellhefe	17

2.7.5	DNA-Isolation für Hefen	17
2.7.5.1	Kugelaufschluss-H	17
2.7.5.2	IGM	17
2.8	DNA-Konzentrationsmessung	17
2.9	Lebend/Tot-Differenzierung mittels EMA-PCR	18
2.10	PCR	18
2.10.1	Standard PCR	19
2.10.2	Real-Time PCR	20
2.10.2.1	TaqMan PCR (5'-Nuclease Assay)	20
2.10.2.2	LightCycler PCR (Hybridisation-Probes)	22
2.10.2.3	Multiplex Real-Time PCR	22
2.10.3	PCR-Quantifizierung, Effizienz und statistische Analyse	23
2.10.4	Spezifität und Sensitivität von PCR-Systemen	24
2.11	Gelelektrophorese	25
2.12	Sequenzierung von PCR-Produkten	26
2.13	PCR Praxistests in Brauereien	26
3	PCR PRIMER- UND SONDENDESIGN	27
3.1	Primer- und Sondendesign zur Bakterienidentifizierung	27
3.2	Primer- und Sondendesign zur Hefeidentifizierung	29
3.2.1	Design der Assays Sce und Sbp	32
3.2.2	Design des UG300-Assays	33
3.2.3	Design des Sdi Assays	33
4	OPTIMIERUNG DER PCR-PROBENAUFARBEITUNG	37
4.1	Verbesserte Methoden zur kulturellen Voranreicherung bierschädlicher Bakterien für nachfolgende PCR	37
4.1.1	Ausgangssituation	37
4.1.2	Auswirkungen einer Membranfiltration auf eine nachfolgende Anreicherung	39
4.1.3	Zusammenhang zwischen Nachweisgeschwindigkeit und Selektivität	40
4.1.3.1	Nachweisgeschwindigkeit bei Milchsäurebakterien	40
4.1.3.2	Nachweisgeschwindigkeit bei <i>Pectinatus/Megasphaera</i>	44
4.1.3.3	Selektivität verschiedener Anreicherungsverfahren anhand von Keimgemischen	46
4.1.4	Optimierte Voranreicherung für filtrierbare Proben mit nachfolgender PCR	47
4.1.5	Optimierte Voranreicherung für unfiltrierbare Proben mit nachfolgender PCR	49
4.1.5.1	Optimierte Voranreicherung für Unfiltratproben	49
4.2	Verbesserte Methoden zur kulturellen Voranreicherung von Fremdhefen für nachfolgende PCR	50
4.2.1	Ausgangssituation	50
4.2.2	Voranreicherung mit MYPG bzw. MYPG+CuSO ₄	51
4.3	Optimierte DNA-Isolation und Beseitigung von PCR-Inhibitoren	55

4.3.1	Probenverarbeitung und DNA Isolation aus filtrierbaren bakterienhaltigen Proben	56
4.3.1.1	Ausgangssituation	56
4.3.1.2	Filteraufschluss mit PCMF – Optimierung der Methode	57
4.3.1.2.1	Beseitigung PCR-inhibierender Stoffe durch Waschschr	57
4.3.1.2.2	Inaktivierung von PCR-Inhibitoren durch BSA-Zugabe	58
4.3.1.3	Filteraufschluss mit PCMF – Sensitivität der optimierten Methode	60
4.3.1.4	DNA-Isolation mit CellTrap-Filtern – Optimierung der Methode	61
4.3.1.5	DNA-Isolation mit CellTrap-Filtern – Sensitivität der optimierten Methode	62
4.3.2	Probenverarbeitung und DNA-Isolation aus unfiltrierbaren Proben	62
4.3.2.1	Ausgangssituation	62
4.3.2.2	Probenverarbeitung und DNA Isolation aus Gär- und Lagertankproben	63
4.3.2.3	Probenverarbeitung und DNA-Isolation aus Anstellhefe	64
4.3.3	Probenverarbeitung und DNA-Isolation zum PCR Nachweis von Hefen	66
4.3.3.1	Optimierung des Kugelaufschlusses-H	66
4.3.3.2	DNA-Isolation aus Hefe - Prinzipielle Eignung der IGM-Methode	67
4.4	Innovative Ansätze zur Lebend/Tot-Differenzierung mittels EMA-PCR	68
4.4.1	Ausgangssituation	68
4.4.2	Probenbehandlung mit EMA	69
4.4.3	Auswirkungen von EMA auf freie DNA	69
4.4.4	Auswirkungen von EMA auf lebende und tote Zellen	69
4.4.4.1	Optimierung der EMA-Konzentration und der Einwirkdauer	70
5	OPTIMIERUNG VON PCR-REAKTIONEN	72
5.1	Optimierung der PCR-Reaktionskomponenten	72
5.1.1	Primerkonzentration	72
5.1.2	MgCl ₂ -Konzentration	72
5.1.3	PCR-Enhancer	73
5.2	Multiplex Real-Time PCR	73
5.2.1	Wahl der Sonden für Multiplex Real-Time PCR	73
5.2.2	Grenzen von Multiplex Real-Time PCR-Anwendungen	75
5.3	Optimierung des Temperaturprotokolls über Gradienten-PCR	75
5.4	Integration interner Amplifikationskontrollen (IAC)	76
6	NEU ENTWICKELTE PCR-ASSAYS	78
6.1	PCR-Assays zum Nachweis bierschädlicher Bakterien	78
6.1.1	sLP600 - Screening-System für Laktobazillen und Pedikokken	78
6.1.1.1	sLP600 – Reaktionsbedingungen und Spezifität	78
6.1.1.2	sLP600 - Sensitivität und PCR-Effizienz ohne IAC	80
6.1.1.3	sLP600 - Sensitivität und PCR-Effizienz mit IAC	82
6.1.2	Identifizierungssysteme für Milchsäurebakterien	83
6.1.2.1	Identifizierungsassays für Milchsäurebakterien - Reaktionsbedingungen und Spezifität	83
6.1.2.2	Identifizierungsassays für Milchsäurebakterien - Sensitivität und PCR Effizienz	85
6.1.3	sPM – Screening-System zum Nachweis von <i>Pectinatus</i> spp. und <i>Megasphaera cerevisiae</i>	85
6.1.3.1	sPM – Reaktionsbedingungen und Spezifität	86
6.1.3.2	sPM - Sensitivität und PCR-Effizienz ohne IAC	86
6.1.4	sLPPM – Multiplex Screening-System für bierschädliche Bakterien	86
6.1.4.1	sLPPM – Reaktionsbedingungen und Spezifität	86

6.1.4.2	sLPPM - Sensitivität und PCR-Effizienz mit IAC	87
6.1.5	iLbcp – Multiplexsystem zum Nachweis von <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> und <i>P. damnosus</i>	87
6.1.5.1	iLbcp – Reaktionsbedingungen und Spezifität	87
6.1.5.2	iLbcp – Sensitivität und PCR-Effizienz mit IAC	87
6.2	PCR-Assays zum Nachweis von Hefen	88
6.2.1	Sce – Nachweis von <i>S. cerevisiae</i>	88
6.2.1.1	Sce - Reaktionsbedingungen und Spezifität	88
6.2.1.2	Sce – Sensitivität und PCR-Effizienz	89
6.2.2	Sbp – Nachweis von <i>S. bayanus</i> und <i>S. pastorianus</i>	89
6.2.2.1	Sbp - Reaktionsbedingungen und Spezifität	90
6.2.2.2	Sbp – Sensitivität und PCR-Effizienz	91
6.2.3	UG300 – Nachweis untergäriger Brauhefen	91
6.2.3.1	UG300 - Reaktionsbedingungen und Spezifität	91
6.2.3.2	UG300 – Sensitivität und PCR-Effizienz	92
6.2.4	Sdi – Nachweis von <i>S. diastaticus</i>	92
6.2.4.1	Sdi - Reaktionsbedingungen und Spezifität	92
6.2.4.2	Sdi - Sensitivität und PCR-Effizienz	92
6.2.5	Identifizierungssysteme für Nicht- <i>Saccharomyces</i> Hefen	92
6.2.5.1	Identifizierungsassays für NS-FH - Reaktionsbedingungen und Spezifität	93
6.2.5.2	Identifizierungsassays für NS-FH - Sensitivität und PCR-Effizienz	93
6.2.6	sSdD – Multiplex-System zum Nachweis von <i>S. diastaticus</i> und <i>Dekkera</i> spp.	94
6.2.6.1	sSdD - Reaktionsbedingungen und Spezifität	94
6.2.6.2	sSdD - Sensitivität und PCR-Effizienz	94
7	UMSETZUNG DER PCR-ANALYTIK IN BRAUEREIEN	95
7.1	Material und Methoden	95
7.1.1	Verwendete PCR-Geräte und PCR-Assays	95
7.1.2	Versuchsplan Phase 1	96
7.1.2.1	Probenbearbeitung für PCR	97
7.1.2.2	Referenz-Kultivierungsmethode	97
7.1.2.3	Routine-Kultivierungsmethode	98
7.1.3	Versuchsplan Phase 2	98
7.1.3.1	Probenbearbeitung für PCR	99
7.1.3.1.1	Voranreicherung und DNA-Isolation für Gär- und Lagerkellerproben	99
7.1.3.1.2	Voranreicherung und DNA-Isolation für Anstellhefe	99
7.1.3.2	Referenz-Kultivierungsmethode	99
7.1.3.3	Routine-Kultivierungsmethode	99
7.1.4	Datenauswertung und Bewertung der PCR-Methode	100
7.1.4.1	Statistische Datenauswertung	100
7.1.4.2	Bewertung mittels Fragebögen	101
7.2	Ergebnisse der Brauerei-Tests	102
7.2.1	Phase 1 - Analysenergebnisse	102
7.2.2	Phase 1 - Fragebögen	103
7.2.3	Phase 2 - Analysenergebnisse	106
7.2.4	Phase 2 - Fragebögen	108
8	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	110
8.1	Voranreicherung	110

8.2 Probenverarbeitung	115
8.3 PCR-Optimierungen	119
8.4 PCR-Assays	120
8.5 Schlussfolgerungen der Brauereiversuche	125
9 ZUSAMMENFASSUNG	130
10 SUMMARY	132
11 LITERATURVERZEICHNIS	134
12 ANHANG	144

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematischer Aufbau und Funktionsweise der CellTrap-Filter	15
Abb. 2:	Schematische Darstellung der 18S, 5.8S, 26S und 5S rDNA von Hefen; zusätzlich gekennzeichnet ist die Lage der ITS und IGS-Regionen	29
Abb. 3:	DNA-Alignment verschiedener Hefen in der ITS1 und der 5.8S rDNA-Region; gelbe Markierungen: Polymorphismen zu <i>S. cerevisiae</i>	30
Abb. 4:	Ausschnitt aus ITS1-Sequenzdaten bereits sequenzierter Hefen und neu sequenzierter Brauhefen	32
Abb. 5:	Sequenz der PCR-Amplikons dreier untergäriger Hefen basierend auf dem UG300-Primersystem	33
Abb. 6:	Aufbau des <i>sta1</i> -Gens von <i>S. diastaticus</i>	34
Abb. 7:	Aufbau des <i>sta1</i> -Gens von <i>S. cerevisiae</i>	34
Abb. 8:	Primer (rot und blau) und Sonde (grün) des Sdi-Assays auf dem <i>sta1</i> -Gen von <i>S. diastaticus</i> . Zusätzlich dargestellt sind die Regionen S2 I, S1 II, S1 IS, S1 III und SGA IV von <i>S. cerevisiae</i> an der entsprechenden Stelle (siehe Abb. 6, Abb. 7)	35
Abb. 9:	Struktur der Glucomylasegene bei verschiedenen <i>Saccharomyces</i> -Hefen. Standard PCR mit Sdi-Assay (links) und Sdi2-Assay (rechts)	35
Abb. 10:	Ablaufschema PCR-Probenaufarbeitung	37
Abb. 11:	Anreicherung obligat und potentiell bierschädlicher Laktobazillen in verschiedenen Flüssignährmedien; Zeitdauer [h] bis zum Eintritt einer visuell feststellbaren Trübungszunahme	41
Abb. 12:	Anreicherung von <i>L. brevis</i> (BS 40) in verschieden konzentrierten Flüssignährmedien mit variierendem Bieranteil; CFU in 20 µl Aliquots nach definierten Zeitpunkten; (CFU ≥ 500 nicht mehr auszählbar; CFU ≥ 500 sind als Ordinatenwert 500 dargestellt)	42
Abb. 13:	Anreicherung von <i>L. plantarum</i> (BS 285) in verschieden konzentrierten Flüssignährmedien mit variierendem Bieranteil; CFU in 20 µl Aliquots nach definierten Zeitpunkten; (CFU ≥ 500 nicht mehr auszählbar; CFU ≥ 500 sind als Ordinatenwert 500 dargestellt)	42
Abb. 14:	Anreicherung von <i>L. brevis</i> (BS 40) in verschieden konzentrierten Flüssignährmedien mit variierendem Bieranteil; PCR Ct-Werte nach definierten Zeitpunkten	43
Abb. 15:	Anreicherung von <i>L. plantarum</i> (BS 285) in verschieden konzentrierten Flüssignährmedien mit variierendem Bieranteil; PCR Ct-Werte nach definierten Zeitpunkten	43
Abb. 16:	Anreicherung von <i>Pectinatus</i> spp. und <i>Megasphaera cerevisiae</i> in verschiedenen Flüssignährmedien; Zeitdauer [h] bis zum Eintritt einer visuell feststellbaren Trübung	45
Abb. 17:	Anreicherung von <i>Pectinatus</i> spp. und <i>Megasphaera cerevisiae</i> in verschiedenen Flüssignährmedien; PCR Ct-Werte nach 72 h	45
Abb. 18:	Anreicherung verschiedener Milchsäurebakterien in 2x MRSF/2x MIB mit unterschiedlichem Unfiltratanteil; Überprüfen der Wachstumsgeschwindigkeit anhand der PCR Ct-Werte zu definierten Zeitpunkten	50
Abb. 19:	PCR-Nachweis von <i>S. diastaticus</i> in Unfiltrat (WHB 34/70); MYPG + 0 ppm/125 ppm/250 ppm CuSO ₄ ; PCR Ct-Werte zu definierten Zeitpunkten	53
Abb. 20:	PCR-Nachweis von <i>S. diastaticus</i> in Unfiltrat (WHB 34/70 mit MYPG + 250 ppm CuSO ₄) und PCR-Nachweis von <i>S. diastaticus</i> in EV-Bier	54
Abb. 21:	Probenbearbeitungsschema zur Fremdhefeuntersuchung für untergärige und obergärige Brauweise	55

Abb. 22: Inhibierte DNA-Isolate nach PCMF-Aufschluss; Spülen der PCMF mit verschiedenen Flüssigkeiten/Chemikalien; Kontroll-DNA in jeder PCR-Reaktion: L. brevis-DNA (1 ng/Reaktion)	58
Abb. 23: PCR-Ergebnisse von DNA-Isolaten nach PCMF-Filteraufschluss unter Verwendung von PCR-Beads (linkes Bild) bzw. mit herkömmlicher Taq-Polymerase (rechtes Bild); PCR-Assay sLP200	59
Abb. 24: PCR-Ergebnisse von DNA-Isolaten nach PCMF-Filteraufschluss unter Verwendung von herkömmlicher Taq-Polymerase ohne BSA (Spur 1-4) bzw. mit BSA (Spur 6-9); PCR-Assay sLP200	59
Abb. 25: PCR Ct-Werte verschiedener Hefe-DNA Isolate; Einsatz von Beads mit verschiedenen Durchmessern (0,11 und 0,5 mm) zum Zellaufschluss; mit/ohne Hitzeinkubation (H)	67
Abb. 26: Auswirkungen einer EMA-Behandlung (50 µg/ml) auf freie DNA; PCR-Assay: sLP600 mit IAC	69
Abb. 27: Auswirkungen einer EMA-Zugabe zu lebenden Zellen (L. casei BS 3, L. lindneri BS 4); EMA-Zugabe: 25 µg/ml; CFU auf MRS-Agar nach 7 Tagen	71
Abb. 28: Auswirkungen verschiedener MgCl ₂ -Konzentrationen auf die PCR-Effizienz	73
Abb. 29: Fourplex-PCR mit den Reporter-Farbstoffen FAM, HEX, ROX und CY5 unter Verwendung von BH-Quenchern	74
Abb. 30: Temperaturgradienten-PCR für das Lli-Assay	76
Abb. 31: Sensitivität des sLP600-Assays ohne IAC; L. brevis Rein-DNA von 500 pg-50 fg (n = 3)	80
Abb. 32: Lineare Regression des sLP600-Assays ohne IAC; L. brevis Rein-DNA von 500 pg-50 fg (n = 3)	80
Abb. 33: Sensitivität des sLP600-Assays ohne IAC anhand einer L. brevis-Verdünnungsreihe (BS 40); 7*10 ³ – 7*10 ¹ Zellen/ml	81
Abb. 34: Zusammenhang zwischen Stärke des IAC-Signals und eingesetzter Menge an Ziel-DNA (L. brevis BS 40)	82
Abb. 35: Vergleich der PCR Ct-Werte von S. bayanus/S. pastorianus und untergäriger Brau- hefen bei Verwendung des Sbp-Assays	91
Abb. 36: Probenuntersuchungsschema in Phase 1	97
Abb. 37: Probenuntersuchungsschema in Phase 2	98
Abb. 38: Gegenüberstellung zweier Analysenmethoden (Standard Methode und alternative Methode) zur Berechnung der Kontingenz-Kennzahlen	101

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien	6
Tab. 2:	Nährmedien zur Kultivierung von Fremdhefen	7
Tab. 3:	Verwendete Bakterienstämme	7
Tab. 4:	Verwendete Hefestämme	8
Tab. 5:	Unterschiedlich konzentrierte Nährmedien zum Nachweis bierschädlicher Bakterien mit Angabe zu deren Einsatz-Verhältnis (Medium/Bier/ddH ₂ O)	10
Tab. 6:	PCR-Mix Zusammensetzung für Standard PCR	19
Tab. 7:	Temperaturprotokoll für Standard PCR	19
Tab. 8:	PCR-Mix Zusammensetzung für Real-Time PCR	21
Tab. 9:	Temperaturprotokoll für Real-Time PCR	21
Tab. 10:	PCR-Mix Zusammensetzung für Real-Time PCR bei Verwendung eines Real-Time PCR-Mastermix	21
Tab. 11:	Elektrophoresebedingungen für Agarose-Gelelektrophorese	26
Tab. 12:	Standard PCR und Real-Time PCR Primersysteme zum Nachweis bierschädlicher Bakterien	28
Tab. 13:	Sondensequenzen und Reporter/Quencher-Kombinationen zum Nachweis bierschädlicher Bakterien	29
Tab. 14:	Real-Time PCR Primersysteme zum Nachweis brauereinrelevanter Hefen	31
Tab. 15:	Sondensequenzen und Reporter/Quencher-Kombinationen zum Nachweis brauereirelevanter Hefen	31
Tab. 16:	Auswirkung einer Membranfiltration auf eine nachfolgende Kultivierung obligat bierschädlicher Keime; Dreifachbestimmung pro Keim und Methode	40
Tab. 17:	Anreicherung von Keimgemischen in verschiedenen konzentrierten Flüssignährmedien mit variierendem Bieranteil; Zeitdauer [h] bis zum Eintritt einer visuell feststellbaren Trübung und mikroskopischer Befund des Wachstums	47
Tab. 18:	Anreicherung von Keimgemischen in verschiedenen konzentrierten Flüssignährmedien mit variierendem Bieranteil; PCR C _T -Werte nach 72 h	47
Tab. 19:	Nachweisgeschwindigkeit verschiedener Milchsäurebakterien ohne/mit vorausgehender Filtration; PCR C _T -Werte zu definierten Zeitpunkten	49
Tab. 20:	Sichtbare Trübung der Anreicherung und CFU in 20 µl Aliquots (MYPG + 0, 100, 200 und 250 ppm CuSO ₄) zu definierten Zeitpunkten (0, 24, 48, 72 h)	52
Tab. 21:	Sichtbare Trübung der Anreicherung und CFU in 20 µl Aliquots (MYPG + 200/300 ppm CuSO ₄)	52
Tab. 22:	Auswirkungen einer BSA-Zugabe auf inhibierte DNA-Isolate bei Verwendung verschiedener Polymerasen (Standard und Real-Time PCR); DNA-Isolate aus PCMF-Filteraufschluss	60
Tab. 23:	Sensitivität des PCMF-Filteraufschlusses; PCR C _T -Werte: Mittelwert und Standardabweichung (n = 3)	61
Tab. 24:	DNA-Isolation mittels CellTrap-Filter; Auswirkung eines Waschschruttes auf die PCR-Ergebnisse; (n = 2)	62
Tab. 25:	Erreichbare PCR-Nachweisgrenze mit Hilfe der CellTrap-Filter im Vergleich zum PCMF-Filteraufschluss; PCR C _T -Werte: Mittelwert und Standardabweichung (n = 3)	62
Tab. 26:	Vergleich der PCR C _T -Werte vier verschiedener DNA-Isolationsmethoden aus Unfiltrat (Hefezellzahl 1,2*10 ⁷ Zellen/ml); PCR C _T -Werte: Mittelwert und Standardabweichung (n = 3)	63

Tab. 27: Vergleich von Kugelaufschluss-B und IGM; Zellen beimpft in pasteurisiertes Bier; mit $1,2 \cdot 10^7$ Hefezellen/ml versetzt; PCR C_T -Werte: Mittelwert und Standardabweichung (n = 3)	64
Tab. 28: Vergleich der PCR C_T -Werte dreier verschiedener DNA-Isolationsmethoden aus Anstellhefe (Hefezellzahl $2 \cdot 10^9$ Zellen/ml); PCR-Assay: sLP600 mit IAC; PCR C_T -Werte: Mittelwert und Standardabweichung (n = 3)	64
Tab. 29: Methodenvariation zur DNA-Isolation bierschädlicher Bakterien aus Anstellhefe; Methode 1: Kugelaufschluss-B ohne Zentrifugation der Überschusshefe; Methode 2: Zentrifugation der Überschusshefe und Verwendung des Überstandes für Kugelaufschluss-B; PCR C_T -Werte: Mittelwert und Standardabweichung (n = 3)	66
Tab. 30: Prinzipielle Eignung der IGM-Methode für die DNA-Isolation aus Hefen (Zellzahl $\sim 10^6$ Zellen/ml); PCR C_T -Werte: Mittelwert und Standardabweichung (n = 3)	67
Tab. 31: Vergleich zwischen Kugelaufschluss-H und IGM zur DNA-Isolation aus Hefen; PCR C_T -Werte: Mittelwert und Standardabweichung (n = 3)	68
Tab. 32: Auswirkungen unterschiedlicher EMA-Behandlungen auf verschiedene Milchsäurebakterien (BS 40, BS 4, BS 3, BS 41; $\sim 10^6$ Zellen/500 μ l); PCR-Assay: sLP600 mit IAC	70
Tab. 33: Auswirkungen unterschiedlicher EMA-Behandlungen auf <i>Pectinatus frisingensis</i> (BS 42) und <i>Megasphaera cerevisiae</i> (BS 46, $\sim 10^6$ Zellen/500 μ l); PCR-Assay: sPM mit IAC	71
Tab. 34: Reporter/Quencher-Kombination bei einer 4-Kanal-Multiplex-PCR (Fourplex-PCR)	74
Tab. 35: Vergleich zwischen separaten Assays und Multiplex-Assays bei identischer Ziel-DNA; (n = 3)	75
Tab. 36: Spezifität des sLP600-Assays	79
Tab. 37: PCR- C_T -Werte und PCR-Kennzahlen zur Bestimmung der Sensitivität des sLP600-Assays ohne IAC; <i>L. brevis</i> Rein-DNA von 500 pg-50 fg (n = 3)	81
Tab. 38: Modifiziertes Temperaturprotokoll für Real-Time PCR	84
Tab. 39: Spezifität der Identifizierungsassays für Milchsäurebakterien	84
Tab. 40: Sensitivitäten der PCR-Identifizierungsassays für Milchsäurebakterien; Angabe der Nachweisgrenze in pg DNA und Zellen/ml	85
Tab. 41: Spezifität des Sce-Assays	89
Tab. 42: Spezifität des Sbp-Assays	90
Tab. 43: Spezifität der Identifizierungsassays für NS-FH	93
Tab. 44: Sensitivitäten der PCR-Identifizierungsassays für NS-FH; Angabe der Nachweisgrenze in pg DNA und Zellen/ml	93
Tab. 45: Verwendete PCR-Formate in Phase 1	95
Tab. 46: Verwendete PCR-Formate in Phase 2	95
Tab. 47: Verwendete PCR-Kits während der Brauerei-Tests	96
Tab. 48: Routine-Kultivierungsmethoden der Brauereien in Phase 1	98
Tab. 49: Routine-Kultivierungsmethoden der Brauereien in Phase 2	100
Tab. 50: Auswertung der Analyseergebnisse aus Phase 1; Probenart: Filtrierbares Bier; Vergleich zwischen PCR (alternative Methode) und Routinemethode (Standardmethode)	102
Tab. 51: Bewertung der PCR-Tests in Phase 1 anhand eines Ranking-Systems (1 = sehr gut, 2 = gut, 3 = befriedigend, 4 = schlecht, 5 = sehr schlecht); Brauerei 1 + 5: Standard PCR, Brauereien 2-4: Real-Time PCR	104
Tab. 52: Subjektive Meinungen der Brauereien zu ausgewählten Aspekten der PCR-Analyse; Zahl der Ja/Nein-Nennungen	105

Tab. 53: Auswertung der Analysenergebnisse aus Phase 2; Probenart: Unfiltrat aus Gär- und Lagerkeller; Vergleich zwischen PCR (alternative Methode) und Routine- methode (Standardmethode)	107
Tab. 54: Auswertung der Analysenergebnisse aus Phase 2; Probenart: Anstell- und Erntehefe; Vergleich zwischen PCR (alternative Methode) und Routinemethode (Standardmethode)	107
Tab. 55: Übereinstimmung zwischen PCR und Referenzmethode bei 3-tägiger und 4-tägiger Voranreicherung (Brauerei 4)	108
Tab. 56: Bewertung der PCR-Tests in Phase 2 anhand eines Ranking-Systems (1 = sehr gut, 2 = gut, 3 = befriedigend, 4 = schlecht, 5 = sehr schlecht); Brauerei 2 + 5: TaqMan Real-Time PCR; Brauerei 3+4: LightCycler Real-Time PCR	108
Tab. 57: Subjektive Meinungen der Brauereien zu ausgewählten Aspekten der PCR-Analyse; Zahl der Ja/Nein-Nennungen	109

Abkürzungsverzeichnis

ABI	Applied Biosystems
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BE	Bittereinheiten [mg iso- α Säure/l]
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BH	Black Hole Quencher
bp	Basenpaare
100 bpl	100-Basenpaarleiter
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
BVF	Bügelverschlußflasche
CFU	Colony Forming Units (Koloniebildende Einheiten)
CBS	Centrallbureau voor Schimmelcultures
C _t	Cycle threshold (PCR-Schwellenwert)
Ctr	PCR-Assay zur Identifizierung von <i>Candida tropicalis</i>
Cy5	Indodicarbocyanin
d	Tag
Dan	PCR-Assay zur Identifizierung <i>Dekkera anomala</i>
Dbr	PCR-Assay zur Identifizierung <i>Dekkera bruxellensis</i>
dd	bidestilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotid
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EAC	External Amplification Control (Externe Amplifikationskontrolle)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	Ethidiumbromid Monoazid
ETS	External Transcribed Spacer
EV-Bier	Endvergorenes Bier
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
gDNA	genomische DNA
HEX	Hexachloro-6-Carboxy-Fluorescein
IAC	Internal Amplification Control (Interne Amplifikationskontrolle)
IGM	InstaGene Matrix
IGS	Intergenic Spacer
iLbcp	PCR-Assay zur Identifizierung von <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> und <i>P. damnosus</i>
iLbr	PCR-Assay zur Identifizierung von <i>L. brevis</i> und <i>L. brevissimilis</i>
iLbu	PCR-Assay zur Identifizierung von <i>L. buchneri</i> und <i>L. parabuchneri</i>
iLca	PCR-Assay zur Identifizierung von <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> und <i>L. zeae</i>
iLcol	PCR-Assay zur Identifizierung von <i>L. collinoides</i> und <i>L. paracollinoides</i>
iLcor	PCR-Assay zur Identifizierung von <i>L. coryniformis</i>
iLli	PCR-Assay zur Identifizierung von <i>L. lindneri</i>
iLpe	PCR-Assay zur Identifizierung von <i>L. perolens</i>
iLpl	PCR-Assay zur Identifizierung von <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> und <i>L. pentosus</i>
iPda	PCR-Assay zur Identifizierung von <i>P. damnosus</i>
ITS	Internal Transcribed Spacer
KZE	Kurzzeiterhitzung
L	<i>Lactobacillus</i>
Lst II	Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II
LSU	Large Sub-Unit
MIB	Micro Inoculum Broth

min	Minuten
MDR	Multidrug Resistance
MRS	Nährmedium nach DeMan, Rogosa, Sharpe
MRSF	Nährmedium nach DeMan, Rogosa, Sharpe + 1% Fruktose (g/v)
mRNA	Messenger RNA
MYPG	MYPG-Nährmedium (Malt extract, Yeast extract, Peptone, Glucose)
NB	Nutrient Broth
NBB	Nährboden für bierschädliche Bakterien
NCBI	National Center for Biotechnology Information
neg	negativ
NS-FH	Nicht <i>Saccharomyces</i> -Fremdhefen
NTC	No Template Control (PCR-Negativkontrolle)
<i>P</i>	<i>Pediococcus</i>
Pan	PCR-Assay zur Identifizierung <i>Pichia anomala</i>
PCMF	Polycarbonat Membranfilter
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
Pme	PCR-Assay zur Identifizierung <i>Pichia membranefaciens</i>
PVP	Polyvinylpyrrolidon
QS	Qualitätssicherung
R ²	Bestimmtheitsmaß der linearen Regression
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
rDNA	Ribosomale DNA
Re	Reynolds-Zahl
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonucleinsäure
ROX	6-Carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamin
RR-3	RakaRay-Nährmedium
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
<i>S</i>	<i>Saccharomyces</i>
Sbp	PCR-Nachweissystem für <i>S. bayanus/S. pastorianus</i>
Sce	PCR-Nachweissystem für <i>S. cerevisiae</i>
Sdi	PCR-Nachweissystem für <i>S. diastaticus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
S-FH	<i>Saccharomyces</i> -Fremdhefen
sLP600	PCR-Screening für bierschädliche Laktobazillen und Pediokokken
sLPPM	PCR-Screening für bierschädliche Laktobazillen/Pediokokken sowie <i>Pectinatus</i> spp. und <i>Megasphaera cerevisiae</i>
sPM	PCR-Screening für <i>Pectinatus</i> spp., <i>Megasphaera</i>
spp.	Subspezies
sSdD	PCR-Screening zum Nachweis von <i>S. diastaticus</i> und <i>Dekkera</i> spp.
SSU	Small Sub-Unit
Sx	PCR-Assay zur Identifizierung von <i>S. exiguus</i>
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
U	Umdrehungen
UG300	PCR-Nachweissystem zur Detektion untergäriger Brauhefen sowie <i>S. pastorianus</i> und einiger <i>S. bayanus</i> Stämme
UV	Ultraviolett
VTT	VTT Biotechnology, Finland
WHB	Hefebank Weihenstephan
WSYC	Weihenstephan Culture Collection of Yeast and Mould Strains
YPM	YPM-Nährmedium (Yeast extract, Pepton, Mannitol)

1 Einleitung

Problemstellung

Bier gilt im Hinblick auf die mikrobiologische Anfälligkeit als sicheres Getränk. Grund hierfür sind die selektiven Eigenschaften und Inhaltsstoffe von Bier wie niedriger pH-Wert (3,8-4,7), Ethanol (0,5-10 % g/v), Kohlendioxid (0,5-0,7 % g/g), wenig Sauerstoff (0,1-0,5 mg/l), wenig vergärbare Zucker und Hopfenbitterstoffe (10-45 BE). Dennoch gibt es eine Reihe von Bakterien und Hefen, die trotz dieser Bedingungen in Bier wachsen können und durch Säuerung, Trübung, Schleimbildung oder geschmacksaktive Stoffwechselprodukte zu einer Produktschädigung führen können. Hierbei handelt es sich meist um Laktobazillen und Pediokokken, die zusammen für 60-80 % aller Reklamationen verantwortlich sind. Fremdhefen oder strikt anaerobe Keime wie *Pectinatus* spp. und *Megasphaera cerevisiae* treten weniger häufig auf. Allerdings können die Metabolite dieser gram-negativen Bakterien (H₂S, Propionsäure, Buttersäure) zur Ungenießbarkeit des Produktes führen (BACK 1994, SAKAMOTO und KONINGS 2003).

Die zentralen Kriterien für die mikrobiologische QS von Lebensmittelbetrieben sind daher ein schneller Nachweis sowie eine sichere Identifizierung und Lokalisierung von potentiell und obligat schädlichen Mikroorganismen während des Herstellungsprozesses und im fertigen Produkt. Aufgrund der zunehmenden Globalisierung von Märkten und steigender Erwartungen der Konsumenten an die Produktqualität und -haltbarkeit ist auf der anderen Seite eine Weiterentwicklung der vorhandenen betrieblichen Analysenmethoden notwendig. Hinzu kommen neue Herausforderungen durch neue Gebindeformen, die teilweise keine Pasteurisation erlauben und dem Trend zu Bieren mit weniger Alkohol und Bittereinheiten (HAIKARA et al. 2003).

Konventionelle mikrobiologische Qualitätssicherungsmethoden (QS-methoden) in der Brauerei- und Getränkeindustrie beruhen meist auf kultureller Anreicherung. Die Ergebnisse dieser Verfahren liegen allerdings erst nach einigen Tagen oder sogar Wochen vor. Die Zuordnung der Befunde in Bezug auf das Schädlichkeitspotential ist oft schwierig und setzt erfahrenes Personal voraus. Weiterhin besteht die Gefahr von falsch-negativen Befunden, etwa durch schwer zu kultivierende oder vorgeschädigte Keime, die durch kulturelle Anreicherung nicht nachzuweisen sind (HAIKARA et al. 2003, MALORNY et al. 2003a). Eine aktive Prozesskontrolle sowie das Ergreifen von geeigneten und rechtzeitigen Gegenmaßnahmen sind mit diesen Methoden somit nur schwer zu realisieren. Aufgrund dieser Tatsachen ergibt sich ein Bedürfnis nach alternativen bzw. effektiveren Nachweismethoden (VAN DER VOSSSEN und HOFSTRA 1996).

Stand der Forschung

Seit einigen Jahren werden daher eine Reihe sogenannter „Schnellnachweismethoden“ diskutiert (STORGARDS et al. 1997, HUTTER 2000, THIELEN et al. 2001), wobei auch immer wieder die Polymerasekettenreaktion (PCR) als vielversprechende Methode erwähnt wird (TSUCHIGA et al. 1992; DIMICHELE und LEWIS. 1993; JUVONEN et al. 1999; HOMANN et al. 2003, METHNER et al. 2004). Bei der PCR werden Nukleinsäureabschnitte von Zielorganismen *in vitro* amplifiziert. Die entstehenden PCR-Produkte werden entweder zeitgleich zur PCR-Reaktion mittels Fluoreszenzfarbstoffen (Real-Time PCR) oder anschließend durch Gelelektrophorese nachgewiesen (Standard PCR oder Endpunkt PCR). Die Vorteile der PCR liegen in erster Linie in der Schnelligkeit, Sensitivität und Spezifität der Analyse. Allerdings gibt es auch Aspekte, die eine weitere Verbreitung und Akzeptanz beim Endanwender bisher verhindert haben. Die Neuartigkeit der Analyse und somit mangelnde Erfahrungswerte aus der Praxis, hohe Investitionskosten und laufende Kosten erschwerten bisher den Transfer von einer Labormethode hin zu einer routinetauglichen Praxismethode. Hinzu kommt das Fehlen von standardisierten Protokollen und einheitlichen PCR-Formaten zur Durchführung der PCR-Analytik (BURKARDT 2000, MALORNY et al. 2003a, CASEY und DOBSON 2004).

Lösungsansatz

Um das Potential der PCR-Analytik besser auszuschöpfen, wurden im Rahmen des EU-Projektes BREWPROC (QLK-CT-2000-01251) Methoden entwickelt und auf ihre Umsetzbarkeit in der Praxis getestet. Durch die Kooperation verschiedener europäischer Forschungsinstitute und Brauereien wurden die entwickelten PCR-Methoden direkt in Brauereien angewendet. Dabei wurden die zu untersuchenden Proben parallel mit PCR und der herkömmlichen Kultivierungsmethode untersucht. Die Auswertung der erzielten Analyseergebnisse sowie eine anschließende Bewertung der getesteten PCR-Protokolle und PCR-Assays sollten hierbei helfen, die vielversprechendsten Verfahren und Einsatzmöglichkeiten der PCR herauszufiltern.

Die Anforderungen, die eine routinetaugliche PCR-Schnellmethode erfüllen muss, lassen sich wie folgt zusammenfassen (BRANDL und GEIGER 2004):

- Sensitivität: Hoch (1 Keim/Probe)
- Spezifität: Hoch (Fragestellungen: Welcher Keim, produktschädlicher Keim, Ort der Kontaminationsquelle?)
- Handhabung: Schnell, einfach, ungefährlich
- Umsetzung: Integration in den Produktionsprozess
- Verfügbarkeit der Ergebnisse: Schnell, eindeutig, zuverlässig
- Kosten: niedrig

In der vorliegenden Arbeit sollen die am Lehrstuhl im Rahmen des EU-Projektes entwickelten Methoden zur effektiveren Gestaltung einer routinetauglichen PCR-Analytik dargestellt und diskutiert werden. Des Weiteren sollen die erzielten Ergebnisse aus den Brauereiversuchen und die Bewertung der getesteten PCR-Methoden durch die Endanwender aufgezeigt und kommentiert werden.

Schwerpunkte in der Entwicklungsarbeit zielen vor allem auf die Optimierung kultureller Voranreicherungstechniken für bierschädliche Bakterien und Fremdhefen, die Probenverarbeitung für eine nachfolgende PCR und die Entwicklung von gruppen- und speziesspezifischen Real-Time PCR-Assays zum Nachweis bierschädlicher Bakterien und brauereirelevanter Kultur- und Fremdhefen ab.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

In den folgenden Kapiteln sind die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien entsprechend ihrer Einsatzgebiete aufgelistet.

2.1.1 Kultivierung, Voranreicherung und Stammhaltung von Mikroorganismen

- Petrimat, Dosierautomat für Flüssignährmedien, Struers, Kopenhagen, Dänemark
- Mikroskop, Standard 25, Zeiss, Jena
- Glaswaren, Schott, Mainz
- Cryobank Stammhaltungssystem, Mast Diagnostica, Merseyside, UK
- BVF aus Glas, 50 und 180 ml, gasdicht verschließbar, steril, Bezugsquelle: Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität
- Millipore Sterivex Filter Unit, 0,22 µm, Millipore Corporation, Bedford, USA
- Anaerocult A, Anaerobiosestreifen zur Erzeugung eines anaeroben Milieus im Anaerobentopf, Merck, Darmstadt
- Zellulose-Nitrat Membranfilter, 50 mm, 0,2 µm, Sartorius AG, Göttingen
- Sterile Plastikware: Petrischalen Ø 50 mm, Pipettenspitzen für Gilson Pipetman, Eppendorf Safe Lock Tubes 1,5 und 2,0 ml, Falcon-Röhrchen 15 und 50 ml, Bezugsquelle: Zefa Laborservice, Harthausen
- Thoma-Zählkammern für Hefen und Bakterien

2.1.2 DNA Präparation

- Zentrifuge, Biofuge pico, Heraeus Instruments, Hanau
- Eppendorf-Zentrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg
- Speed-Vac Concentrator, Bachhofer, Reutlingen
- Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
- Minishaker für 1,5 und 2,0 ml Safe Lock Tubes, IKA MS-1
- Halogenstrahler, HR FL-7P, 500W
- Vortex Genie 2, Scientific Instruments, Bohemia, NY, USA
- Spektralphotometer, 3100 pro, Ultrospec, Cambridge, UK
- DNA Isolations-Kit zum Nachweis bierschädlicher Bakterien aus filtrierbarem Probenmaterial bestehend aus Polycarbonat-Membranfiltern (0,45 µm), Lysepuffer F und 2,0 ml Eppendorf-Gefäßen mit Barriere-Gel, PIKA Weihenstephan GmbH, Freising
- CellTrap-Filter zum Nachweis bierschädlicher Bakterien aus filtrierbarem Probenmaterial, MEM-TEQ Ventures Ltd., Ashton, UK
- Sterile Glasperlen: Ø 0,11 mm, 0,5 mm

2.1.3 PCR

- Thermocycler PTC-100, MJ Research, Biozym, Oldendorf
- Real-Time PCR Thermocycler: iCycler iQTM Multi-Color, Bio-Rad, Hercules, CA, USA; ABI Prism 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, USA; LightCycler 1.0 Instrument, Roche Diagnostics, Mannheim
- PCR Softstrips 0,2 ml mit Cap-Strips, Biozym, Oldendorf
- PCR Plates Thermo Fast 96-Well, PeqLab, Erlangen

- Optical Sealing Tapes, Bio-Rad, Hercules, CA, USA

2.1.4 Elektrophorese und Auswertung

- Horizontale Elektrophorese-Einheit GNA 200, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
- Horizontale Elektrophorese-Einheit HE 33, Hoefer Scientific Instruments, Serva, Heidelberg
- Spannungsgeber EPS 600, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
- Sofortbildkamera MP4, Polariod, Offenbach
- UV-Transilluminator Reprostar, CAMAG, Berlin
- Film 667 professional, Polariod, Offenbach

2.2 Reagenzien und Chemikalien

Sofern nicht anders gekennzeichnet, wurden die aufgeführten Reagenzien und Chemikalien über Sigma-Aldrich, Steinheim, bezogen.

2.2.1 Medienzusätze zur Kultivierung von Mikroorganismen

- Cycloheximid (Handelsname: Actidion), Cystein-HCl, Fruktose
- CuSO₄-Lösung: 2 % (g/v)
- Weihenstephaner Original (Bittereinheiten 20 BE, Alkoholgehalt: 5,1 %, 1 h bei 62 °C im Wasserbad pasteurisiert), Staatsbrauerei Weihenstephan

2.2.2 DNA Präparation

- InstaGene Matrix, Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- Bugs'n beads Version S (Produktinformation: For the isolation of PCR ready DNA from bacteria in complex samples), Genpoint, Oslo, Norway
- 1x PCR-Puffer: 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl
- CIA, Chloroform: Isoamylalkohol = 24 : 1, gesättigt mit 0,1 M Tris-HCl
- Phenol-CIA: Phenol : CIA = 1 : 1
- Ethanol, absolut und Ethanol 70 %
- Lysepuffer: NaCl 100 mM, Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 2 %, SDS 1 %
- RNase 75 µg/ml
- Ethidiumbromid Monoazid (EMA); 1 mg/µl gelöst in Ethanol absolut
- Standard-Lösungen: 0,1 M NaOH, NaCl 0,9 %, SDS 0,5 %, Tween 20 (20 %)
- Ampuwa, Wasser für Injektionszwecke, Fresenius Kabi, Bad Homburg

2.2.3 PCR

- Primer für Standard und Real-Time PCR, MWG Biotech, Ebersberg
- Fluoreszenzmarkierte TaqMan-Sonden, Metabion, Martinsried
- Ultrapure dNTP Set, Amersham Biosciences, Freiburg
- Taq-Polymerasen: HotMasterMix (2,5-fach), Eppendorf, Hamburg; native Amersham Pharmacia, Biotech, Freiburg; HotStarTaq, Qiagen, Hilden; pureTaq Ready-To-Go PCR Beads, Amersham Biosciences

- Taq-Polymerase Master-Mix: Quantitect, Qiagen, Hilden; iQ-Supermix, Bio-Rad, Hercules, CA, USA; qPCR Mastermix, Eurogentec, Seraing, Belgien; AmpliTaq Gold, Applied Biosystems, Foster City, USA
- Bovine Serum Albumin (BSA): 10 mg/l
- PCR-Puffer (10x), MgCl₂: Qiagen, Hilden

2.2.4 Gelelektrophorese

- Agarose Seakem LE, FMC Bioproducts, Rockland, USA
- TAE-Puffer: 0,04 M Tris-Acetat, 1 mM EDTA, 0,5 µg EtBr/ml, pH 8,0
- Stop-Lösung für Agarose-Gelelektrophorese: 0,05 % Bromphenolblau, 250 mM EDTA, 55 % Saccharose
- Ethidiumbromid
- 100 bp-Leiter, Amersham Biosciences, Freiburg

2.3 Nährmedien

2.3.1 Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien

Die Nährmedien MRS und MIB wurden als Fertignährboden in Pulverform verwendet. NBB-B und NBB-C wurden in flüssiger Form bezogen. Alle anderen Medien (Tab. 1) wurden aus den Einzelkomponenten hergestellt. Die für die Nährböden benötigten Zusätze wurden von Sigma-Aldrich, Steinheim bezogen.

Tab. 1: Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien

Nährmedium	Zusammensetzung / Produktinformation
MRS	Di-Kaliumhydrogenphosphat 0,2 %, Di-Kaliumhydrogencitrat 0,2 %, Pepton aus Casein 1 %, Fleischextrakt 0,8 %, D(+)-Glucose 2 %, Tween 80 0,1 %, Natriumacetat 0,5 %, Magnesiumsulfat 0,02 %, Mangansulfat, 0,004 %. Für MRS-Agar zusätzlich 2 % Agarose zufügen. Nährmedium als Fertigpulver bezogen, Merck, Darmstadt
YPM	Hefeextrakt 0,5 %, Pepton 0,3 %, D-Mannitol 2,5 % Nährboden zur Kultivierung von Essigsäurebakterien, DSMZ, Braunschweig
NB	Pepton 0,5 %, Fleischextrakt 0,3 % Nährboden zur Kultivierung von Enterobacteriaceae, DSMZ, Braunschweig
MIB	Pepton 0,5 %, Hefeextrakt 2 %, Dextrose 1 %, Monopotassium Phosphate 0,2 %, Sorbitan Monooleate Complex 0,01 %. Nährmedium als Fertigpulver bezogen, Difco, Beckton, Dickinson and Company, Sparks, USA Produktinformation: Base for the preparation of the Inoculum of Lactobacilli and other Microorganisms used in microbiological assays of Vitamins and Amino Acids
NBB-B	Fertigmedium; keine Zusammensetzung angegeben, Döhler, Darmstadt Produktinformation: Flüssiges Fertignachweismedium mit Biercharakter für bierschädliche Bakterien
NBB-C	Fertigmedium; keine Zusammensetzung angegeben, Döhler, Darmstadt Produktinformation: Flüssiges Fertignachweismedium mit Biercharakter für bierschädliche Bakterien
RR-3	Hefeextrakt 0,5 %, Trypticase, 2 %, Leberkonzentrat 0,1 %, Maltose 1 %, Fructose 0,5 %, Glucose 0,5 %, Betain-HCl 0,2 %, Diammoniumhydrogencitrat 0,2 %, Kaliumaspartat 0,25%, Kaliumglutamat 0,25 %, Magnesiumsulfat (7xH ₂ O) 0,2 %, Mangansulfat 0,05 %, Dikaliumhydrogenphosphat 0,2 %, N-Acetyl Glucosamin 0,05 %, Tween 80 1 % (BOULTON und QUAIN 2001)

2.3.2 Nährmedien zur Kultivierung von Fremdhefen

Tab. 2: Nährmedien zur Kultivierung von Fremdhefen

Nährmedium	Zusammensetzung / Produktinformation
MYPG bzw. MYPG + CuSO ₄	Malzextrakt 0,3 %, Hefeextrakt 0,3 %, Glukose 1 %, Bacto-Pepton 0,5 %; für MYPG + CuSO ₄ je nach gewünschter Endkonzentration die benötigte Menge einer 2 %-igen CuSO ₄ -Lösung zufügen; für MYPG-Schrägagar zusätzlich 2 % Agarose beimengen (o. V. 1992)
EV-Bier	keine genaue Zusammensetzung angegeben, mit Staubhefe (WHB, Stamm 66) endvergorenes Bier, gebrauchsfertig bezogen von: Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität

2.4 Mikroorganismen, Stammhaltung und Kultivierung

Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene Bakterien- und Hefestämme verwendet, die aus Stammsammlungen bezogen wurden oder Isolate aus der Stufenkontrolle von Brauereien darstellen.

Tab. 3: Verwendete Bakterienstämme

Spezies	Herkunft	Lehrstuhl-interne Stamm-Nr.	Spezies	Herkunft	Lehrstuhl-interne Stamm-Nr.
<i>Acetobacter aceti</i>	DSM 3508	BS 191	<i>L. parabuchneri</i>	DSM 20173	BS 6
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	DSM 3509	BS190	<i>L. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	DSM 5622	BS 225
<i>Bacillus subtilis</i>	Lst II	BS 288	<i>L. paracollinoides</i>	DSM 15502	BS296
<i>Escherichia coli</i>	DSM 499	BS 233	<i>L. perolens</i> (1)	DSM 12744	BS 226
<i>Gluconobacter oxidans</i>	DSM 7145	BS 189	<i>L. perolens</i> (2)	Stufenkontrolle	BS 291
<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>	DSM 20481	BS 230	<i>L. plantarum</i> (1)	DSM 20174	BS 111
<i>L. acidophilus</i>	DSM 20079	BS 184	<i>L. plantarum</i> (2)	Stufenkontrolle	BS 285
<i>L. alimentarius</i>	DSM 20249	BS 215	<i>L. reuteri</i>	DSM 20016	BS 227
<i>L. amylophilus</i>	DSM 20533	BS 267	<i>L. rhamnosus</i>	DSM 20021	BS 228
<i>L. amylovorus</i>	DSM 20531	BS 272	<i>L. salivarius</i> spp. <i>salivarius</i>	DSM 20555	BS 229
<i>L. amyolyticus</i>	DSM 11664	BS 271	<i>L. sanfranciscensis</i>	DSM 20663	BS 113
<i>L. bif fermentans</i>	DSM 20003	BS 216	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> spp. <i>mesenteroides</i>	DSM 20343	BS 203
<i>L. brevis</i> (1)	DSM 20054	BS 110	<i>Megasphaera cerevisiae</i> (1)	VTT E-981087	BS 46
<i>L. brevis</i> (2)	VTT E-001381	BS 40	<i>Megasphaera cerevisiae</i> (2)	Stufenkontrolle	BS 262
<i>L. brevis</i> (3+4)	Stufenkontrolle	BS 30, BS 292	<i>Micrococcus kristinae</i>	DSM 20032	BS 239
<i>L. brevissimilis</i>	DSM 6265	BS 2	<i>Obesumbacterium proteus</i>	DSM 2777	BS 246
<i>L. buchneri</i>	DSM 20057	BS 264	<i>Oenococcus oeni</i>	DSM 20252	BS 185
<i>L. casei</i> (1)	DSM 20011	BS 3	<i>Pantoea dispersa</i>	DSM 30073	BS 244
<i>L. casei</i> (2)	Stufenkontrolle	BS 304	<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	DSM 20467	BS 48
<i>L. collinoides</i>	DSM 20515	BS 112	<i>Pectinatus frisingensis</i>	VTT E-981088	BS 42
<i>L. coryniformis</i> spp. <i>torquens</i>	DSM 20004	BS 109	<i>Pectinatus</i> sp.	DSM 20764	BS 261
<i>L. coryniformis</i> (2)	Stufenkontrolle	BS 53	<i>P. claussenii</i>	DSM 14800	BS 282
<i>L. curvatus</i>	DSM 20019	BS 218	<i>P. damnosus</i> (1)	VTT E-97848	BS 41
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i>	DSM 20072	BS 219	<i>P. damnosus</i> (2)	Stufenkontrolle	BS 242
<i>L. fermentum</i>	DSM 20052	BS 199	<i>P. dextrinicus</i>	DSM 20335	BS 270
<i>L. fructivorans</i>	DSM 20203	BS 220	<i>P. parvulus</i>	DSM 20332	BS 269
<i>L. gasserii</i>	DSM 20243	BS 221	<i>P. pentosaceus</i>	DSM 20336	BS 268
<i>L. helveticus</i>	DSM 20075	BS 222	<i>P. inopinatus</i>	DSM 20285	BS 245
<i>L. hilgardii</i>	DSM 20176	BS 223	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50090	BS 236
<i>L. johnsonii</i>	DSM 10533	BS 224	<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 50906	BS 237
<i>L. kefirii</i>	DSM 20587	BS 197	<i>Selenomonas lacticifex</i>	VTT E-90407	BS 155
<i>L. lindneri</i> (1)	DSM 20690	BS 4	<i>Sarcina maxima</i>	DSM 316	BS 248
<i>L. lindneri</i> (2)	VTT E-95589	BS 38	<i>Weisella viridescens</i>	DSM 20410	BS 198

Spezies	Herkunft	Lehrstuhl- interne Stamm- Nr.	Spezies	Herkunft	Lehrstuhl- interne Stamm- Nr.
<i>L. lindneri</i> (3)	Stufenkontrolle	BS 298	<i>Weissella mesenteroides</i>	DSM 20288	BS 232
<i>L. malefermentans</i>	DSM 20570	BS 5	<i>Zymomonas mobilis</i>	DSM 424	BS 188

Tab. 4: Verwendete Hefestämme

Stamm	Herkunft	Synonyme Bezeichnung	Industrielle Verwendung bzw. Charakterisierung
<i>Candida boidinii</i>	Lst II		
<i>Candida parapsilosis</i>	WSYC 250	DSM 5784	
<i>Candida tropicalis</i> (1)	Lst II	CBS 2317	
<i>Candida tropicalis</i> (2)	WSYC 231		
<i>Candida sake</i>	Lst II		
<i>Cryptococcus albidus</i>	WSYC 302	CBS 155	
<i>Cryptococcus laurentii</i>	WSYC 28	CBS 139	
<i>Debaromyces hanseni</i>	WSYC 96	DSM 70244	
<i>Dekkera anomala</i> (1)	WSYC 256	DSM 70727	
<i>Dekkera anomala</i> (2)	WSYC 172		
<i>Dekkera anomala</i> (3)	Stufenkontrolle		
<i>Dekkera bruxellensis</i> (1-3)	WSYC 257, 35, 36	CBS 3429, 4914, 2797	
<i>Dekkera naardenensis</i>	DSM 70743		
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	WSYC 49	CBS 712	
<i>Kloeckera apiculata</i>	DSM 70285		
<i>Pichia anomala</i> (1-3)	WSYC 39, 295, DSM 70263	CBS 5759, DSM 70130, CBS 110	
<i>Pichia anomala</i> (4)	Stufenkontrolle		
<i>Pichia membranefaciens</i> (1-3)	WSYC 337, 247	CBS 107, DSM 70631	
<i>Rhodotorula rubra</i>	DSM 70403		
<i>S. bayanus</i> (1)	DSM 70411		
<i>S. bayanus</i> (2)	DSM 70412	CBS 380	Typstamm
<i>S. bayanus</i> (3)	DSM 70547	CBS 395	Ehem. <i>S. uvarum</i> -Typstamm
<i>S. bayanus</i> (4)	DSM 70508	CBS 425	Ehem. <i>S. heterogenicus</i> -Typstamm
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>carlsbergensis</i>	WHB 26, 34/70, 34/78, 44, 54, 88, 120, 122, 128, 168, 176, 194		Untergärige Brauhefen, Bruchhefe
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>carlsbergensis</i>	WHB 66, 71, 170		Untergärige Brauhefen, Staubhefe
<i>S. cerevisiae</i>	WHB 68, 127, 175,		Obergärige Brauhefen, Weißbier
<i>S. cerevisiae</i>	WHB 148, 184		Obergärige Brauhefen, Alt
<i>S. cerevisiae</i>	WHB 165, 177		Obergärige Brauhefen, Alt/Kölsch
<i>S. cerevisiae</i>	WHB 208, 210, 213		Obergärige Brauhefen, Alt/Ale
<i>S. cerevisiae</i>	DSM 70449	CBS 1171	Typstamm Obergärige Brauhefe
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i> (1)	DSM 70487		
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i> (2)	Lst II		
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i> (3)	Stufenkontrolle		
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>	DSM 70451		
<i>S. dairensis</i>	WSYC 343	CBS 421	
<i>S. exiguus</i>	Lst II		
<i>S. kluyveri</i>	WSYC 240	CBS 3082	
<i>S. paradoxus</i>	WSYC 63	CBS 1464	
<i>S. pastorianus</i> (1)	DSM 6580	CBS 1538	Neo-Typstamm
<i>S. pastorianus</i> (2)	DSM 6581	CBS 1503	Ehem. <i>S. monacensis</i> -Typstamm
<i>S. uvarum</i> Beijerinck	Lst II		
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	DSM 70551	CBS 820	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	WSYC 347	CBS 356	
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	WSYC 69	CBS 1146	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (1-3)	WSYC 284, 317, 444	DSM 70492, CBS 680, DSM 70834	
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	WSYC 468	CBS 748	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (1-3)	WSYC 82, 83, 84	CBS 732, 441, 731	

Die Kultivierung der Bakterienstämme erfolgte bei Milchsäurebakterien in MRS-Bouillion und bei *Pectinatus* spp. und *Megasphaera cerevisiae* in MIB. Die Anzucht aller anderen Bakterien erfolgte in den von der DSMZ angegebenen Medien unter den vorgeschriebenen Kultivierungsbedingungen.

Die Kultivierung der Hefestämme erfolgte in MYPG-Nährmedium (JESPERSEN und JAKOBSEN 1996) bei 28 °C unter aeroben Bedingungen.

Zur mittelfristigen Stammhaltung wurden von anaeroben bzw. fakultativ anaeroben Bakterien MRS-Stichkulturen angelegt, die in dreimonatigem Abstand frisch überimpft wurden. Von aeroben Bakterien und Hefen wurden auf den jeweiligen Medien Schrägagarkulturen angeimpft und ebenfalls alle drei Monate überimpft.

Die langfristige Stammhaltung aller Mikroorganismen erfolgte bei -80 °C mittels Cryobank-System der Firma Mast Diagnostica.

2.5 Voranreicherung bierschädlicher Bakterien

2.5.1 Verwendete Nährmedien

Zur Optimierung der kulturellen Voranreicherung für eine nachfolgende PCR wurden verschiedene Nährmedien und Methoden getestet. Die aus Fertigpulvern bzw. aus den Einzelkomponenten selbst hergestellten Nährmedien (MRSF, MIB und RR-3) wurden hierbei in der angegebenen Einsatzkonzentration verwendet (1x), sowie in mehrfach konzentrierter Form angesetzt (2x, 3x und 5x-Konzentrate). Vor dem Beimpfen der Proben erfolgte eine Ausmischung der Konzentrate mit filtriertem und pasteurisiertem Bier bzw. ddH₂O.

In der folgenden Tabelle sind die verschiedenen Medien in den jeweils getesteten Konzentrationen angegeben. Zusätzlich ist das Mischungsverhältnis der Medien mit der Probe und der damit erzielte pH-Wert bei den Anreicherungen angegeben (Tab. 5).

Tab. 5: Unterschiedlich konzentrierte Nährmedien zum Nachweis bierschädlicher Bakterien mit Angabe zu deren Einsatz-Verhältnis (Medium/Bier/ddH₂O)

Medium	Einsatz-Verhältnis Medium/Bier/ddH ₂ O	pH-Wert
MIB	100/0/0	5,9
2x MIB	50/50/0	5,9
MRSF	100/0/0	5,6
2x MRSF	50/50/0	5,3
3x MRSF	30/70/0	5,1
5x MRSF	20/80/0	4,9
RR-3	100/0/0	5,5
2x RR-3	50/50/0	5,3
3x RR-3	30/70/0	5,0
5x RR-3	20/80/0	4,9
NBB-B	100/0/0	5,4
NBB-C (1)	5/95/0	4,2
NBB-C (2)	5/75/20	5,0
NBB-C (3)	5/50/45	5,3
2x MRSF/2x MIB (1)	50 ¹⁾ /50/0	5,3
2x MRSF/2x MIB (2)	30 ¹⁾ /70/0	5,1

¹⁾ 2x MRSF und 2x MIB im Verhältnis 1 : 1 gemischt

Um bei den Konzentraten Maillard-Reaktionen während des Autoklaviervorgangs zu vermeiden, wurden die Medien zur Entkeimung sterilfiltriert (BLAST 1999). Zudem wird eine Membranfiltration nach der Voranreicherung durch die vorangegangene Sterilfiltration erleichtert.

Zu den Medien MRSF, MIB und RR-3 wurde Cystein-HCl (0,5 %) als Antioxidationsmittel und Actidion zur Unterdrückung des Hefewachstums zugegeben. Um das Bakterienwachstum nicht negativ zu beeinflussen, wurde die Menge an Actidion so bemessen, dass in den fertig ausgemischten Medien eine Konzentration von 15 ppm vorlag (ISAAC und JENNINGS 1995).

Bei der Herstellung der MRS-Medien wurde zusätzlich noch 1, 2, 3 und 5 % Fructose beigemischt, um mit diesen Medien den Nachweis von *L. lindneri* zu verbessern. Dieser Keim besitzt ein sehr limitiertes Zuckerverwertungsspektrum, in dem Fructose allerdings enthalten ist (BACK 1994). Das mit Fructose modifizierte Medium wird MRSF bezeichnet.

Das gebrauchsfertige Nährmedienkonzentrat NBB-C wurde in verschiedenen Varianten verwendet, um unterschiedliche Sensitivitäten zu erzielen. NBB-B wurde wie empfohlen eingesetzt (BACK 1994).

2.5.2 Animpfen

Die Anzucht der Organismen erfolgte wie unter 2.4 beschrieben. Zur Adaption an das spätere Biermilieu in den Anreicherungen erfolgte vorher eine Kultivierung in den jeweiligen Medien, die mit 30 % pasteurisiertem Bier versetzt waren (pH 5,5).

Die Milchsäurebakterien wurden vor dem Animpfen in der log-Phase durch Zentrifugation (5 min, 5000 U/min) vom Nährmedium getrennt und mit NaCl-Lösung (0,9 %) gewaschen. Die Zellzahl der Bakteriensuspension wurde mittels Thoma-Zählkammer bestimmt. Zum anschließenden Animpfen der unterschiedlichen Proben bzw. Nährmedien wurden dekadische Verdünnungsreihen angelegt. Die angestrebte Ausgangszellzahl betrug jeweils ca. 10^3 Zellen/ml, d. h. zum Animpfen von 50 ml wurden 100 µl einer Verdünnung mit 10^5 Zellen/ml verwendet.

Um eine oxidative Schädigung der strikt anaeroben Keime *Pectinatus* spp. und *Megasphaera cerevisiae* zu vermeiden, wurden diese ohne Waschschrift auf die jeweiligen Proben überimpft. Zusätzlich wurden die Medien zum Nachweis der strikt anaeroben Keime vor der Beimpfung 24 h anaerob gelagert.

2.5.3 Anreicherung und Wachstumskontrolle von Filtratproben

Die Bebrütung der Proben aus dem Filtratbereich erfolgte anaerob bei 28 °C in gasdicht verschließbaren BVF, die bis ca. 0,5 cm unter den Rand gefüllt wurden. Bei den strikt anaeroben Keimen wurden die BVF zur Bebrütung randvoll gefüllt. Jeder Keim wurde mit dem entsprechenden Medium in Dreifachbestimmung (n = 3) untersucht.

Die Kontrolle des Wachstums erfolgte bei den filtrierbaren Proben anhand dreier Kriterien:

- Inkubationsdauer bis zu einer visuell feststellbaren Trübungszunahme
- Ausplattieren von 20 µl Aliquots auf MRS-Agarplatten zu definierten Zeitpunkten (0 h, 24 h, 48 h, 72 h)
- PCR-Untersuchung von 150 µl Aliquots zu definierten Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h)

Die Agarplatten wurden in Anaerobentöpfen unter Zugabe von Anaerocult-Streifen bei 28 °C bebrütet. Nach 5 bzw. 7 Tagen Inkubation erfolgte die Bestimmung der koloniebildenden

den Einheiten.

2.5.4 Anreicherung und Wachstumskontrolle von Unfiltratproben

Zur Voranreicherung von Unfiltrat- bzw. Hefeproben wurde pasteurisiertes Bier mittels Presshefe (WHB 34/70) auf Zellzahlen von 10^7 Zellen/ml bzw. 10^9 Zellen/ml eingestellt. Mit diesen Zellzahlen sollten die Verhältnisse in Lager- und Gärtankproben sowie Anstellhefe simuliert werden. Das Beimpfen der Proben erfolgte analog zu den Filtratproben.

Die Bebrütung der hefehaltigen Proben erfolgte ebenfalls bei 28 °C. Aufgrund einer möglichen CO₂-Bildung durch die Hefen wurden die Deckel der BVF nur lose aufgelegt, um Gasaustritt zu ermöglichen und gleichzeitig Kontaminationen mit anderen Keimen zu verhindern. Zudem wurde ein höherer Steigraum in den Flaschen berücksichtigt.

Die Actidionkonzentration in den ausgemischten Medien wurde für diesen Probentyp auf 25 ppm erhöht.

Während der Bebrütung wurden die Flaschen 2-mal täglich geschüttelt, um die Zellen in Schwebelage zu halten und den Kontakt mit dem Nährmedium zu verbessern.

Die Wachstumskontrolle erfolgte anhand von PCR-Untersuchungen von 150 µl Aliquots zu definierten Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h).

2.6 Voranreicherung brauereirelevanter Fremdhefen

2.6.1 Verwendete Nährmedien

Die Anforderung eines universellen Nachweismediums für Fremdhefen wird bisher durch MYPG bzw. MYPG + CuSO₄ am besten erfüllt (BOULTON and QUAIN 2001). MYPG ist ein universelles Nachweismedium für Hefen (Kulturhefen, S-FH und NS-FH), das durch die Zugabe von > 200 ppm CuSO₄ zu einem Selektivmedium wird, in dem nur noch NS-FH und einige S-FH wachsen können (JESPERSEN und JAKOBSEN 1996). Die Verwendung von MYPG + CuSO₄ ist die von der ASBC empfohlene Methode zum Fremdhefenachweis (o. V. 1992). Außerdem wird MYPG bzw. MYPG + CuSO₄ gegenüber anderen Fremdhefemedien als effektiver beurteilt (VAN DER AA KÜHLE und JESPERSEN 1998; SALEK 2002, POWELL und SMART 2003). MYPG sowie die CuSO₄-Lösung wurden zur Sterilisation autoklaviert. Die Zugabe der CuSO₄-Lösung erfolgte nach dem Autoklavieren. Zum Nachweis von übervergärenden Hefen wie z. B. *S. cerevisiae* var. *diastaticus* (*S. diastaticus*) wurde außerdem EV-Bier getestet (BACK 1994).

2.6.2 Animpfen

Die Anzucht der Organismen erfolgte wie unter 2.2 beschrieben.

Die Hefen wurden am Ende der log-Phase durch Zentrifugation (5 min/5000 U/min) vom

Nährmedium getrennt und mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen.

Die Zellzahl der Hefesuspension wurde mittels Thoma-Zählkammer bestimmt. Zum anschließenden Animpfen der unterschiedlichen Proben bzw. Nährmedien wurden dekadische Verdünnungsreihen in 0,9 %iger NaCl-Lösung angelegt.

2.6.3 Anreicherung von Hefen in MYPG, MYPG + CuSO₄ und EV-Bier

Um das qualitative Wachstum verschiedener Hefen (Kulturhefen, S-FH, NS-FH) bei unterschiedlichen CuSO₄-Konzentrationen zu testen, wurden jeweils 5 ml MYPG mit den entsprechenden CuSO₄-Mengen versetzt, mit 10³ Hefezellen/ml angeimpft und aerob bei 28 °C bebrütet (n = 3). Die Wachstumskontrolle erfolgte täglich anhand der visuellen Trübung und durch Ausplattieren von 20 µl Aliquots auf MYPG-Platten zu definierten Zeitpunkten (0 h, 24 h, 48 h, 72 h). Die Platten wurden bei 28 °C aerob bebrütet und nach 5 Tagen erfolgte die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten. PCR-Tests erfolgten hier anfänglich nicht, da zum Zeitpunkt der Versuche noch keine PCR-Assays für die Zielkeime verfügbar waren.

Für *S. diastaticus* wurde eine alternative Anreicherung mittels EV-Bier erprobt. Hier erfolgte der Vergleich der Wachstumskontrolle zwischen MYPG + CuSO₄ und EV-Bier mittels PCR.

2.6.4 Anreicherung und Wachstumskontrolle der Fremdhefen in Unfiltrat

Zum Spurennachweis von Fremd- in Kulturhefen wurde Bier mittels Presshefe (WHB 34/70) auf Zellzahlen von 10⁷ Zellen/ml eingestellt. 5 ml Aliquots des Unfiltrats wurden anschließend mit Fremdhefe auf 10³ Zellen/ml beimpft (n = 3). Anschließend wurde wie folgt verfahren:

- Zentrifugieren: 5 min bei 4000 U/min
- Überstand verwerfen
- Zugabe von 5 ml MYPG + CuSO₄
- Aerobe Bebrütung der Proben bei 28 °C und tägliche Probenentnahme (150 µl)
- DNA-Isolation und anschließende PCR

2.7 DNA-Isolationsmethoden für unterschiedliche Probentypen

Die verschiedenen in der Brauerei vorkommenden Probentypen (Unfiltrat, Filtrat) bedingen eine unterschiedliche Probenverarbeitung. Hauptziel ist der Transfer der Zielkeime bzw. deren DNA in die anschließende PCR-Reaktion.

2.7.1 Gewinnung aufgereinigter gDNA

Zur Evaluierung der Sensitivitäten der entwickelten PCR-Systeme wurde aufgereinigte gDNA verwendet. Sowohl für Hefen als auch für Bakterien wurde ein Extraktionsprotokoll basierend auf Phenol-Chloroform angewendet (SCHERER 2003).

2.7.2 DNA-Isolation für bierschädliche Bakterien aus filtrierbaren Proben

Zur DNA Isolation aus filtrierbaren Proben kamen zwei Methoden zum Einsatz, bei denen vor der Zellyse eine Aufkonzentrierung der Zielkeime mittels Filtration stattfand.

2.7.2.1 PCMF-Filteraufschluss

Die hier angewandte Methode basiert auf einer kommerziell erhältlichen DNA-Isolationsmethode für filtrierbare Bierproben (PIKA Weihenstephan GmbH) und stellt eine modifizierte Version des von DIMICHELE und LEWIS (1993) beschriebenen Verfahrens dar.

Anleitung gemäß Beschreibung LC Screening Filter (PIKA Weihenstephan GmbH):

- Sterilisation der Filtereinheit und Filtration der Probe über einen PCMF; optional: Nachspülen des Filters (in der Filtrationseinrichtung) mit 50 ml ddH₂O
- Filter mit steriler Pinzette zusammenrollen und in ein 2 ml Tube überführen
- 200 µl Lysepuffer F zum Filter zugeben, Tube gut verschließen
- Tube mit Filter 10 min im kochenden Wasserbad inkubieren (alternativ: Heizblock mit mindestens 80°C), danach kurz anzentrifugieren und abkühlen lassen
- 800 µl CIA (untere farblose Phase) zum Filter zugeben
- Auf dem Reagenzglas-Schüttler mischen bis Filter nicht mehr an der Gefäßwand klebt
- 10 min bei 500 U/min auf dem Reagenzglas-Schüttler inkubieren
- Während der Inkubationszeit das Barriere-Gel vorbereiten: eine der Probeanzahl entsprechende Anzahl Barrieregel-Gefäße 30 sec bei 14000 U/min in der Zentrifuge sedimentieren
- Den gesamten Inhalt des Eppendorf-Gefäßes mit dem aufgelösten Filter in ein vorbereitetes Gefäß mit Barriere-Gel umgießen
- Die Mischung 2 min bei 14000 U/min zentrifugieren, obere Phase für PCR verwenden

2.7.2.2 DNA-Isolation mittels CellTrap-Filter

Alternativ zur PCMF Methode wurden die CellTrap-Filter verwendet (Abb. 1).

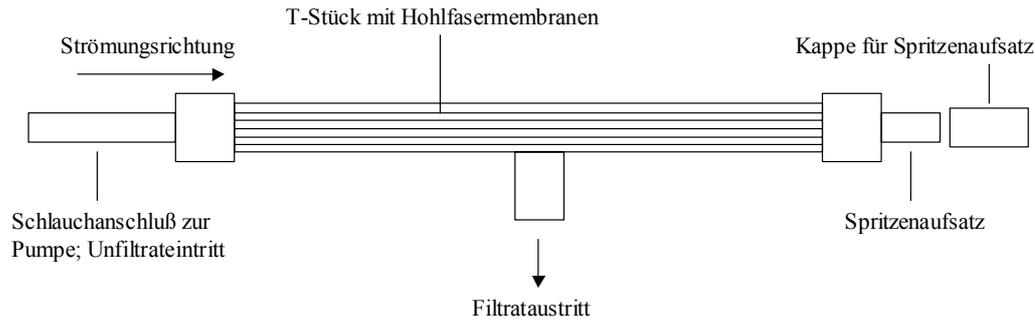


Abb. 1: Schematischer Aufbau und Funktionsweise der CellTrap-Filter

Mit diesem Verfahren können die in der Probe enthaltenen Keime ebenfalls quantitativ aufkonzentriert werden. Allerdings ist das im Filtergehäuse enthaltene Filtermaterial mit den darin befindlichen Zielkeimen für eine sofortige DNA-Isolation unzugänglich. Daher müssen die Keime nach der Filtration mit Hilfe einer Spritze wieder aus dem Filtergehäuse eluiert werden, um anschließend eine DNA-Isolation zu ermöglichen. Ziel war es, eine effektive Vorgehensweise zu entwickeln, die eine vergleichbare oder bessere Sensitivität als die PCMF-Methode gewährleistet (Methodenentwicklung siehe 4.3.1.4).

2.7.3 DNA-Isolation für bierschädliche Bakterien aus unfiltrierbaren Proben

Hierbei kann es sich z. B. um Lager- oder Gärtankproben und Proben, die nach der Anreicherung bereits trüb sind, handeln. Für nicht filtrierbare Proben erfolgte die Aufkonzentrierung der Zielkeime mittels Zentrifugation. Zum Zellaufschluss kamen unterschiedliche Verfahren zum Einsatz.

2.7.3.1 Kugelaufschluss-B (Kugelaufschluss für Bakterien)

Die hier beschriebene Methode lässt sich einfach, schnell und ohne den Einsatz gesundheitsgefährdender Chemikalien durchführen. Das zugrunde liegende Prinzip ist die mechanische Zerstörung der Zielkeime durch Glasbeads.

- 1) Transferieren von $x \mu\text{l}^{1)}$ der Probe in ein 1,5 ml Tube
 - ¹⁾ Volumen hängt von der Probenart ab:
 - Lager- und Gärtankproben (Originalprobe oder nach Anreicherung): 1000 μl
 - Proben, die nach Anreicherung bereits sichtbares Wachstum zeigen: 100 μl
- 2) Zentrifugieren: 2 min bei 14.000 U/min
- 3) Überstand verwerfen
- 4) Optional: Pellet mit 500 μl ddH₂O waschen, 2 min bei 14.000 U/min zentrifugieren, Überstand abziehen und verwerfen
- 5) Spatelspitze Glasbeads zugeben (0,11 mm)

- 6) Zugabe von 200 µl PCR-Puffer
- 7) 20 sec manuell vortexen zur Ablösung des Pellets von der Gefäßwand
- 8) Schütteln im Minishaker: 10 min bei 1.400-1.600 U/min
- 9) Zentrifugieren: 2 min bei 14.000 U/min, Überstand für PCR verwenden

2.7.3.2 Kochaufschluss-B (Kochaufschluss für Bakterien)

Der Kochaufschluss-B ähnelt in weiten Teilen dem Kugelaufschluss-B. Das zugrunde liegende Prinzip ist die Zerstörung der Zellbarriere durch Kochen bzw. Hitzeeinwirkung (95°C).

- 1)-4) siehe Schritte 1-4 bei 2.7.3.1
- 5) Zugabe von 200 µl PCR-Puffer
- 6) Schütteln auf Thermostinkubator: 15 min bei 95°C und 700 U/min
- 7) Zentrifugieren: 2 min bei 14.000 U/min, Überstand für PCR verwenden

2.7.3.3 InstaGene Matrix

Die IGM-Lösung besitzt einen Chelex-Gehalt von 6 % g/v. Chelex ist ein ionisches Harz, das PCR-Inhibitoren binden kann (GIRAFFA et al. 2000). Außerdem verbessert Chelex die Lyse gram-positiver Bakterien (RIJPENS und HERMAN 2002). Die Handhabung ist unkompliziert, schnell und nicht mit gesundheitlichen Risiken verbunden.

- 1) Probenvolumen und Zentrifugation: siehe 2.7.3.1 Schritte 1)-4)
- 2) Zum Zellpellet 200 µl IGM zufügen
- 3) Inkubieren: 15-30 min bei 56 °C
- 4) Vortexen: 10 sec
- 5) Tube für 8 min in Heizblockstellen (95-100 °C) oder kochendes Wasserbad stellen
- 6) Zentrifugieren: 5 min bei 7000 U/min, Überstand für PCR verwenden

2.7.3.4 Bugs´n Beads

Der DNA-Isolationskit Bugs´n Beads dient zur Isolation von Ziel-DNA aus einer komplexen Probenmatrix, wie z. B. Bakterien in Hefesuspensionen. Das Prinzip der Methode beruht auf der Affinität bestimmter Zielorganismen zur Oberfläche der magnetischen Beads. Die an die Beads gebundenen Bakterien können anschließend mittels magnetischer Separation aus der Probe entfernt und lysiert werden. Die gewonnene DNA wird für die PCR verwendet. Die Anwendung der einzelnen Schritte erfolgte gemäß der Angaben des Herstellers.

2.7.4 DNA-Isolation von bierschädlichen Bakterien aus Ernte- und Anstellhefe

Durch die hohe Zelldichte von 10^8 - 10^9 Hefezellen/ml in Anstellhefe bzw. Erntehefe wurden PCR-Inhibitionen durch non-target DNA erwartet (STEWART und DOWHANICK 1996). Deshalb wurden die Protokolle unter 2.7.3.1-2.7.3.3 durch einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt erweitert (Methodenentwicklung siehe 4.3.2.2 und 4.3.2.3):

- 1) Transferieren von $x \mu\text{l}^1$ der Probe in ein 1,5 ml Tube
 - ¹⁾ Volumen hängt von der Probenart ab:
 - Angereicherte Anstellhefe: 1300 μl
 - Anstellhefe (Original): 500 μl
- 2) Zufügen einer 20 %igen Tween 20-Lösung. Tween 20-Endkonzentration in der Probe: 0,5 %
- 3) Vortexen: 30 sec (Auflösung von Zellagglomeraten)
- 4) Zentrifugieren: 3 min bei RZB 250-300 (RZB bzw. U/min siehe Zentrifugenspezifikation)
- 5) Überstand in neues Tube überführen und den Überstand für die Zellaufschlussverfahren ab Punkt 2 verwenden (2.7.3.1-2.7.3.3)

2.7.5 DNA-Isolation für Hefen

Zum Zellaufschluss von Hefen wurden die Methoden Kugelaufschluss-H und IGM angewendet und mit anschließender PCR auf ihre Effektivität hin verglichen (4.3.3.2).

2.7.5.1 Kugelaufschluss-H

Bis auf zwei Modifikationen entspricht der Kugelaufschluss-H dem Kugelaufschluss-B (2.7.3.1). An Stelle der Glasbeads mit 0,11 mm Durchmesser wurden für Hefe Beads mit 0,5 mm Durchmesser eingesetzt. Zusätzlich wurde nach dem Schüttelvorgang noch ein Hitzeschritt 95 °C/5 min eingefügt, um einen effektiveren Zellaufschluss zu gewährleisten (Methodenentwicklung siehe 4.3.3.1).

2.7.5.2 IGM

Zum Zellaufschluss von Hefen wurde das Verfahren in unmodifizierter Form wie schon bei den Bakterien angewendet (2.7.3.3).

2.8 DNA-Konzentrationsmessung

Die Konzentration der aufgereinigten gDNA (siehe 2.7.1) wurde spektralphotometrisch bestimmt. Die Menge an ultravioletter Strahlung, die von einer DNA-Lösung absorbiert wird, ist direkt proportional zum DNA-Gehalt.

Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht ein Absorptionswert von 1,0 einer Konzent-

ration von 50 µg/ml dsDNA (SAMBROOK et al. 1989).

Gleichzeitig wurde die Reinheit der Isolate durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt (A_{260}/A_{280}). Bei reinen Proben liegt das Verhältnis bei 1,8. Geringere Werte deuten auf eine Verunreinigung mit Protein oder Phenol hin.

2.9 Lebend/Tot-Differenzierung mittels EMA-PCR

Zur Lebend/Tot-Differenzierung von Mikroorganismen mittels PCR wurde Ethidiumbromid Monoazid (EMA) verwendet. Die prinzipielle Wirkungsweise von EMA während der PCR-Probenvorbereitung wird von NOGVA et al. (2003) beschrieben. Das Ethidiumbromidderivat EMA (3-amino-8-azido-5-ethyl-6-phenyl) dringt spezifisch in tote Zellen ein, wo es sich in dsDNA einlagert. Weiterhin interkaliert EMA in freie DNA, die sich in der Probe befindet. Freie DNA oder tote Zellen können z. B. vorliegen, wenn kontaminiertes Rückbier zum Würzekochen beigemischt wird.

Aktiviert man anschließend EMA mit Hilfe von Lichtenergie, findet eine Photolyse des eingelagerten EMA statt und das umgesetzte Produkt bindet kovalent an DNA (aktiviertes EMA: aEMA). Diese DNA steht einer nachfolgenden PCR nicht mehr zur Verfügung. In Lösung befindliches freies EMA wird ebenfalls umgesetzt und ist anschließend nicht mehr in der Lage, kovalent an DNA zu binden.

Im Anschluss an die Bestrahlung mit Lichtenergie kann jetzt die DNA-Isolation erfolgen, da die extrahierte und unbeschädigte DNA aus lebenden Zellen durch aEMA nicht mehr inhibiert werden kann und somit einer PCR-Detektion zugänglich ist.

Da es mit EMA-PCR in Bezug auf Bier keine Erfahrungswerte gab, erfolgte die Methodenentwicklung im Laufe der Arbeit (4.4).

Es sollte beachtet werden, dass EMA bei chronischem Kontakt mit der Haut mutagen wirken kann, weshalb bei allen Schritten Schutzhandschuhe zu tragen sind.

2.10 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction) wurde in den 1980er Jahren entwickelt und dient zur *in vitro* Vervielfältigung (Amplifikation) definierter DNA-Abschnitte. Dabei lagern sich Oligonukleotid-Einzelstränge (Primer) an die entsprechenden Stellen der denaturierten einzelsträngigen Ziel-DNA an und die Polymerase bildet ausgehend von den Primern komplementär zur Matrizen-DNA DNA-Doppelstränge aus.

Der Reaktionsansatz enthält hierzu DNA, PCR-Reaktions-Puffer, dNTPs, nukleasefreies ddH₂O, mindestens einen Primer, DNA-Polymerase (z. B. *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) und - bei Real-Time PCR Anwendungen - noch zusätzlich einen Fluoreszenzfarbstoff oder fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden. Des Weiteren können Mg²⁺-Ionen in Form von MgCl₂ oder andere PCR-Enhancer wie z. B. BSA oder DMSO zugegeben wer-

den, um die Aktivität der DNA-Polymerase zu beeinflussen. Bei den oben erwähnten PCR-Zyklen wird mit Hilfe eines PCR-Thermocyclers ein Temperaturprotokoll zyklisch durchlaufen, das prinzipiell wie folgt aussieht:

- 95 °C: Denaturierung des DNA Doppelstranges
 30–65 °C: Anlagern (Annealing) der Primer; Temperatur ist abhängig von Länge und Basensequenz der Primer
 72 °C: Verlängerung (Elongation) der Primer durch die DNA-Polymerase bei deren Optimaltemperatur von 72 °C

Zur Detektion der PCR Produkte stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung, wobei in der vorliegenden Arbeit Standard PCR und Real-Time PCR Anwendung fanden.

2.10.1 Standard PCR

Bei Standard PCR, auch Endpunkt PCR genannt, erfolgt der Nachweis der gebildeten PCR-Produkte nach der eigentlichen PCR-Reaktion mittels Gelelektrophorese, wobei sowohl Agarosegele als auch Polyacrylamidgele zum Einsatz kommen können.

Falls keine anderen Angaben gemacht werden, erfolgte Standard PCR unter den folgenden Bedingungen (Tab. 6, Tab. 7).

Tab. 6: PCR-Mix Zusammensetzung für Standard PCR

PCR-Komponente	Konzentration im Reaktionsmix
PCR-Puffer	1x
dNTPs	200 nM
Vorwärts-Primer (1 bis n) ¹⁾	500 nM
Rückwärts-Primer (1 bis n) ¹⁾	500 nM
MgCl ₂	1,5 mM
BSA	100 µg/µl
Taq-Polymerase	0,025 U/µl

¹⁾ Falls n Primer simultan verwendet

Tab. 7: Temperaturprotokoll für Standard PCR

Temperatur [°C]	Zweck	Zeit [sec]	Zyklenzahl
95	Vordenaturierung der DNA in Einzelstränge; Aktivierung der Polymerase	780	1
95	Denaturierung	10	40
60	Annealing	30	
72	Elongation	30	
72	Finale Elongation	120	1
8	Ende	∞	1

2.10.2 Real-Time PCR

Real-Time PCR ermöglicht über eine Software-gestützte Messung von Fluoreszenzsignalen eine zeitgleiche Beobachtung des Amplifikationsstatus während der PCR. Um die Quantität der gebildeten PCR-Produkte direkt ablesen zu können, enthält der Reaktionsansatz zusätzlich zu den Standard PCR Komponenten unspezifische Fluoreszenzfarbstoffe (z. B. SYBR Green) oder fluoreszenzmarkierte sequenzspezifische DNA-Sonden (MÜLLER 2001).

Die Auswertung erfolgt anhand der sogenannten C_T -Werte („threshold cycle“). Dabei handelt es sich um die Zyklenzahl bzw. den Schwellenwert, bei der ein signifikanter Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über eine errechnete Fluoreszenz-Baseline erreicht wird. Die Baseline wird zu Reaktionsbeginn (Zyklus 3-15) bestimmt, wobei die durchschnittliche Fluoreszenz und deren Standardabweichung bestimmt werden. Der Punkt, an dem der Fluoreszenzanstieg erstmalig den zehnfachen Wert der Baseline-Standardabweichung überschreitet, wird als C_T -Wert bezeichnet. Der C_T -Wert wird umso eher erreicht, je mehr Zielsequenz in der Probe vorhanden ist, d. h. je kleiner die C_T -Werte sind, desto mehr DNA lag in der Probe vor (LORKOWSKI und CULLEN 2001, MACKAY 2004).

2.10.2.1 TaqMan PCR (5'-Nuclease Assay)

Mittlerweile haben sich verschiedene Real-Time PCR Formate etabliert, unter denen das TaqMan-Assay die am weitesten verbreitete Variante darstellt. Diese Art der PCR basiert auf der 5'→3' Exonucleaseaktivität der *Taq*-Polymerase. Die verwendete Fluoreszenzsonde ist am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff und am 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff ausgestattet und hybridisiert während der Annealing-/Elongationsphase an die Ziel-DNA. Aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Farbstoffe wird bei einer, mit kurzwelligem Licht angeregten, intakten Sonde die Fluoreszenz-Emission durch den Quencherfarbstoff unterdrückt. Während der PCR werden die Primer verlängert und die hybridisierte Sonde wird durch die 5'→3'-Exonuclease-Aktivität der Polymerase degradiert. Dabei wird die räumliche Nähe der beiden Farbstoffe aufgehoben und der Reporterfarbstoff kann Fluoreszenz emittieren. Zur Hydrolyse der Sonde, und damit zur Fluoreszenz-emission kommt es nur, wenn die Sonde eine komplementäre Basensequenz zur Ziel-DNA aufweist und dementsprechend an die Ziel-DNA hybridisiert. Das Fluoreszenzsignal steigt proportional zur Amplifikation der PCR-Fragmente (LORKOWSKI und CULLEN 2001).

Wie in Tab. 8 ersichtlich, entfällt bei TaqMan-PCR die Elongation bei 72 °C. Stattdessen findet ein kombinierter Annealing-/Elongationsschritt bei 60-63 °C statt („2-Step-PCR“), um zu gewährleisten, dass die Sonde an der Ziel-DNA gebunden bleibt und durch die

Exonucleaseaktivität der Polymerase abgebaut und nicht in intaktem Zustand abgelöst wird. Bei 60 °C ist die Aktivität der Polymerase nicht optimal, reicht aber für die Amplifikation der kurzen TaqMan PCR-Produkte aus (~80-200 bp). So beträgt die Taq-Polymerase-Aktivität bei 70 °C ca. 2800 Nukleotide/min und bei 55 °C noch 1400 Nukleotide/min (MÜHLHARD 1999; BUSTIN et al. 2000).

Falls keine anderen Angaben gemacht werden, gelten für die entwickelten TaqMan-Assays die folgenden Bedingungen (Tab. 8).

Tab. 8: PCR-Mix Zusammensetzung für Real-Time PCR

PCR-Komponente	Konzentration im Reaktionsmix
PCR-Puffer	1x
dNTPs	200 µM
Vorwärts-Primer (1 bis n) ^{1), 2)}	500 nM
Rückwärts-Primer (1 bis n) ^{1), 2)}	500 nM
MgCl ₂	3 mM
BSA	100 µg/µl
TaqMan-Sonden (1 bis n) ¹⁾	200 nM
Taq-Polymerase	0,025 U/µl

¹⁾ Falls n Primer und Sonden simultan verwendet

²⁾ Primer der IAC: 250 nM für Vorwärts- und Rückwärtsprimer

Tab. 9: Temperaturprotokoll für Real-Time PCR

Temperatur [°C]	Zweck	Zeit [sec]	Zyklenzahl
95	Vordenaturierung der DNA in Einzelstränge; Aktivierung der Polymerase	780	1
95	Denaturierung	10	40
60	Annealing/Elongation	60	
15	Ende	∞	1

Wurde statt HotStarTaq-Polymerase ein Real-Time PCR Master-Mix verwendet, erfolgte folgende Modifikation der PCR-Komponenten (Tab. 10). Das Temperaturprotokoll wurde unverändert beibehalten (Tab. 9).

Tab. 10: PCR-Mix Zusammensetzung für Real-Time PCR bei Verwendung eines Real-Time PCR-Mastermix

PCR-Komponente	Konzentration im Reaktionsmix
PCR-Mastermix	1x
Vorwärts-Primer (1 bis n) ^{1), 2)}	500 nM
Rückwärts-Primer (1 bis n) ^{1), 2)}	500 nM
BSA	100 µg/µl
TaqMan-Sonden (1 bis n) ¹⁾	200 nM

¹⁾ Falls n Primer und Sonden simultan verwendet

²⁾ Primer der IAC: 250 nM für Vorwärts- und Rückwärtsprimer

2.10.2.2 LightCycler PCR (Hybridisation-Probes)

In den Brauerei-Praxistests wurde eine weitere Form der Real-Time PCR angewendet, deren Prinzip auf dem Einsatz zweier Hybridisierungssonden mit jeweils einem Fluoreszenzfarbstoff begründet ist. Die beiden Sonden lagern sich während des Annealings in Kopf-Schwanz Anordnung an die Ziel-DNA an. Dadurch gelangen die beiden Fluoreszenzfarbstoffe (Donor und Akzeptor) in enge räumliche Nachbarschaft. Der Donor (Fluoreszein) wird durch kurzwelliges Licht angeregt und leitet die Energie an den Akzeptor (z. B. LC-Red 640) weiter, der seinerseits wieder Licht bestimmter Wellenlänge abstrahlt. Bei diesem als FRET (fluorescence resonance energy transfer) bezeichnetem Meßprinzip besteht ebenfalls ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der Anzahl an PCR-Produkten und Fluoreszenzintensität.

Mit dieser Art der PCR, bei der die Sonden nicht degradiert werden, kann nach der eigentlichen PCR eine Schmelzkurvenanalytik stattfinden, bei der die DNA verschiedener Zielkeime durch die unterschiedliche Lage von Schmelzkurven-Peaks identifiziert werden kann (LORKOWSKI und CULLEN 2001).

2.10.2.3 Multiplex Real-Time PCR

Unter Multiplex-PCR versteht man allgemein die simultane Verwendung mehrerer Primer-Systeme in einem PCR-Lauf (MÜHLHARDT 1999). Somit kann es bei Anwesenheit unterschiedlicher template-DNA auch zu einer differierenden Anzahl von Amplikons kommen. Multiplex-PCR kann sowohl in Standard PCR wie in Real-Time PCR Anwendung finden. Wenn PCR zu Nachweiszwecken eingesetzt wird, besteht der Vorteil von Multiplex-Anwendungen darin, dass mehrere Keime gleichzeitig detektiert werden können und somit Zeit und Kosten gespart werden (LAGIER 2004).

Eine Voraussetzung bei der Gestaltung von Multiplex-Assays ist die Kompatibilität der Einzelsysteme untereinander, die nur empirisch ermittelt werden kann. Sensitivität sowie Spezifität dürfen sich nicht verschlechtern und die zu kombinierenden Assays sollten identische Annealingtemperatur-Optima besitzen (ELNIFRO et al. 2000).

Real-Time PCR Geräte erfassen PCR-Reaktionen in Form von Fluoreszenzsignalen bei definierten Wellenlängen. Da viele optische Thermocycler allerdings in mehreren, voneinander abgegrenzten Wellenlängen Signale verarbeiten können, besteht theoretisch die Möglichkeit der gleichzeitigen Messung mehrerer parallel ablaufender Reaktionen (Bio-Rad iCycler: max. 4). Hierzu muss für jedes PCR-Assay eine eigene Sonde mit einer speziellen Reporter/Quencher-Kombination verwendet werden (KLEIN 2002).

Der Begriff Multiplex-PCR hat im Zusammenhang mit Real-Time PCR zu Unsicherheiten in der Terminologie geführt, da hier neben der Verwendung mehrerer Primerpaare zusätz-

lich noch mehrere Fluoreszenzsonden eingesetzt werden, um die verschiedenen Amplikons unterscheiden zu können (MACKAY 2004). Der Begriff Multicolor-Multiplex Real-Time PCR wäre daher treffender. Im folgenden wird für diese Anwendungen aber dennoch die gängigere Bezeichnung Multiplex Real-Time PCR verwendet.

2.10.3 PCR-Quantifizierung, Effizienz und statistische Analyse

Im Unterschied zur Standard PCR ermöglicht die Real-Time Messung eine kinetische Quantifizierung. Der exponentielle Verlauf einer PCR-Reaktion kann anhand folgender Formel beschrieben werden (RUTLEDGE und CÔTÉ 2003):

Formel 1:
$$N_C = N_0 \cdot (E + 1)^C$$

C: Anzahl der PCR-Zyklen

E: PCR-Effizienz, wobei $E = E [\%]/100 [\%]$

N_C : Anzahl der Amplikons beim entsprechenden Zyklus

N_0 : Menge an Ausgangs-DNA

Demnach ist die Zunahme an PCR-Produkten abhängig von der Effizienz der Reaktion. Im optimalen Fall beträgt die Effizienz 100 %, was gleichbedeutend ist mit einer Verdopplung der Amplikons in jedem Zyklus.

Mit der Einführung der Fluoreszenzmessung und der Auswertung anhand von C_t -Werten wurde eine quantitative Methode zur Bestimmung von N_C entwickelt (HIGUCHI et al. 1993). Hierzu werden verschiedene PCR-Reaktionen an dem Punkt miteinander verglichen, an dem die gleiche Menge an PCR-Produkt vorliegt. Dieser Punkt wird als C_t -Wert bezeichnet und kennzeichnet den Schnittpunkt der Messkurve mit einem berechneten Fluoreszenz-Schwellenwert. N_C wird an dieser Stelle somit zu einer Konstanten, wobei sich obige Formel (Formel 1) umformen lässt:

Formel 2:
$$N_0 = N_t \div (E + 1)^{C_t}$$

Durch weitere Umformung ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen Log (DNA-Konzentration) und C_t -Wert.

Formel 3:
$$C_t = N_0 \cdot \frac{-1}{\text{Log}(E + 1)} + \frac{\text{Log}N_t}{\text{Log}(E + 1)}$$

Die Steigung (Slope) der Geraden lässt sich mit $\text{Slope} = \frac{-1}{\text{Log}(E + 1)}$ darstellen.

Daraus ergibt sich bei einer Änderung der DNA-Ausgangsmenge um den Faktor 10 und bei einer PCR-Effizienz von 100 % ein C_t -Wert Unterschied von 3,32. Bei Abnahme der Effizienz vergrößert sich dementsprechend der Abstand der C_t -Werte.

Diese Zusammenhänge stellen die Grundlage für die Quantifizierung mittels Real-Time PCR dar. Bei der absoluten Quantifizierung werden anhand von Verdünnungsreihen mit

bekannter DNA-Menge Standardkurven erstellt. Die erzielten C_T -Werte werden gegen die eingesetzte DNA-Menge aufgetragen, wobei die DNA-Menge als Zahlenwert mit einer Einheit (z. B. Kopienzahl oder μg DNA) angegeben wird. Die DNA-Menge der zu untersuchenden Proben kann anhand der externen Standardkurve ermittelt werden, indem der erzielte C_T -Wert mit den Standards verglichen wird.

Umgekehrt kann durch eine PCR mit definierten Standards die Effizienz eines neuen PCR-Assays bestimmt werden. Aus den C_T -Wert Abständen bzw. der erzielten Geradensteigung lässt sich durch Umstellen der obigen Formel die Effizienz errechnen.

Formel 4:
$$E = \left(10^{-1/\text{slope}}\right) - 1$$

Zur Bestimmung der PCR-Effizienz der neu entwickelten PCR-Systeme wurden dekadische DNA-Verdünnungsreihen untersucht ($n = 3/\text{Verdünnungsstufe}$). Von jeder Verdünnung wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der C_T -Werte bestimmt. Zusätzlich wurde das Bestimmtheitsmaß (R^2) der linearen Regression ermittelt. Zur Auswertung aller PCR-Versuche wurden die Voreinstellungen der Software-Version iCycler 3.0 verwendet.

2.10.4 Spezifität und Sensitivität von PCR-Systemen

Für alle entwickelten PCR-Systeme wurde nach der Optimierung der Reaktionsbedingungen die Sensitivität und die Spezifität ermittelt. Die Tests hinsichtlich unerwünschter Kreuzreaktionen wurden mit Rein-DNA ($c = 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$) der Organismen aus Tab. 3 bzw. Tab. 4 durchgeführt.

Die Nachweisgrenzen wurden anhand von dekadischen Rein-DNA Verdünnungsreihen mit bekannter Konzentration und anhand von Zell-Verdünnungsreihen bestimmt. Die C_T -Werte jeder DNA-Konzentrationsstufe bzw. Zellzahl wurden in Dreifachbestimmung ermittelt. Bei den Rein-DNA Messreihen wurden mittels der oben genannten Formeln noch die Kennzahlen, PCR-Effizienz, Standardabweichung, Slope sowie das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression angegeben.

Die beiden ermittelten Sensitivitäten in Bezug auf Rein-DNA und Zellzahl lassen sich theoretisch miteinander in Beziehung setzen, wodurch wiederum eine Aussage über die Qualität der Probenaufarbeitung bzw. DNA-Isolation getroffen werden kann. Voraussetzung hierzu ist allerdings die Kenntnis der Genomgröße (haploid) des betreffenden Keims und die Kopienzahl des Zielgens.

Über folgende Beziehung kann die Masse des Genoms einer Zelle errechnet werden (o. V. 2003):

Formel 5
$$m = n \cdot 1,096 \cdot 10^{-21} \frac{g}{bp}$$

m: Masse des Genoms (haploid)
n: Größe des Genoms (bp)

Wurde die Sensitivität eines PCR-Systems mit aufgereinigter DNA bestimmt, so kann anschließend die theoretisch benötigte Mindestzellzahl zum Erreichen eines PCR-Signals errechnet werden. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass bei einer n-maligen Kopienzahl des Zielgens zum Erreichen eines PCR-Signals nur der n-te Teil der errechneten DNA-Menge nötig ist.

Formel 6
$$\text{Mindestzellzahl} = \frac{\text{DNA-Nachweisgrenze [g]}}{m \text{ [g]} \cdot \text{Kopienzahl}}$$

Die Daten für Kopienzahl und Genomgröße lagen nicht für alle untersuchten Organismen vor. Die Genomgröße bei den Bakterien war nur für *L. plantarum* (3.308.274 bp) bekannt und die Kopienzahl der 16S rDNA lag für *L. brevis* (2 Kopien) und *L. plantarum* (5 Kopien) vor (KLAPPENBACH et al. 2001).

Um dennoch einen Bezug zwischen Rein-DNA Sensitivität und Zellzahl Nachweisgrenze herstellen zu können, wurde für Bakterien mit unbekanntem Daten mit Durchschnitts- bzw. Näherungswerten gerechnet. Die Genomgröße wurde mit $2,3 \cdot 10^6$ bp und die rDNA Kopienzahl mit 4 veranschlagt (RINTTILA et al. 2004, ROUSSELON et al. 2004).

Bei den Eukaryonten, d. h. bei den entwickelten Hefe-Assays, wurden die Rein-DNA Sensitivität und die Zellzahl-Nachweisgrenze ebenfalls bestimmt aber nicht miteinander in Beziehung gesetzt, da hier nur die Genomgröße von *S. cerevisiae* bekannt war. Die Genomgrößen von Eukaryonten unterliegen größeren Schwankungen. Ebenso war der Ploidiegrad der getesteten Hefen nicht bekannt. Somit konnten hier keine allgemein gültigen und sinnvollen Näherungen getroffen werden.

2.11 Gelelektrophorese

Im verwendeten Puffer pH-Bereich (pH 8) wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode. Das Verhältnis Masse zu Ladung ist dabei maßgeblich für die Wanderungsgeschwindigkeit, wodurch eine Auftrennung der PCR-Produkte nach deren Länge erfolgt. Die Herstellung der Agarosegele (2 % g/v) erfolgte nach Herstellerangaben. Zusätzlich wurden die PCR-Proben mit 1/10 Volumen Gelladepuffer (Stop-Lösung) versetzt, um ein rasches Absinken der Proben in die Geltaschen zu gewährleisten.

Die im Gel enthaltene DNA wurde durch Zugabe von Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert und fotografisch dokumentiert. Dabei enthielt sowohl das Gel als auch der Laufpuffer Ethidiumbromid (0,5 µg/ml).

Die Elektrophorese erfolgte unter folgenden Bedingungen (Tab. 11).

Tab. 11: Elektrophoresebedingungen für Agarose-Gelelektrophorese

Kammer	Volumen [ml]	Spannung [V]	Stromstärke [mA]	Kühlung [°C]
GNA 200	150	220	20	8
Hoefler HE 33	25	110	10	--

2.12 Sequenzierung von PCR-Produkten

PCR-Amplifikate wurden mit dem Qiaquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Anschließend wurde die Qualität der Amplikons mittels Gelelektrophorese überprüft. Die Sequenzierungsreaktion wurde als Auftragsanalyse an die Firma Sequiserve vergeben. Als Sequenzierprimer dienten immer die den PCR-Produkten zugrunde liegenden Primer.

2.13 PCR Praxistests in Brauereien

Die im Rahmen des EU-Projektes durchgeführten PCR-Versuche in den Brauereien sind detailliert in Kapitel 7 aufgeführt (Geräte, Materialien, Probenplan, Ergebnisse und Bewertung).

3 PCR Primer- und Sondendesign

In der vorliegenden Arbeit kam ausschließlich PCR mit spezifischen Primern zum Einsatz. Der Großteil der eingesetzten Primer-Systeme wurde im Laufe der Arbeit entwickelt. Aus der Literatur übernommene Primer wurden als solche gekennzeichnet.

3.1 Primer- und Sondendesign zur Bakterienidentifizierung

Alle getesteten Primer-Systeme zum Nachweis bierschädlicher Bakterien sind im Bereich der 16S rDNA des jeweiligen Keims lokalisiert. Dieser DNA-Abschnitt dient als phylogenetischer Marker zur taxonomischen Einteilung von Bakterien (EHRMANN 1994) und wurde bereits häufiger als Grundlage für spezifische Standard PCR-Assays zum Nachweis brauereirelevanter Schadbakterien verwendet (DIMICHELE und LEWIS 1993, SATOKARI et al. 1997, YASUI et al. 1997, GUARNERI et al. 2001, WALTER et al. 2001). Auch für Real-Time PCR Anwendungen findet der 16S rDNA-Abschnitt Verwendung (RINTTILA et al. 2004), wobei die zur Verfügung stehenden kommerziellen Real-Time PCR-Assays für den Brauereibereich zusätzlich die 16S-23S ITS-Region benutzen (FANDKE et al. 2001). Die hochvariable, nicht-codierende Spacer-Region trennt die 16S rDNA und die 23S rDNA und liefert mehr Möglichkeiten zur Speziesdifferenzierung als die 16S rDNA (TILSALA-TIMISJÄRVI und ALATOSSAVA 1996).

Zur Auswahl geeigneter Primer-Bindestellen wurde mit 16S rDNA-Sequenzen, die in der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) hinterlegt waren, ein Alignment erstellt (Software: DNASTAR, Megalign, Lasergene). Homologe DNA-Abschnitte der Zielorganismen wurden als Vorwärtsprimer in Betracht gezogen, wenn Nicht-Zielkeime an den betreffenden Stellen Mismatches am 3'-Ende des Primers aufwiesen. Zusätzlich wurden Sequenz-Datenbanken mittels *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) analysiert, um auszuschließen, dass an diesen Stellen Homologien mit anderen, nicht im Alignment enthaltenen Sequenzen vorlagen.

Zu den ausgewählten Vorwärtsprimern wurden im Anschluss mit einer Software zum Primer-Design (Primer Express 1.5, Applied Biosystems) passende Rückwärtsprimer und TaqMan-Sonden bestimmt.

Die zugrunde gelegten Parameter für alle PCR-Assays waren wie folgt definiert:

- Annealingtemperatur der Primer: 60 °C
- Annealingtemperatur der Sonde: 10 °C über der Primer-Annealingtemperatur
- Maximale Amplikonlänge: 200 bp

Im folgenden sind die neu entwickelten bzw. aus der Literatur übernommenen Primer-Systeme zum Bakteriennachweis aufgelistet (Tab. 12).

Tab. 12: Standard PCR und Real-Time PCR Primersysteme zum Nachweis bierschädlicher Bakterien

Spezifität	System-name	Sonde	Primer	Primer-Sequenz (5'→3')	Quelle
Laktobazillen, Pediokokken	sLP200	---	LP200-f1	ACGTAGCCGACCTGAGAGGGTA	diese Arbeit
			LP200-f2	GGCGATGATACGTAGCCGAA	
Laktobazillen, Pediokokken	sLP600	s700	LP200-r	GATAACGCTTGCCACCTACGTATT	diese Arbeit
			LP600-f, LI-f	GGAGACTTGAGTGCAGCAGAGGAC AACTGGATAACTTGTGTGCAGAAA	
<i>L. brevis</i> , <i>L. brevis</i> <i>similis</i>	iLbr	i200	LP600-r1, LP600-r2	GTTTCGCTACCCATGCTTTTCG GTATCTAATCCTGTTTGCTACCCATA	diese Arbeit
			Lbr-f	TTCGGCTATCACTTCTAGATGA	
<i>L. buchneri</i> , <i>L. parabuchneri</i>	iLbu	i200	LP-r	ATTCCTACTGCTGCCTCCC	diese Arbeit
			Lbu-f	GGTAACCTGCCCTTGAAGTA	
<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. zeae</i>	iLca	i200	LP-r	ATTCCTACTGCTGCCTCCC	diese Arbeit
			Lca-f	AGAACCGCATGGTTCTTGGC	
<i>L. collinoides</i> <i>L. paracollinoides</i>	iLcol	i200	Lcol	ATTAGCTAGTTGGTGGAGTAATGGT	diese Arbeit
			LP-r	ATTCCTACTGCTGCCTCCC	
<i>L. coryniformis</i>	iLcor	i200	Lco-f	CTTTGGCTGTCACTTTTGGAC	diese Arbeit
			LP-r	ATTCCTACTGCTGCCTCCC	
<i>L. lindneri</i>	iLli	s700	LI-f	AACTGGATAACTTGTGTGCAGAAA	diese Arbeit
			LI-r	CGAGCCTCAGCGTCAGATG	
<i>L. perolens</i>	iLpe	i200	Lpe-f	ACCGCATGGTCTCCGG	diese Arbeit
			LP-r	ATTCCTACTGCTGCCTCCC	
<i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> <i>L. pentosus</i>	iLpl	i200	Lpl-f	ACCGCATAACAACCTGGACCG	diese Arbeit
			LP-r	ATTCCTACTGCTGCCTCCC	
<i>P. damnosus</i>	iPda	i200	Pd-f	CAGATGCTAATACCGCATAATAAAATG	IJIMA und MOTOYA- MA 2001
			LP-r	ATTCCTACTGCTGCCTCCC	
<i>Pectinatus</i> spp., <i>Megasphaera cerevisiae</i> <i>Selenomonas lactificifex</i>	sPM	s560	PM-f	GCAAGCGTTGTCCGGAAT	diese Arbeit
			PM-r	TCGTTACGCGGCGTT	

Einige der Identifizierungs-Assays (Tab. 12) benutzen den universellen Rückwärtsprimer LP-r und die Sonde i200. Die Spezifität der Assays sollte in diesem Fall durch einen hochspezifischen Vorwärtsprimer gewährleistet werden. Der Grund für dieses Vorgehen war, durch die begrenzte Anzahl von Primern und nur einer Sonde, verschiedene Identifizierungen zu einem genau definierten Screening-System kombinieren zu können. Da die Wahrscheinlichkeit unspezifischer PCR-Produkte und abnehmender Sensitivität mit zunehmender Anzahl von Oligonukleotiden steigt, wurde daher von Beginn an versucht, die Zahl der Primer und Sonden so gering wie möglich zu halten (JOHNSON 2000). Die Vorwärtsprimer liegen daher in der variablen V2-Region der 16S-rDNA, während die Sonde und der Rückwärtsprimer im anschließenden konservierten Bereich liegen.

Die Fluoreszenzsonden wurden mit folgenden Reporter/Quencher-Kombinationen versehen, um mit den entwickelten Systemen Möglichkeiten für eine Multiplex-PCR zu schaffen (Tab. 13).

Tab. 13: Sondensequenzen und Reporter/Quencher-Kombinationen zum Nachweis bierschädlicher Bakterien

Sonde	Verwendung	Reporter	Quencher	Sequenz 5' → 3'
i200	Identifizierung für Laktobazillen und Pediokokken	FAM	BHQ1	CCACATTGGGACTGAGACACGGCC
		CY5	BHQ2	
s700	Screening Laktobazillen und Pediokokken	FAM	BHQ1	TGGCGAAGGCGCTGTCTAGTCTG
		HEX	BHQ1	
s560	Screening <i>Pectinatus</i> spp. und <i>Megasphaera cerevisiae</i>	ROX	BHQ2	CGTAAAGGGAGCGCAGGCGGA
		FAM	BHQ1	

3.2 Primer- und Sondendesign zur Hefeidentifizierung

Die prinzipielle Vorgehensweise beim Design der Hefe-PCR-Assays erfolgte analog zu den Bakterien-Assays (3.1). Allerdings wurde für die meisten Primer-Systeme durch die Verwendung der Internal transcribed spacer (ITS)-Regionen ein anderer Sequenzabschnitt zugrunde gelegt (MOLINA et al. 1993). Bei *S. cerevisiae* sind die vier verschiedenen kodierenden rDNA Gene 5S, 5.8S, 18S (SSU, small sub-unit) und 26S (LSU, large sub-unit) in einer Kopf-Schwanz-Anordnung in Form von Wiederholungen auf Chromosom XII angeordnet. Die 18S, 5.8S, 26S und 5S-Gene sind durch die ITS- bzw. die IGS (Intergenic Spacer) voneinander getrennt (MOLINA et al. 1993, DREIER und KLEESIEK 2004).

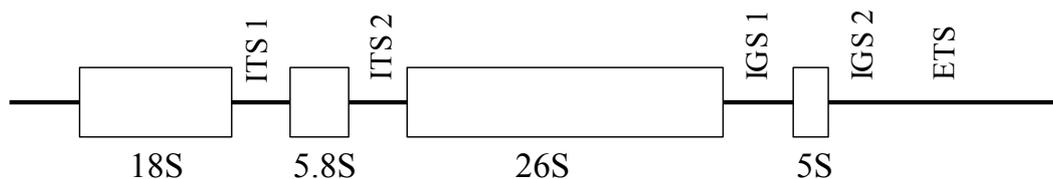


Abb. 2: Schematische Darstellung der 18S, 5.8S, 26S und 5S rDNA von Hefen; Zusätzlich gekennzeichnet ist die Lage der ITS und IGS-Regionen

ITS und IGS sind mit Ausnahme der kurzen 5S und 5.8S Gene nicht-kodierende Abschnitte, die im Gegensatz zu den kodierenden Fragmenten einen hohen Grad an interspezifischen Unterschieden aufweisen (FERNANDEZ-ESPINAR et al. 2000). Gleichzeitig sind die intraspezifischen Polymorphismen in den ITS-Regionen nicht sehr ausgeprägt (Abb. 3), weshalb sich diese Regionen anders als die 18S oder 25S rDNA-Abschnitte für Identifizierungen bzw. Klassifizierungen besser eignen (ESTEVE-ZARZOSO et al. 1999; MCCULLOUGH et al. 1998; JOSEPA et al. 2000).

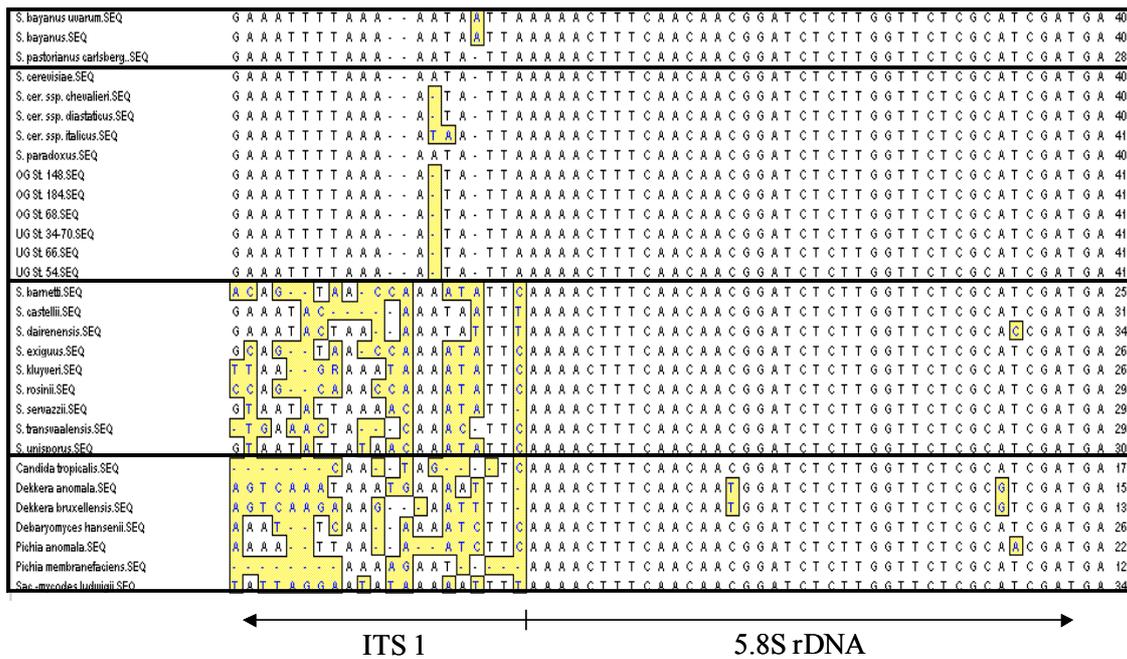


Abb. 3: DNA-Alignment verschiedener Hefen in der ITS1 und der 5.8S rDNA-Region; gelbe Markierungen: Polymorphismen zu *S. cerevisiae*

Mit dem kombinierten Einsatz von PCR und RFLP ist es bereits möglich, durch Benutzung der ITS-Regionen eine Unterscheidung zwischen *S. cerevisiae*/*S. paradoxus* auf der einen und *S. bayanus*/*S. pastorianus* auf der anderen Seite zu treffen (MONTROCHER et al. 1998, FERNANDEZ-ESPINAR 2000, MORAKILE et al. 2002).

Andere häufig angewandte molekularbiologische Verfahren zur Brauhefe-Differenzierung oder zum Fremdhefe-Nachweis sind

- AFLP (SCHÖNEBORN 2002)
- PCR mit nachfolgender RFLP (YAMAGISHI et al. 1998, MOLINA et al. 1993, BARSZCZEWSKI und ROBAK 2003)
- PFGE (KUNZE et al. 1993)
- RAPD-PCR (LAIDLAW et al. 1996, TOMPKINS et al. 1996)
- PCR Fingerprint (BALEIRAS COUTO et al. 1996, de BARROS LOPES et al. 1998)
- Spezifische Standard PCR (JOSEPA et al. 2000, SCHERER 2002, TORRIANI et al. 2004)

Viele dieser Verfahren lassen sich allerdings aufgrund ihrer Komplexität und Analysendauer nur bedingt in die betriebliche Routineanalytik transferieren (JOSEPA et al. 2000). Daher wurde versucht, auf Basis der bereits vorliegenden Erkenntnisse schnellere und benutzerfreundlichere Real-Time PCR Assays zu entwickeln, die für den Routineeinsatz in Brauereilabors besser geeignet sind. Im folgenden sind die Primer-Systeme zur Hefe-Identifizierung aufgelistet (Tab. 14).

Tab. 14: Real-Time PCR Primersysteme zum Nachweis brauereinelevanter Hefen

Spezifität	Primer	Sonde	System-name	Primer-Sequenz (5'→3')	Quelle
<i>S. cerevisiae</i>	Sc-f	Scer	Sce	CAAACGGTGAGAGATTTCTGTGC	JOSEPA et al. 2000
	Sc-r			GATAAAATTGTTTGTGTTTGTACCTCTG	
<i>S. bayanus</i> , <i>S. pastorianus</i>	Sbp-f	Y58	Sbp	CTTGCTATTCCAAACAGTGAGACT	JOSEPA et al. 2000
	Sbp-r1 Sbp-r2			TTGTTACCTCTGGGCGTCGA GTTTGTACCTCTGGGCTCG	
Untergärige Kulturhefen, <i>S. pastorianus</i>	UG300E	UG	UG300	CTC CTT GGC TTG TCG AA	SCHERER 2002
	UG300M			GGTTGTGCTGAAGTTGAGA	
<i>S. diastaticus</i>	Sd-f	Sdia	Sdi	TTCCAAGTGCAGTCTAGTTCTAGAGG	diese Arbeit
	Sd-r			GAGCTGAATGGAGTTGAAGATGG	
<i>S. exiguus</i>	Sx-f	Y58	Sx	TTTCAAATCTGCTTTATTGCAGTAACC	diese Arbeit
	Sx-r			CATTACGTATCGCATTTCGCTG	
<i>Candida tropicalis</i>	Ct-f	Y58	Ctr	CCAAACTTTTTATTACAGTCAAACCTT	diese Arbeit
	Ct-r			CTGCAATTCATATTACGTATCGCAT	
<i>Dekkera anomala</i>	Da-f	Y58	Dan	ATTATAGGGAGAAATCCATATAAAACACG	diese Arbeit
	Da-r			CACATTAAGTATCGCAATTCGCTG	
<i>Dekkera bruxellensis</i>	Db-f	Y58	Dbr	TGCAGACACGTGGATAAGCAAG	diese Arbeit
	Db-r			CACATTAAGTATCGCAATTCGCTG	
<i>Pichia anomala</i>	Pa-f	Y58	Pan	AATGTTAAACCTTTAACCAATAGTCATG	diese Arbeit
	Pa-r			ACGTATCGCATTTCGCTGC	
<i>Pichia membranefaciens</i>	Pm-f	Y58	Pme	ACCTGGAGTATACACACGTCAAC	diese Arbeit
	Pm-r			CTAGGTATCGCATTTCGCTGC	
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	Sl-f	Y58	Slu	GACGAGCAATTGTTCAAGGGTC	diese Arbeit
	Sl-r			ACTTATCGCAATTCGCTACGTTTC	

Die verwendeten Sonden wurden mit folgenden Fluoreszenzfarbstoffen (Reporter/Quencher) versehen (Tab. 15).

Tab. 15: Sondensequenzen und Reporter/Quencher-Kombinationen zum Nachweis brauereinelevanter Hefen

Sonden-bezeichnung	Reporter	Quencher	Sequenz 5'→3'
Y58	FAM	BHQ1	AACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGAT
	HEX	BHQ1	
UG	FAM	BHQ1	TGCTCCACATTTGATCAGCGCCA
Scer	FAM	BHQ1	ACACTGTGGAATTTTCATATCTTTGCAACTT
Sbp	FAM	BHQ1	ACTTTTGCAACTTTTTCTTTGGGTTTCGAGCA
Sdia	FAM	BHQ1	CCTCCTTAGCAACATCACTTCTCCG

Analog zu den Bakterien PCR-Assays wurde auch hier in mehreren Systemen der Vorwärtsprimer in eine hochvariable Region, in diesem Fall ITS1, gelegt, um auf diese Weise die Spezifität der Systeme zu gewährleisten. Die Sonde (Y58) und der jeweilige Rückwärtsprimer waren innerhalb der konservierten 5.8S rDNA lokalisiert. Die Möglichkeit der Kombination von Identifizierungen zu begrenzten Screening-Systemen mit einer möglichst geringen Anzahl an Primern und Sonden war somit ebenfalls gegeben.

Ausnahmen bei dieser allgemeinen Vorgehensweise stellen die Assays Sce, Sbp, UG300 und Sdi dar, auf deren Gestaltung im folgenden genauer eingegangen wird.

3.2.1 Design der Assays Sce und Sbp

Die Taxonomie innerhalb der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe unterlag in den letzten Jahren aufgrund verbesserter molekulargenetischer Methoden einigen Änderungen (JESPERSEN et al. 2000). Untergärige Brauhefe stellt demzufolge ein Hybrid aus *S. bayanus* oder *S. pastorianus* und *S. cerevisiae* dar (CASAREGOLA et al. 2001). Sie wird derzeit *S. pastorianus* zugeordnet, da *S. pastorianus* ebenfalls ein Hybrid aus *S. bayanus* und *S. cerevisiae* ist (VAUGHAN-MARTINI und MARTINI 1998, TAMAI et al. 1998). Die Begriffe *S. carlsbergensis* und *S. pastorianus* werden synonym verwendet (VAUGHAN-MARTINI und MARTINI 1998). *S. pastorianus* gilt allerdings auch als Fremdhefe (BACK 1994), was die Einordnung dieser Hefe als Kultur- oder Fremdhefe unklar erscheinen lässt. Zudem wurde postuliert, dass *S. bayanus* wiederum ein Hybrid aus *S. uvarum* und *S. cerevisiae* darstellt, und *S. uvarum* daher als eigene Spezies in der *Sacchromyces sensu stricto*-Gruppe etabliert werden sollte (PULVIRENTI et al. 2000).

Zur Auswahl der Primer für die Sce und Sbp-Systeme standen anfänglich keine Sequenzdaten von Kulturhefen zur Verfügung. Daher wurden je drei ober- und drei untergärige Brauhefen der Weihenstephaner Hefebank im betreffenden Abschnitt (ITS1-5.8S-ITS2) sequenziert. Zur Amplifikation des Zielbereichs wurden die Primer 3126T und 2234C verwendet (MONTROCHER et al. 1998).

Sowohl ober- als auch untergärige Brauhefen wiesen im ITS1-Bereich nahezu identische Basenfolgen auf, die wiederum im Einklang stehen mit bekannten *S. cerevisiae*-Sequenzen der NCBI-Datenbank (Abb. 4). Ober- als auch untergärige Kulturhefen weisen an den betreffenden Stellen übereinstimmende Polymorphismen zu *S. bayanus* und *S. pastorianus* Typstämmen auf (Abb. 4), was vermuten ließ, dass untergärige Brauhefen an der sequenzierten Stelle ausschließlich Sequenzanteile von *S. cerevisiae* enthalten.

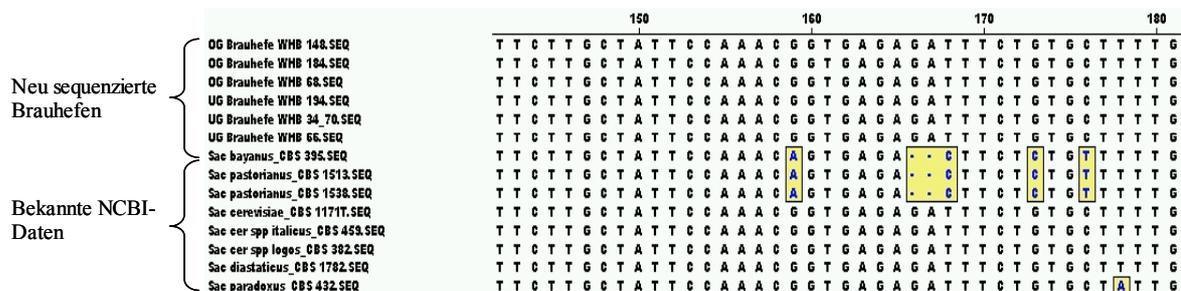


Abb. 4: Ausschnitt aus ITS1-Sequenzdaten bereits sequenzierter Hefen und neu sequenzierter Brauhefen

Das Sce-System ist von JOSEPA et al. (2000) abgeleitet und basiert, bis auf zwei zusätzliche Basen am 5'-Ende, auf demselben Vorwärtsprimer. Um die Real-Time PCR Kompatibilität des Systems herzustellen (Amplikon < 150 bp), wurden der Rückwärtsprimer und die Sonde ebenfalls innerhalb der ITS1-Region gewählt.

Der Vorwärtsprimer des Sbp-Systems leitet sich ebenfalls auf JOSEPA et al. (2000) ab. Sonde sowie Rückwärtsprimer liegen analog zum Sce-System in der ITS1-Region.

Gemäß der vorliegenden Sequenzinformationen war zu erwarten, dass das Sce-System ober- und untergärrige Brauhefen sowie Varietäten von *S. cerevisiae* erfasst. Mit dem Sbp-Assay hingegen müssten sich spezifisch *S. bayanus*, *S. pastorianus* und *S. uvarum* detektieren lassen.

3.2.2 Design des UG300-Assays

Das UG300-Assay zur Identifizierung untergärriger Hefen basiert auf dem von SCHERER (2002) mittels subtraktiver Hybridisierung abgeleiteten Primerpaar UG300E/UG300M. Das Standard-PCR Assay bot durch die geringe Amplikonlänge von 107 bp gute Voraussetzungen für einen Transfer auf Real-Time PCR. Da über die Basenfolge zwischen den Primern nur von der damals verwendeten Hefe (WHB 34/70) Sequenzdaten zur Verfügung standen, wurden die Amplikons zweier zusätzlicher untergärriger Brauhefen sequenziert. Bei übereinstimmender Basenfolge, sollte anschließend eine Fluoreszenzsonde zur Detektion untergärriger Hefen eingefügt werden.

Die Sequenzierung ergab, dass bei den untersuchten Hefen ein ausreichendes Maß an Homologien für eine universelle Sonde vorlag (Abb. 5).

```

UG Brauhefe WHB 194.SEQ  C A C C C T G A A G C T G G G T A T A A C C A C C T C A C T G C T C C A C A T T T G A T C A G C G C C A T T G A G C T C G A T C T A G 67
UG Brauhefe WHB 34-70.SEQ  C - - C T G A A G C T G G G T A T A A C C A C C T C A C T G C T C C A C A T T T G A T C A G C G C C A T T G A G C T C G A T C T A G 64
UG Brauhefe WHB 66.SEQ    C A C C C T G A A G C T G G G T A T A A C C A C C T C A C T G C T C C A C A T T T G A T C A G C G C C A T T G A G C T C G A T C T A G 67

```

Abb. 5: Sequenz der PCR-Amplikons dreier untergärriger Hefen basierend auf dem UG300-Primersystem

3.2.3 Design des Sdi Assays

Die Primer für das Sdi-System basieren auf dem *sta1*-Gen von *S. diastaticus*. Dieses Gen codiert für eine extrazelluläre Glucoamylase und begründet somit den übervergärenden Charakter von *S. diastaticus*. Durch die Verwertung von höheren Zuckern und Dextrinen kann Wachstum in endvergorenem Bier erfolgen, weshalb diese Hefe als obligat bierschädlich eingestuft wird (BACK 1994). Zusätzlich können *S. diastaticus* Fremdhefen durch Decarboxylierung von Ferula- oder Zimtsäure unerwünschte „phenolic-off-flavours“ erzeugen (HOPE 1987).

In Abb. 6 und Abb. 7 ist der unterschiedliche Aufbau des Gens bei *S. diastaticus* und bei

S. cerevisiae dargestellt. Bei *S. diastaticus* grenzen die Untereinheiten des *sta1*-Gens (I-IV und IS) direkt aneinander an, während sie bei *S. cerevisiae* durch Insertionen zersplittert sind in die S1, S2 und SGA-Region (YAMAGISHI et al. 1997).

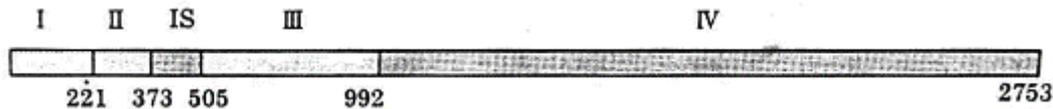


Abb. 6: Aufbau des *sta1*-Gens von *S. diastaticus*

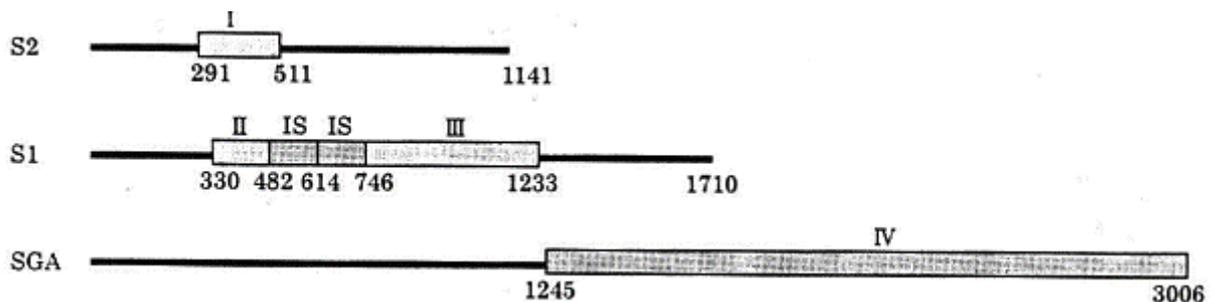


Abb. 7: Aufbau des *sta1*-Gens von *S. cerevisiae*

Die extrazelluläre Glucoamylase wird nur von *S. diastaticus*-Stämmen gebildet, während *S. cerevisiae*-Stämme über eine intrazelluläre sporulationsspezifische Glucoamylase verfügen. Das *S. diastaticus* Glucoamylasegen *sta1* ist vermutlich durch Fusion der S1, S2 und SGA Regionen von *S. cerevisiae* entstanden (YAMASHITA et al. 1985, PRETORIUS und LAMBRECHTS 1991).

Der abweichende Aufbau ermöglichte bereits die Auswahl geeigneter Primer zum spezifischen Nachweis von *S. diastaticus* (DREIER und KLEESIK 2004, YAMAGISHI et al. 1997). Allerdings sind die erwähnten Systeme auf LightCycler PCR mit FRET Hybridisierungssonden bzw. Standard PCR ausgelegt. Die entstehenden PCR-Produkte sind in beiden Fällen zu groß für ein effektives TaqMan-PCR Assay.

Die Primer der vorliegenden Arbeit wurden in den Regionen I und II gewählt, während die Sonde auf dem Übergang zwischen I und II plaziert wurde (Abb. 6). Die Primer besitzen bei *S. cerevisiae* zwar ebenfalls eine Bindestelle, allerdings sind die Primer ca. 950 bp voneinander getrennt (Abb. 7), weshalb unter Real-Time PCR Bedingungen eine ungenügende PCR-Effizienz vorliegt. Sollte dennoch eine Amplifikation von *S. cerevisiae*-DNA stattfinden, wird durch die fehlende Bindestelle für eine Sonde eine Fluoreszenzmessung verhindert, da die Bereiche I und II nicht direkt angrenzen und ein Anlagern der Sonde verhindert wird (Abb. 7, Abb. 8).

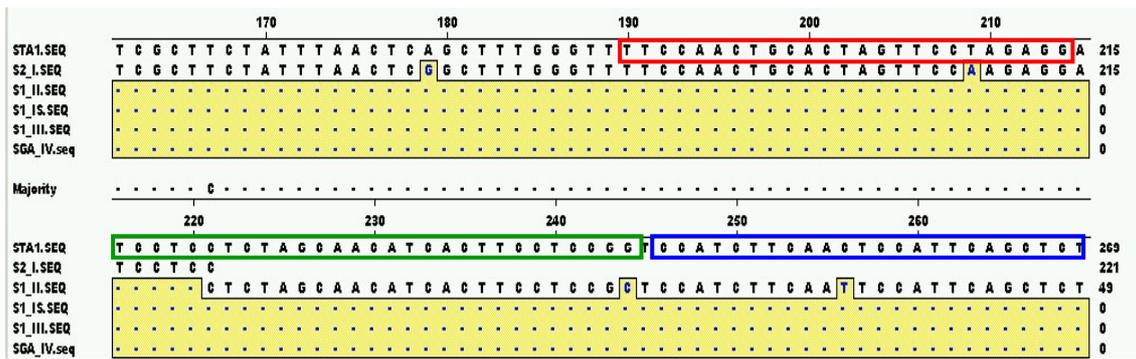


Abb. 8: Primer (rot und blau) und Sonde (grün) des Sdi-Assays auf dem *sta1*-Gen von *S. diastaticus*. Zusätzlich dargestellt sind die Regionen S2 I, S1 II, S1 IS, S1 III und SGA IV von *S. cerevisiae* an der entsprechenden Stelle (siehe Abb. 6, Abb. 7)

Der von YAMAGISHI et al. (1997) dargestellte unterschiedliche Aufbau der Glucoamylasegene bei *S. cerevisiae* und *S. diastaticus* wurde anhand zweier Primer-Systeme mittels Standard PCR überprüft. Zum einen wurde das Sdi-System (Tab. 14, Abb. 8) ohne Sonde verwendet. Zusätzlich wurde ein Primerpaar gewählt, bei dem der Vorwärtsprimer in der Region II und der Rückwärtsprimer im IS-Abschnitt lag. Falls die beschriebene Struktur der Gene zutrifft, müssten sich mit dem zweiten System (Sdi2) bei *S. cerevisiae* zwei Banden ergeben, während bei *S. diastaticus* nur eine Bande detekrierbar sein sollte (Sdi2-f: CCATCTTCAACTCCATTCAGCTCTG; Sdi2-r: TGGTGTTATGACAGAAGTCGTAGTT). Abb. 9 zeigt die erzielten Ergebnisse mit den jeweiligen Primersystemen:

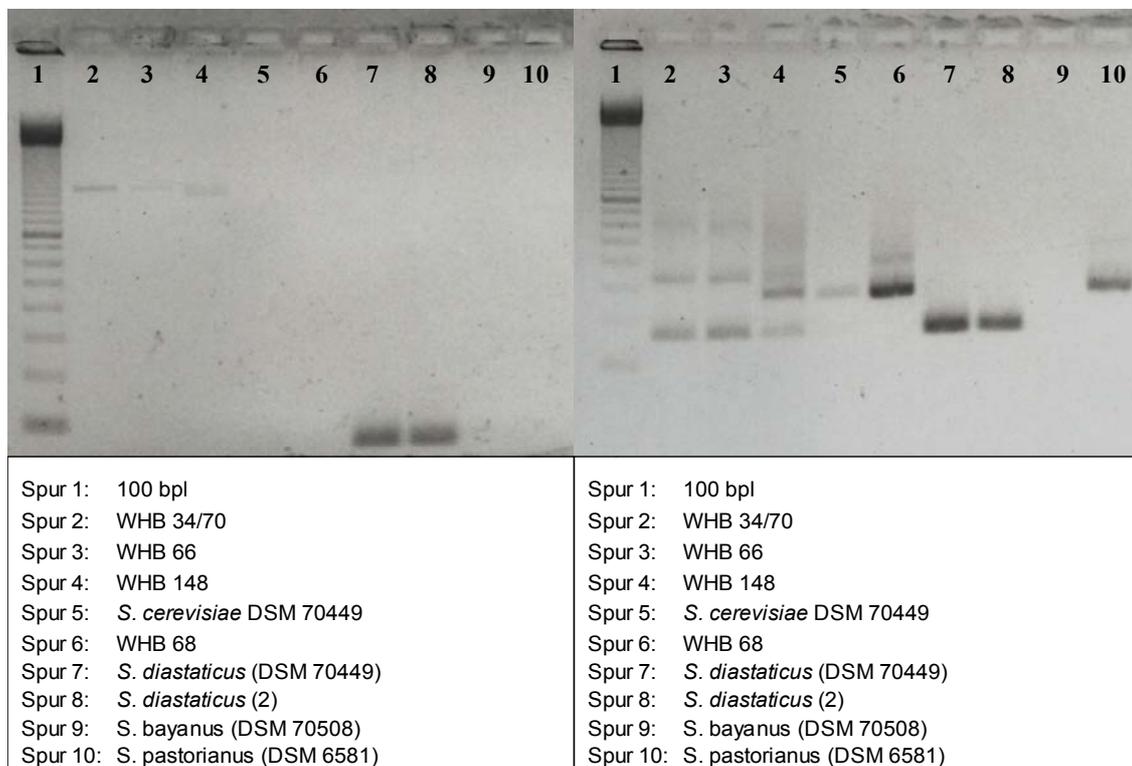


Abb. 9: Struktur der Glucoamylasegene bei verschiedenen *Saccharomyces*-Hefen. Standard PCR mit Sdi-Assay (links) und Sdi2-Assay (rechts)

Das Sdi-System lieferte die erwarteten Banden für *S. diastaticus*. Zusätzlich wurden bei den Hefen WHB 34/70, 66 und 148 schwache Banden mit einer Länge von etwa 1300 bp festgestellt, was in etwa dem Bereich zwischen den Regionen I und II in Abb. 7 entspricht. Unter Real-Time PCR-Bedingungen ist allerdings nicht mit einer Detektion dieser Hefen zu rechnen. Mit dem Sdi2-Assay wurden bei den jeweiligen Hefen differierende Bandenmuster erzielt, wobei die unterschiedlichen *Saccharomyces*-Hefen 1-3 Banden aufwiesen, während die *S. diastaticus*-Stämme nur eine Bande ausbildeten (Abb. 9). Die erzielte Bande (~80 bp) der *S. diastaticus* Hefen war einmalig vertreten. Der unterschiedliche Aufbau des Gens bei *S. diastaticus* im Vergleich zu anderen Vertretern der *Saccharomyces sensu stricto*-Gruppe konnte bestätigt werden. Allerdings wurde durch die Bandenmuster gezeigt, dass nicht für alle *S. cerevisiae*-Hefen zwingend die von YAMAGISHI et al. (1997) aufgezeigte Struktur vorliegt.

4 Optimierung der PCR-Probenaufarbeitung

Ausgehend von der Probe bis hin zur eigentlichen PCR stellt sich ein typischer Arbeitsablauf für eine PCR-Analyse wie folgt dar (Abb. 10).

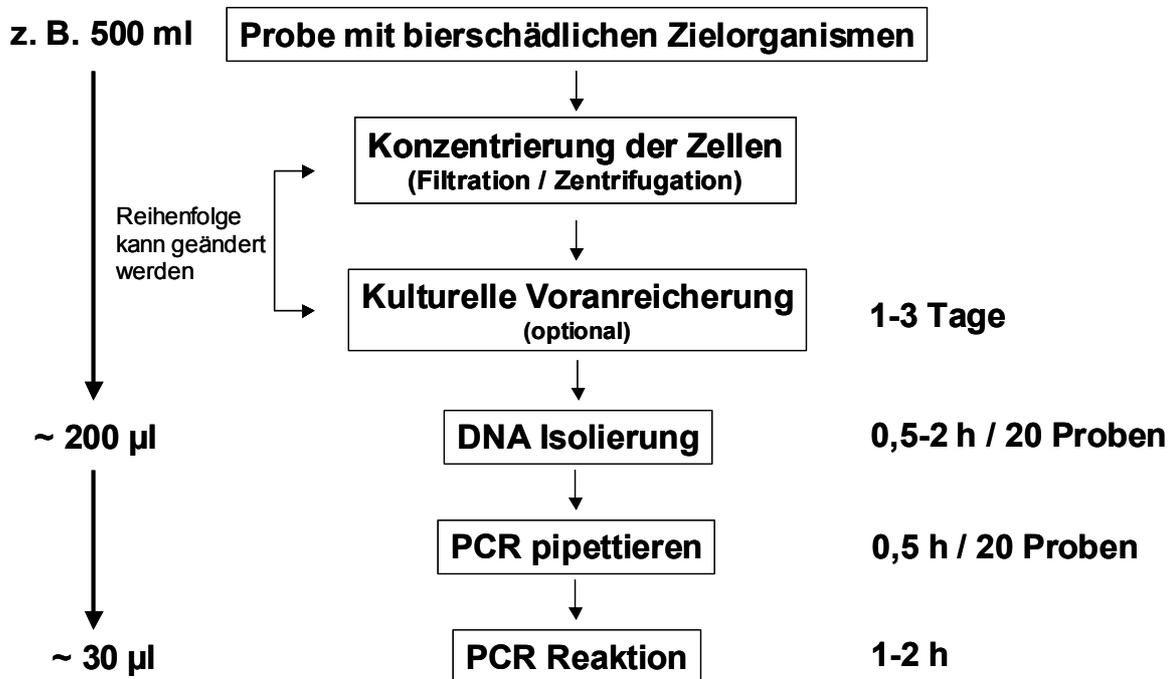


Abb. 10: Ablaufschema PCR-Probenaufarbeitung

Ebenfalls exemplarisch dargestellt ist der etwa notwendige Zeitbedarf und das zu handhabende Volumen bei der Durchführung einer PCR.

Anhand von Abb. 10 wird deutlich, dass vor allem die Punkte Konzentrierung der Zellen, kulturelle Voranreicherung und DNA Isolierung so optimal wie möglich gestaltet sein müssen, um ein korrektes Analysenergebnis zu gewährleisten.

4.1 Verbesserte Methoden zur kulturellen Voranreicherung bierschädlicher Bakterien für nachfolgende PCR

Die kulturelle Voranreicherung ist kein essentieller Bestandteil der PCR-Analytik, kann allerdings für den hier angewandten Zweck notwendig werden, um eine ausreichende Sensitivität bzw. Nachweissicherheit der Methode zu garantieren (JUVONEN et al. 1998, BISCHOFF et al. 2001).

4.1.1 Ausgangssituation

Bei Verkeimungen im Spurenbereich bzw. unterhalb der PCR-Nachweissgrenze bietet die

kulturelle Voranreicherung eine einfache Möglichkeit, um das für die PCR-Analytik notwendige Keimniveau zu erreichen. Gleichzeitig wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass lebende Keime erfasst werden (JUVONEN et al. 2003, HORFAAR et al. 2003). Die Voranreicherung muss so effektiv wie möglich gestaltet werden, um die Vorteile der PCR wie Schnelligkeit oder Spezifität nicht durch unsachgemäße Kultivierungsmethoden zunichte zu machen. Die Anforderungen an eine praxistaugliche Voranreicherung bzw. ein Nachweismedium lassen sich dabei wie folgt darstellen (BRANDL und GEIGER 2003):

- Schnelles und sicheres Wachstum *aller* obligat und potentiell bierschädlichen Bakterien mit Hilfe *eines* universellen Mediums (*Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Megasphaera* spp., *Pectinatus* spp.)
- Eignung des Nährmediums für nachfolgende PCR (keine DNA Verunreinigungen, keine PCR-inhibierenden Substanzen)

Um diese Ziele zu erreichen, stellen sich folgende Fragen in Bezug auf Medium und Methode:

- Fester oder flüssiger Nährboden?
- Welches Nährmedium ist am geeignetsten?
- Spezifische oder unspezifische Anreicherung?
- Bei filtrierbaren Proben: Filtration vor oder nach der Anreicherung? (Zur Vermeidung einer aeroben Stresssituation für strikt anaerobe Keime)

Prinzipiell benötigen Milchsäurebakterien für optimales Wachstum komplexe, nährstoffreiche Milieubedingungen, da ihr hoher Bedarf an Aminosäuren, Vitaminen, Spurenelementen und Nukleinsäurederivaten nur auf diese Weise zu decken ist (SCHLEGEL 1992).

Daher liegen speziell bei der Fragestellung, welches Medium zum Nachweis bierschädlicher Bakterien am besten geeignet ist, differierende Meinungen vor. Auf diesem Gebiet wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt und da das optimale Medium speziell zum Nachweis aller Milchsäurebakterien noch nicht gefunden wurde, wird oft eine Kombination verschiedener Medien empfohlen (JESPERSEN und JAKOBSEN 1996, BOULTON und QUAIN 2001, SAKAMOTO und KONINGS 2003).

Der Grund für diese unterschiedliche Bewertung liegt oft in der Zielsetzung, die mit den jeweiligen Medien verfolgt wird. So sind Medien, die die Mehrzahl aller Laktobazillen erfassen, meist nicht selektiv genug gegenüber harmlosen Indikatorkeimen, während sehr selektive Medien Defizite in der Nachweissicherheit aufweisen (CAMPBELL und PRIEST 1996). Die Bierschädlichkeit, und damit auch die Fähigkeit von Milchsäurebakterien in Bier und auf selektiven Nährböden zu wachsen, liegt in erster Linie in den Hopfenresistenzmechanismen dieser Bakterien begründet (SAKAMOTO und KONINGS 2003,

SIMPSON und FERNANDEZ 1991, SIMPSON 1993, SAMI et al. 1997). Mit unterschiedlich selektiven Medien konnte zudem auch gezeigt werden, dass sich Differenzen in der Nachweisgeschwindigkeit ergeben. So weisen Keime auf selektiven Nährböden eine geringere Wachstumsgeschwindigkeit auf als bei unselektiven Medien (OTT 2001). Dieser Punkt ist allerdings entscheidend, wenn kulturelle Voranreicherung mit einer Schnellmethode wie PCR kombiniert werden soll. Trotz der Vielfalt an Medien werden generell MRS, modifizierte Versionen von MRS, VLB-S7, RR-3 und NBB als geeignete Medien zum Nachweis von Milchsäurebakterien genannt (PRIEST und CAMPBELL 1996, JESPERSEN und JAKOBSEN 1996, JUVONEN et al. 2003).

Zum Nachweis gram-negativer strikt anaerober Bakterien wie *Pectinatus* spp. oder *Megasphaera cerevisiae* werden ebenfalls eine Reihe von Nährmedien empfohlen, darunter SMMP, ein Medium, das speziell für diese Keime entwickelt wurde (LEE 1994). Allerdings werden auch NBB-C, MRS und MIB als geeignet angesehen (THOLOZAN et al. 1997, SAKAMOTO und KONINGS 2003, JUVONEN et al. 2003). In vorangegangenen Arbeiten am Lehrstuhl wurde MIB als bestes Medium zum Nachweis von *Pectinatus* spp. und *Megasphaera cerevisiae* getestet (OTT 2001).

Zusätzlich liegen im Brauereibereich filtrierbare Proben (Drucktanks, Abfüllung) und unfiltrierbare Proben (Hefe, Gär-, Lagerkeller) vor, die unterschiedliche Maßnahmen zur Probenverarbeitung und Zellsammlung notwendig machen. Ein verlässlicher Schnelldachweis ist im Abfüllbereich von herausragender Bedeutung, da hier die Chargenfreigabe erfolgt. Für alle Versuche wurden Flüssignährböden verwendet, da hier eine optimale Nährstoffversorgung und ein optimales Wachstum gewährleistet ist (STRACHOTTA 2003). Außerdem können Flüssigmedien im weiteren PCR-Ablauf problemlos bearbeitet werden. Es bestehen gute Möglichkeiten zur Einengung von Zellen mittels Filtration oder Zentrifugation. und Flüssignährböden können für filtrierbare und unfiltrierbare Proben eingesetzt werden.

4.1.2 Auswirkungen einer Membranfiltration auf eine nachfolgende Anreicherung

Vor den Medien-Vergleichstests sollte die Frage geklärt werden, ob bei filtrierbaren Proben eine Membranfiltration vor oder nach der Anreicherung erfolgen sollte. Eine Membranfiltration bietet den Vorteil der quantitativen Sammlung aller in der Ausgangsprobe enthaltenen Zellen. Dadurch ließe sich die Nachweissicherheit bei Spurenkontaminationen erhöhen, da anschließend der Filter mit der maximalen Anzahl an Keimen bebrütet wird. Allerdings könnten die oxidativen Streßbedingungen während dieser Art der Probenbehandlung zum Absterben strikt anaerober Keime wie z. B. *Pectinatus* spp. und *Megasphaera cerevisiae* führen. Eine anschließende Kultivierung wäre somit nicht mehr möglich (JUVONEN et al. 1998, JUVONEN et al. 2003).

In diesem Zusammenhang wurden *Laktobazillus lindneri* und *Laktobazillus brevis* (BS 38, BS 40) sowie *Pectinatus frisingensis* (BS 42) und *Megasphaera cerevisiae* (BS 46) jeweils in Dreifachbestimmung untersucht. Die Keime wurden nach Filtration einer beimpften 500 ml Bierprobe bzw. ohne vorherige Filtration auf BVF mit den entsprechenden Nährmedien überimpft und anschließend 8 Tage anaerob bebrütet. Die Filtrationsproben sowie die BVF ohne Filter wurden mit jeweils 10^5 Zellen des jeweiligen Zielkeims beimpft. Die Kultivierung der Laktobazillen erfolgte in MRSF und die strikt anaeroben Keime wurden in MIB bebrütet.

Tab. 16: Auswirkung einer Membranfiltration auf eine nachfolgende Kultivierung obligat bierschädlicher Keime; Dreifachbestimmung pro Keim und Methode

Probenart	8-tägige Inkubation; Zeitdauer bis zur visuellen Trübung; Mittelwert und Standardabweichung [h]			
	<i>L. lindneri</i> (BS 38)	<i>L. brevis</i> (BS 40)	<i>Pectinatus frisingensis</i> (BS 42)	<i>Megasphaera cerevisiae</i> (BS 46)
Filtration einer beimpften Bierprobe; Inkubation des Filters in MIB	52 ± 3	31 ± 2	neg	neg
Zellen ohne Filtration auf MIB überimpft	50 ± 3	30 ± 0	92 ± 7	86 ± 3

Wie zu erwarten, konnte bei den strikt anaeroben Keimen nach einer Membranfiltration keine Vermehrung mehr registriert werden. Bei den beiden getesteten Laktobazillen zeigte die Filtration keine Auswirkungen auf die Wachstumsgeschwindigkeit, da Milchsäurebakterien mikroaerophil sind (SCHLEGEL 1992).

Die Versuche bestätigten, dass eine Filtration des gesamten Probenvolumens vor der Anreicherung aus den eben genannten Gründen vermieden werden sollte.

4.1.3 Zusammenhang zwischen Nachweisgeschwindigkeit und Selektivität

4.1.3.1 Nachweisgeschwindigkeit bei Milchsäurebakterien

Die vergleichenden Tests zwischen verschiedenen Nährböden wurden mit den empfohlenen Standardnährböden NBB-B, NBB-C, MRSF und RR-3 durchgeführt. Aufgrund vorangegangener Veröffentlichungen (JESPERSEN und JAKOBSEN 1996, BISCHOFF 2001) und lehrstuhlinterner Vorarbeiten (OTT 2001) erschienen diese Medien, oder eine Kombination aus ihnen, am vielversprechendsten.

Um unterschiedliche Selektivitäten zu simulieren, wurde bei den Medien der Bieranteil in der Anreicherung schrittweise erhöht. Bei den selbst hergestellten Nährböden wurden verschieden stark konzentrierte Versionen der Medien mit variierendem Bieranteil auf Einsatzkonzentration ausgemischt und angeimpft (Tab. 5). Die Fertigmedien NBB-B und NBB-C wurden wie empfohlen verwendet. In einer ersten Versuchsreihe wurde die

Wachstumsgeschwindigkeit jeweils dreier obligat bierschädlicher Milchsäurebakterien (BS 38, BS 40, BS 242) und dreier potentiell schädlicher Laktobazillen (BS 3, BS 285, BS 291) überprüft (n = 3). Die Kontrolle des Wachstums erfolgte anhand der Zeitdauer bis zu einer visuell feststellbaren Trübungszunahme in den BVF (Abb. 11). Außerdem wurden die Zellzahlen zu definierten Zeitpunkten (0 h, 24 h, 48 h, 72 h) mittels Ausplattieren von 20 µl Aliquots auf MRS-Agarplatten überprüft. Von den Anreicherungen der obligaten Bierschädlinge und zweier potentieller Schadkeime wurden zusätzlich PCR-Untersuchungen durchgeführt (24 h, 48 h, 72 h).

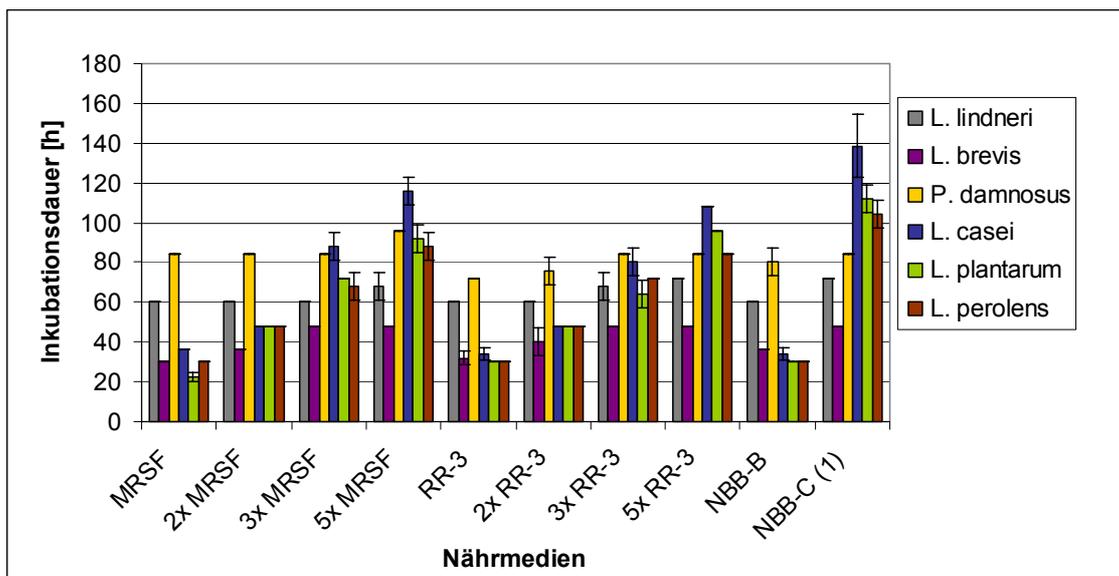


Abb. 11: Anreicherung obligat und potentiell bierschädlicher Laktobazillen in verschiedenen Flüssignährmedien; Zeitdauer [h] bis zum Eintritt einer visuell feststellbaren Trübungszunahme

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Zeitdauer bis zum Eintritt einer visuell wahrnehmbaren Trübung mit zunehmendem Biergehalt in der Anreicherung ansteigt, wobei diese Tendenz bei den potentiell schädlichen Keimen deutlich stärker ausgeprägt ist (Abb. 11). Bei BS 38, BS 40 und BS 242 ergaben sich Unterschiede zwischen langsamster und schnellster Methode von maximal 24 h (BS 242), während sich bei BS 3, BS 285 und BS 291 Differenzen von teilweise über 100 h ergaben.

Bei den Koloniezahlergebnissen sind in den Diagrammen die Zeitpunkte dargestellt, bei denen ein eindeutiges Auszählen noch möglich war (CFU < 500/Platte) sowie der Zeitpunkt, bei dem die Zellzahl zum ersten mal ≥ 500 /Platte betrug. Eine exakte Zellzahlbestimmung auf den Platten war ab hier nicht mehr möglich, weshalb die Werte mit „500“ (ohne Standardabweichung) angegeben werden. Die tatsächlichen Werte lagen jedoch teilweise weitaus höher. Die hier erzielten Resultate bestätigten die Beobachtungen der visuellen Trübungskontrolle. Eine Erhöhung des Bieranteils hatte zu vergleichbaren Zeitpunkten stets eine geringere Keimzahl zur Folge. Exemplarisch sind an dieser Stelle die Ergebnis-

se von *L. brevis* (BS 40; Abb. 12) und *L. plantarum* (BS 285; Abb. 13) dargestellt. Die Resultate der übrigen Keime (BS 38, BS 242, BS 3, BS 291) sind im Anhang ersichtlich (Anh. 1-Anh. 4).

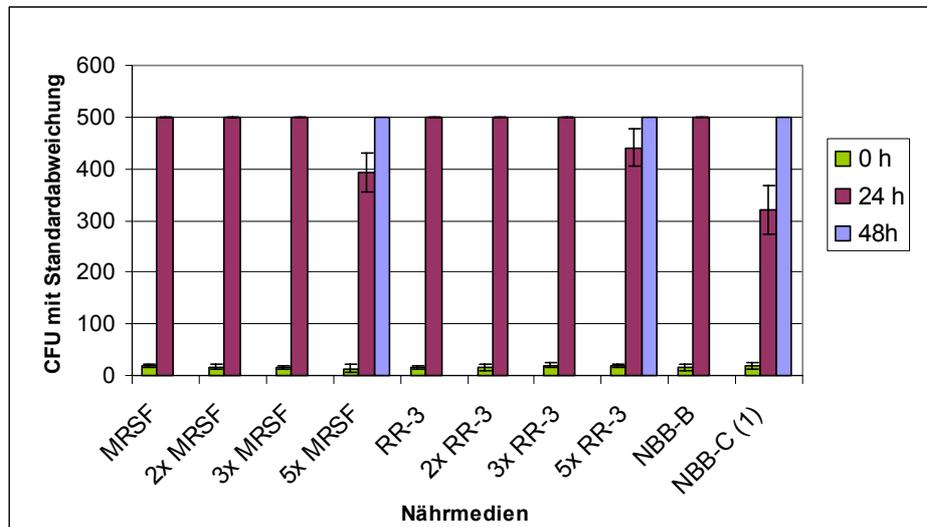


Abb. 12: Anreicherung von *L. brevis* (BS 40) in verschiedenen konzentrierten Flüssignährmedien mit variierendem Bieranteil; CFU in 20 µl Aliquots nach definierten Zeitpunkten; (CFU ≥ 500 nicht mehr auszählbar; CFU ≥ 500 sind als Ordinatenwert 500 dargestellt)

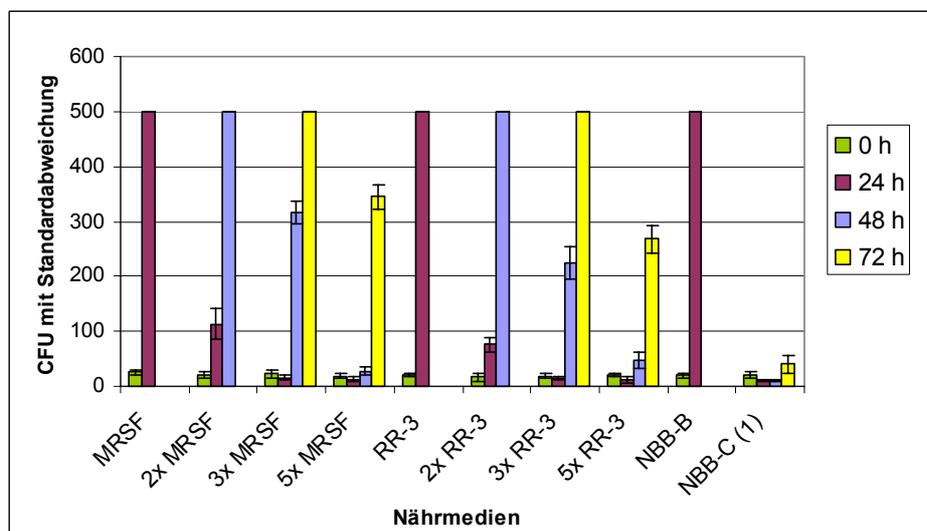


Abb. 13: Anreicherung von *L. plantarum* (BS 285) in verschiedenen konzentrierten Flüssignährmedien mit variierendem Bieranteil; CFU in 20 µl Aliquots nach definierten Zeitpunkten; (CFU ≥ 500 nicht mehr auszählbar; CFU ≥ 500 sind als Ordinatenwert 500 dargestellt)

Hier bestätigt sich wiederum, dass sich bei den potentiell schädlichen Organismen eine Zunahme der selektiven Kriterien in stärkerem Maße auf die Wachstumsgeschwindigkeit auswirkt. Bei BS 38, BS 40 und BS 242 ergab sich kein Fall, bei dem das Keimniveau der schnellsten Methode nicht innerhalb von 24 h auch mit der langsamsten Methode erreicht wurde. Bei BS 3, BS 285 und BS 291 ergaben sich hier Unterschiede von ≥ 48h.

Die bisher erfolgten Kontrollen der Wachstumsgeschwindigkeit wurden abschließend noch mittels PCR abgesichert.

Zu definierten Zeitpunkten wurden 150 µl Aliquots der Anreicherungen entnommen und mittels Real-Time PCR untersucht (PCR-Assay: sLP600). Bei negativen Ergebnissen ist beim entsprechenden Zeitpunkt kein Wert angegeben. Proben, die zum untersuchten Zeitpunkt schon Trübung aufwiesen, wurden nicht mehr mittels PCR untersucht. Zur Verdeutlichung des Keimniveaus zu diesen Zeitpunkten sind in den Abbildungen C_t -Werte von „20“ (ohne Standardabweichung) angegeben, was in etwa dem C_t -Wert einer solch starken Verkeimung entsprechen würde. Außer *L. brevis* (BS 40; Abb. 14) und *L. plantarum* (BS 285; Abb. 15) sind die Ergebnisse wiederum dem Anhang zu entnehmen (Anh. 5-Anh. 7).

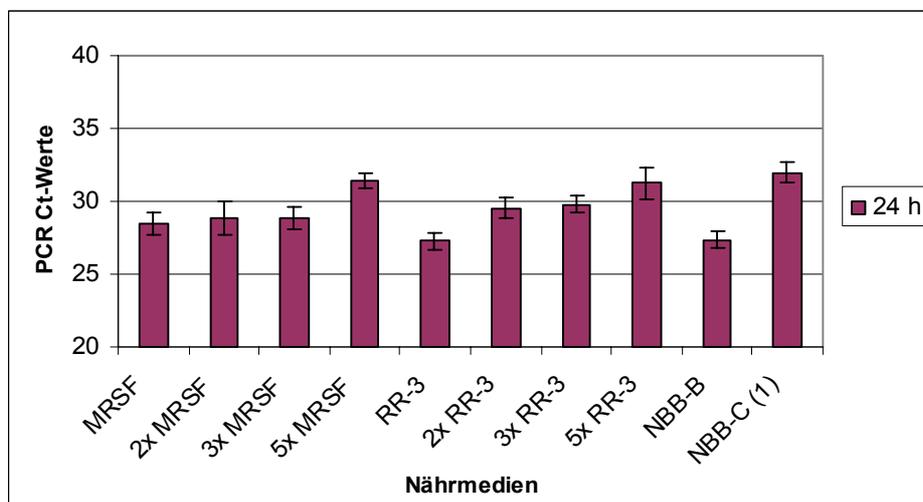


Abb. 14: Anreicherung von *L. brevis* (BS 40) in verschieden konzentrierten Flüssignährmedien mit variierendem Bieranteil; PCR C_t -Werte nach definierten Zeitpunkten

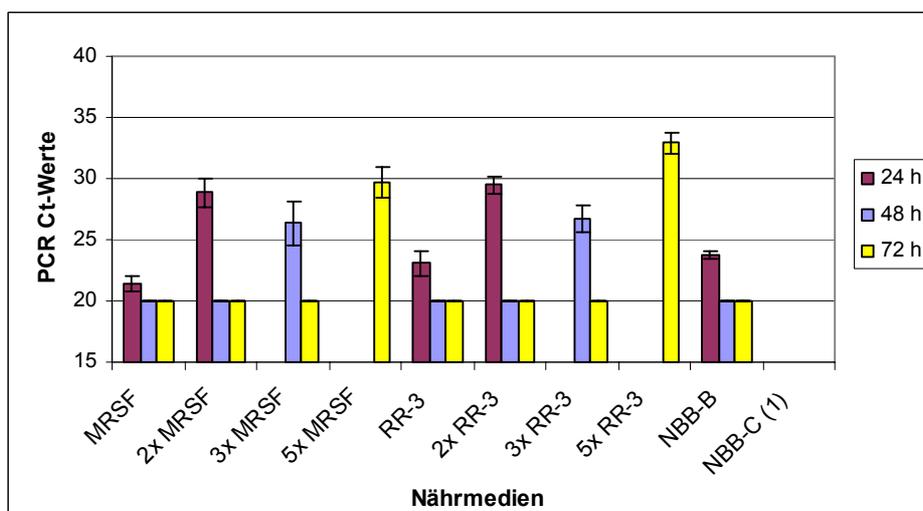


Abb. 15: Anreicherung von *L. plantarum* (BS 285) in verschieden konzentrierten Flüssignährmedien mit variierendem Bieranteil; PCR C_t -Werte nach definierten Zeitpunkten

Mit den PCR-Untersuchungen wurde ebenfalls belegt, dass mit einer Zunahme der selektiven Kriterien, d. h. mit erhöhtem Bieranteil in der Anreicherung, die Zeitdauer bis zum Nachweis verlängert wird.

Bei den obligat schädlichen Keimen war nur eine Verzögerung von ≤ 24 h zu erkennen, bis sich die C_t -Werte der einzelnen Methoden nahezu angleichen. In allen Fällen war ein PCR-Nachweis nach 48 h möglich. Bei den potentiell schädlichen Keimen war mit den unselektiven Methoden ein eindeutiger PCR-Nachweis bereits nach 24 h möglich (0 bzw. 50 % Bieranteil). Die selektiveren Methoden (66 bzw. 80 % Bieranteil) benötigten > 48 h und mit 95 % Bieranteil (NBB-C) war im Untersuchungszeitraum kein PCR-Signal zu erzielen.

Zum Erreichen einer optimalen Nachweisgeschwindigkeit wären somit auch für einen PCR-Nachweis die Medien ohne Bieranteil bzw. mit wenig Bieranteil (50 %) am besten geeignet.

Trotz guter Ergebnisse wurde für alle weiteren Versuchsreihen das Nährmedium RR-3 nicht weiter verwendet, da es als Fertignährboden nicht kommerziell erhältlich ist und somit für die Routineanwendung in Brauereien nicht in Frage kommt.

4.1.3.2 Nachweisgeschwindigkeit bei *Pectinatus/Megasphaera*

Für die gram-negativen, strikt anaeroben Keime *Pectinatus* spp. und *Megasphaera cerevisiae* wurden die Medien 2x MRSF, 2x MIB, eine Mischung aus 2x MRSF und 2x MIB im Verhältnis 1 : 1 und NBB-C (3) getestet. NBB-C kam hier in einer Variante mit weniger Bieranteil (50 %) zum Einsatz (BACK 2004), da das Wachstum von *Megasphaera cerevisiae* bei Alkoholkonzentrationen $> 3,8\%$ (g/v) beeinträchtigt wird (JESPERSEN und JAKOBSEN 1996). Da unter 4.1.2 gezeigt wurde, dass sich eine Membranfiltration negativ auf das Wachstum dieser Keime auswirkt, wurde auf eine Filtration verzichtet und mit einem Bieranteil von 50 % in der Anreicherung gearbeitet. Vor der Anreicherung wurde Bier mit den Zielkeimen beimpft (10^6 Zellen/500ml) und 25 ml des zu untersuchenden Bieres wurden ohne Filtration mit den Medien-Konzentraten versetzt. Die Verhältnisse zwischen Medium, Bier und ddH₂O können Tab. 5 entnommen werden.

Die Ergebnisse der Trübungskontrolle zeigten, dass mit 2x MIB bzw. der Mischung aus 2x MIB/2x MRSF die schnellste Kultivierung dieser Keime erzielt werden konnte. NBB-C (3) erwies sich ebenfalls als geeignet, während 2x MRSF im Vergleich zu den anderen Medien bei allen Keimen deutlich schlechtere Ergebnisse lieferte (Abb. 16:).

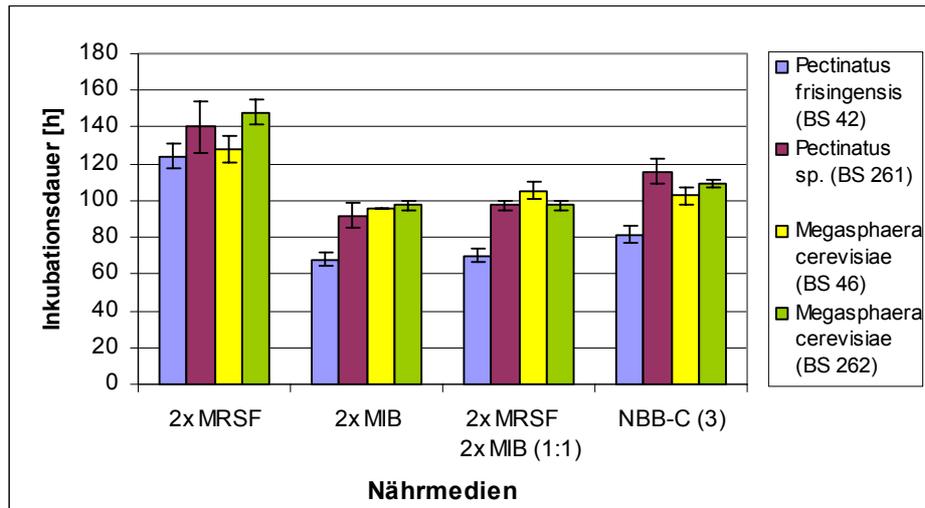


Abb. 16: Anreicherung von *Pectinatus* spp. und *Megasphaera cerevisiae* in verschiedenen Flüssignährmedien; Zeitdauer [h] bis zum Eintritt einer visuell feststellbaren Trübung

Ein Ausplattieren zu definierten Zeitpunkten erfolgte bei diesen schwer zu kultivierenden Keimen nicht, da davon ausgegangen werden konnte, dass das Wachstum auf den Platten nicht die Keimzahl in den BVF widerspiegelt hätte.

Allerdings wurden parallel zu den BVF der Trübungskontrolle noch je drei weitere BVF pro Keim beimpft und hieraus nach 72 h 500 µl Aliquots für eine PCR entnommen. Die PCR-Ergebnisse bestätigten die Beobachtungen der Trübungskontrolle (Abb. 17). 2x MIB und 2x MIB / 2x MRSF ermöglichten den schnellsten Nachweis bei *Pectinatus/Megasphaera*. NBB-C (3) erwies sich in dem überprüften Zeitrahmen bei drei der getesteten Keime als tauglich, während bei 2x MRSF innerhalb 72 h bei keinem der Organismen ein positives Signal registriert werden konnte.

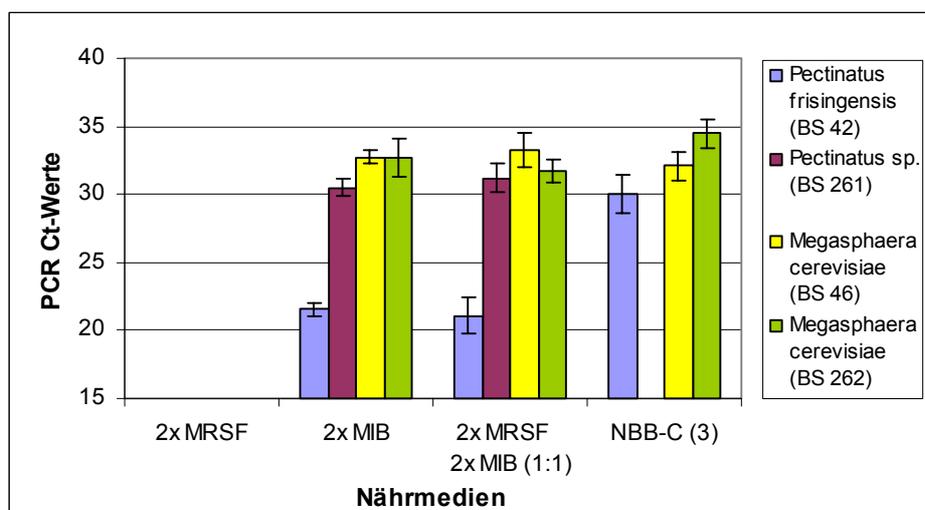


Abb. 17: Anreicherung von *Pectinatus* spp. und *Megasphaera cerevisiae* in verschiedenen Flüssignährmedien; PCR C_t -Werte nach 72 h

Aufgrund der erzielten Ergebnisse wurde für künftige Versuche standardmäßig eine 1 : 1 Mischung aus 2x MRSF und 2x MIB verwendet. Mit MRSF wurden gute Ergebnisse bei Milchsäurebakterien erzielt und MIB bzw. MRSF/MIB erwiesen sich für die strikt anaeroben Keime als effektivstes Nachweismedium. Die Forderung nach einem Universalmedium zur Detektion aller obligat und potentiell schädlichen Keime wird durch diese Medienkombination am besten verwirklicht.

4.1.3.3 Selektivität verschiedener Anreicherungsverfahren anhand von Keimgemischen

Um die erzielten Erkenntnisse bei der Nachweisgeschwindigkeit im Hinblick auf eine ausreichende Selektivität der Methode zu überprüfen, wurden im Anschluss Keimgemische mit obligat und potentiell schädlichen Organismen untersucht. Obligat schädliche Keime wachsen oftmals langsamer als potentiell schädliche Keime oder Indikatorkeime (BACK 1994). Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob durch die eintretende Konkurrenzsituation das Wachstum von einer der beiden Gruppen unter bestimmten Bedingungen gehemmt wird, bzw. welche Bedingungen evtl. beiden Keimen ein Wachstum ermöglichen. Bei den Keimgemischen wurden Milchsäurebakterien verwendet, die sich bei entsprechendem Wachstum mikroskopisch eindeutig voneinander unterscheiden ließen (Tab. 17). Außerdem stand für jeden der eingesetzten Keime ein spezifisches PCR-Assay zur Verfügung, so dass ein Wachstum auch mittels PCR dokumentiert werden konnte (Tab. 18).

Anhand der Zeitdauer bis zur Trübung der BVF ist wiederum ersichtlich, dass die Vermehrungsgeschwindigkeit stark vom Bieranteil in der Anreicherung abhängt. Zusätzlich ändert sich mit Zunahme des Bieranteils auch das Keimspektrum in den BVF (Tab. 17).

Die potentiell schädlichen Organismen wachsen schneller und in erster Linie in den unspezifischen Nährmedien mit keinem oder wenig (50 %) Bieranteil. Die langsamer wachsenden obligat schädlichen Bakterien sind hier nicht nachzuweisen, d. h. das Wachstum dieser Organismen wird unterdrückt.

Bei 2x MRS/2x MIB mit 70 % Bieranteil wachsen in allen drei Fällen beide Keime parallel, ebenso wie in einem Fall bei der Verwendung von NBB-C mit 75 % Bieranteil. Ansonsten erfolgt in den BVF mit NBB-C und 95 % Bieranteil bevorzugt das Wachstum der obligat schädlichen Organismen. Die potentiellen Bierschädlinge werden offensichtlich durch die selektiven Kriterien der Anreicherung sowie die Konkurrenzsituation durch die obligaten Bierschädlinge am Wachstum gehindert. Diese Verschiebung im Keimspektrum konnte sowohl mittels mikroskopischer Analyse als auch durch spezifische PCR 72 h nach Animpfen der BVF belegt werden (Tab. 17, Tab. 18).

Tab. 17: Anreicherung von Keimgemischen in verschiedenen konzentrierten Flüssignährmedien mit variierendem Bieranteil; Zeitdauer [h] bis zum Eintritt einer visuell feststellbaren Trübung und mikroskopischer Befund des Wachstums

Organismen-gemisch	Nährmedium	Zusammen-setzung [%]	Inkubationsdauer bis zur sichtbaren Trübung [h] / Mikroskopischer Befund			
			24-48 h	48-72 h	72-96 h	96-120 h
L. plantarum (BS 285)	2x MRSF/2x MIB/ddH ₂ O	25/25/50	+ / L. plantarum	++ / L. plantarum	++ / L. plantarum	++ / L. plantarum
	2x MRSF/2x MIB/Bier	25/25/50	- / -	++ / L. plantarum	++ / L. plantarum	++ / L. plantarum
P. damnosus (BS 242)	2x MRSF/2x MIB/Bier	15/15/70	- / -	- / -	++ / L. plantarum und P. damnosus	++ / L. plantarum und P. damnosus
	NBB-C/Bier/ddH ₂ O	5/75/20	- / -	- / -	- / -	+ / P. damnosus
	NBB-C/Bier	5/95	- / -	- / -	- / -	+ / P. damnosus
L. casei (BS 3)	2x MRSF/2x MIB/ddH ₂ O	25/25/50	+ / L. casei	++ / L. casei	++ / L. casei	++ / L. casei
	2x MRSF/2x MIB/Bier	25/25/50	- / -	- / -	+ / L. casei und P. damnosus	+ / L. casei und P. damnosus
P. damnosus (BS 242)	2x MRSF/2x MIB/Bier	15/15/70	- / -	- / -	+ / L. casei und P. damnosus	+ / L. casei und P. damnosus
	NBB-C/Bier/ddH ₂ O	5/75/20	- / -	- / -	- / -	+ / P. damnosus
	NBB-C/Bier	5/95	- / -	- / -	- / -	+ / P. damnosus
L. perolens (BS 291)	2x MRSF/2x MIB/ddH ₂ O	25/25/50	+ / L. perolens	++ / L. perolens und L. lindneri	++ / L. perolens und L. lindneri	++ / L. perolens und L. lindneri
	2x MRSF/2x MIB/Bier	25/25/50	- / -	++ / L. perolens und L. lindneri	++ / L. perolens und L. lindneri	++ / L. perolens und L. lindneri
L. lindneri (BS 38)	2x MRSF/2x MIB/Bier	15/15/70	- / -	+ / L. perolens und L. lindneri	++ / L. perolens und L. lindneri	++ / L. perolens und L. lindneri
	NBB-C/Bier/ddH ₂ O	5/75/20	- / -	+ / L. perolens und L. lindneri	++ / L. perolens und L. lindneri	++ / L. perolens und L. lindneri
	NBB-C/Bier	5/95	- / -	- / -	+ / L. lindneri	+ / L. lindneri

Zeichenerklärung:
 -: kein Befund
 + / ++: schwaches Wachstum / starkes Wachstum

Tab. 18: Anreicherung von Keimgemischen in verschiedenen konzentrierten Flüssignährmedien mit variierendem Bieranteil; PCR C_T-Werte nach 72 h

Organismen-gemisch	Nährmedium	Zusammen-setzung [%]	Anreicherung von Keimgemischen: PCR Ct-Werte nach 72 h				
			L. plantarum spezifische PCR	P. damnosus spezifische PCR	L. casei spezifische PCR	L. perolens spezifische PCR	L. lindneri spezifische PCR
L. plantarum (BS 285)	2xMRSF/2xMIB/ddH ₂ O	25/25/50	22,3	negativ	/	/	/
	2xMRSF/2xMIB/Bier	25/25/50	22,3	negativ	/	/	/
P.damnosus (BS 242)	2xMRSF/2xMIB/Bier	15/15/70	21,9	21,7	/	/	/
	NBB-C/Bier/ddH ₂ O	5/75/20	negativ	20,0	/	/	/
	NBB-C/Bier	5/95	negativ	24,8	/	/	/
L. casei (BS 3)	2xMRSF/2xMIB/ddH ₂ O	25/25/50	/	negativ	24,5	/	/
	2xMRSF/2xMIB/Bier	25/25/50	/	23,7	20,0	/	/
P.damnosus (BS 242)	2xMRSF/2xMIB/Bier	15/15/70	/	24,1	29,1	/	/
	NBB-C/Bier/ddH ₂ O	5/75/20	/	25,5	negativ	/	/
	NBB-C/Bier	5/95	/	26,1	negativ	/	/
L. perolens (BS 291)	2xMRSF/2xMIB/ddH ₂ O	25/25/50	/	/	/	20,5	29,6
	2xMRSF/2xMIB/Bier	25/25/50	/	/	/	22,3	26,1
L.lindneri (BS 38)	2xMRSF/2xMIB/Bier	15/15/70	/	/	/	25,3	24,5
	NBB-C/Bier/ddH ₂ O	5/75/20	/	/	/	25,1	26,1
	NBB-C/Bier	5/95	/	/	/	36,6	22,8

Zeichenerklärung:
 /: PCR nicht durchgeführt

Es wurde wiederum deutlich, dass zum Erreichen einer maximalen Nachweisgeschwindigkeit kein oder nur ein geringer Bieranteil von Vorteil ist. Allerdings zeigte sich auch, dass bei Keimgemischen und unselektiver Anreicherung die Gefahr von falschen Befunden steigt, da das Wachstum von langsam wachsenden Keimen unterdrückt wird und diese auch mit PCR unentdeckt bleiben.

4.1.4 Optimierte Voranreicherung für filtrierbare Proben mit nachfolgender PCR

Aus den bisherigen Erkenntnissen kann eine optimierte und praxistaugliche Anreicherungsmethode für filtrierbare Bierproben abgeleitet werden, die einen Kompromiss zwi-

schen den konkurrierenden Zielen Selektivität und Geschwindigkeit darstellt.

Dabei wurde folgende Vorgehensweise gewählt:

- Verwendung von gasdichten BVF (50 oder 180 ml), in die konzentriertes Medium vorgelegt wird (2x MRSF/2x MIB oder NBB-C). BVF ermöglichen einfaches Handling und eine anaerobe Bebrütung kann ohne Zusatzausrüstung erfolgen. Nach Möglichkeit sollten die BVF vor Gebrauch in Anaerobentöpfen gelagert werden.
- Befüllen mit dem zu untersuchenden Bier (50-75 % Bieranteil). Bei strikt anaeroben Keimen BVF randvoll befüllen. Selektivität und Wachstumsgeschwindigkeit können somit je nach Bieranteil individuell eingestellt werden. Außerdem wird ein gewisser Prozentsatz der Probe nicht durch Membranfiltration oxidativ belastet, wodurch der Nachweis strikt anaerober Keime verbessert wird.
- Filtration des Restvolumens der Probe und Überführung des Membranfilters in die zu bebrütende BVF. Durch die quantitative Zellsammlung vor der Anreicherung wird die Nachweisgeschwindigkeit fakultativ anaerober Keime im Spurenbereich verbessert (Tab. 19).
- Verwendung konzentrierter Medien, die durch die Zugabe des Bieranteils auf Einsatzkonzentration ausgemischt werden (Mischung 2x MRSF/2x MIB mit 50-70 % Bieranteil bzw. NBB-C mit 20-25 % H₂O)

Die erhöhte Nachweissicherheit strikt anaerober Keime ohne vorhergehende Membranfiltration konnte bereits oben dargestellt werden (Tab. 16).

Allerdings zeigte sich anhand der PCR C_t-Werte auch eine Verbesserung der Nachweisgeschwindigkeit bei mikroaerophilen Keimen, wenn eine Membranfiltration vor der Anreicherung durchgeführt wurde (Tab. 19). Daher wurde bei der optimierten Anreicherung die beschriebene Kombination aus Membranfiltration und unfiltriertem Probenanteil gewählt.

Tab. 19: Nachweisgeschwindigkeit verschiedener Milchsäurebakterien ohne/mit vorausgehender Filtration; PCR C_T-Werte zu definierten Zeitpunkten

Organismus	Nährmedium	Zusammensetzung [%]	PCR C _T -Werte; Inkubationszeit [h]			
			24	48	72	96
<i>L. brevis</i> (BS 40) mit Filter	2x MRSF/2x MIB/Bier	15/15/70	22,6	/	/	/
<i>L. brevis</i> (BS 40) ohne Filter	2x MRSF/2x MIB/Bier	15/15/70	27,1	/	/	/
<i>L. lindneri</i> (BS 38) mit Filter	2x MRSF/2x MIB/Bier	15/15/70	/	27,4	23,5	/
<i>L. lindneri</i> (BS 38) ohne Filter	2x MRSF/2x MIB/Bier	15/15/70	/	30,9	24,7	/
<i>P. damnosus</i> (BS 242) mit Filter	2x MRSF/2x MIB/Bier	15/15/70	/	28,2	23,3	19,6
<i>P. damnosus</i> (BS 242) ohne Filter	2x MRSF/2x MIB/Bier	15/15/70	/	33,0	27,8	24,1

Zeichenerklärung:
 /: PCR nicht durchgeführt
 mit Filter: 500 ml Bier mit 10⁸ Keimen beimpft; 35 ml mit Medium vermischt; Filtration des Rests und Überführung des Filters in BVF
 ohne Filter: 500 ml Bier mit 10⁸ Keimen beimpft; 35 ml mit Medium vermischt

Bei Verwendung der selbsthergestellten konzentrierten Medien (MRSF/MIB) mit 70% Bieranteil hätte theoretisch ein 3-fach Konzentrat der jeweiligen Medien verwendet werden müssen, um die korrekte Einsatzkonzentration zu erreichen. Allerdings ergaben sich in Vergleichstests keine Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit, wenn anstelle der 3-fach Konzentrate 2-fach konzentrierte Medien eingesetzt wurden. Aus Kostengründen wurden daher bis zu einem Bieranteil von 70% 2-fach Konzentrate verwendet.

4.1.5 Optimierte Voranreicherung für unfiltrierbare Proben mit nachfolgender PCR

Mit Ausnahme von *Pectinatus* spp. und *Megasphaera cerevisiae* (Sekundärkontaminanten im Abfüllbereich) sind bei Unfiltrat- bzw. Hefeproben die gleichen Zielorganismen wie bei den Filtratproben von Interesse. Deshalb wurde zum Nachweis ebenfalls NBB-C bzw. konzentrierte Versionen von MRSF und MIB verwendet.

Aufgrund fehlender Filtrationsmöglichkeiten können die Proben lediglich mit dem konzentrierten Nährmedium ausgemischt und anschließend inkubiert werden.

4.1.5.1 Optimierte Voranreicherung für Unfiltratproben

Durch die Nährstoffkonkurrenz zu den Hefen und durch die erhöhte Konzentration von Bitterstoffen im Unfiltrat (KNORR und KREMKOW 1972) ergeben sich zusätzliche selektive Kriterien. Der Bieranteil für diesen Probentyp wurde daher auf 50 % begrenzt. Versuche mit 80 % Bieranteil zur Erhöhung der Nachweissicherheit unter Verwendung höher konzentrierter Medien (Verhältnis 5x MRSF : Bier = 1 : 4) ergaben eine deutlich langsamere Nachweisgeschwindigkeit mittels PCR (Abb. 18). Getestet wurden hier die obligaten Bierschädlinge *P. damnosus* BS 242 und *L. lindneri* BS 38 sowie der *L. brevis* DSMZ-Typstamm (BS 110), der nur geringes Schädlichkeitspotential besitzt. Die Zellzahl beim

Animpfen betrug 10^3 Zellen/ml.

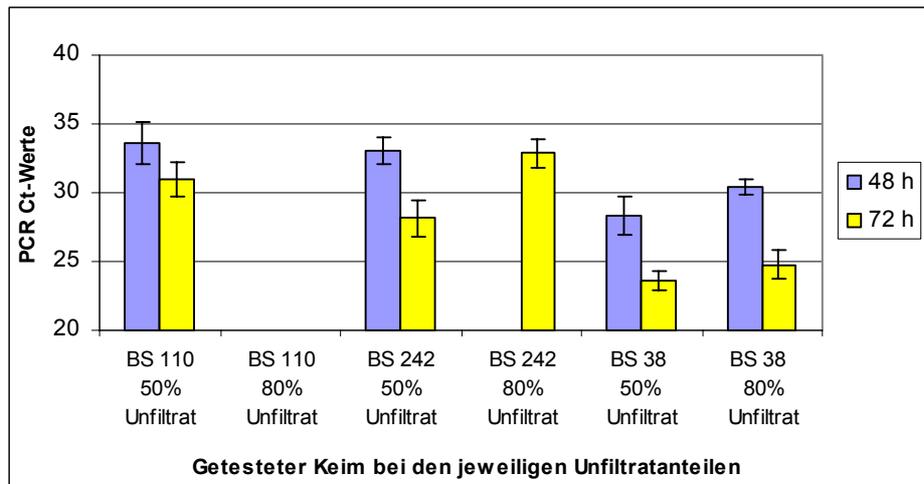


Abb. 18: Anreicherung verschiedener Milchsäurebakterien in 2x MRSF/2x MIB mit unterschiedlichem Unfiltratanteil; Überprüfen der Wachstumsgeschwindigkeit anhand der PCR C_t -Werte zu definierten Zeitpunkten

Bei der Untersuchung von Anstellhefe wurde das verwendete Medium (z. B. 2x MRSF/2x MIB) mit pasteurisiertem Bier im Verhältnis Medium : Bier = 1 : 1 ausgemischt und anschließend mit 5 % (g/g) Anstellhefe beimpft. Höhere Hefemengen führten trotz Actidionzugabe zu übermäßiger CO_2 -Bildung und Übersäumen der BVF. Des Weiteren können zu hohe Hefemengen bei der Probenaufarbeitung der Grund für eine anschließende PCR-Inhibition sein (STEWART und DOWHANICK 1996).

Bei Verwendung von NBB-C sollte bei Gär- und Lagerkellerproben entsprechend ein prozentuales Verhältnis von NBB-C : ddH₂O : Unfiltrat = 5 : 45 : 50 und bei Anstellhefe ein Verhältnis NBB-C : ddH₂O : Bier = 5 : 45 : 50 eingehalten werden.

Alternativ kann für Anstellhefe auch NBB-B in der beschriebenen Form eingesetzt werden (BACK 1994).

4.2 Verbesserte Methoden zur kulturellen Voranreicherung von Fremdhefen für nachfolgende PCR

Analog zu den bierschädlichen Bakterien kann es auch bei Fremdhefen zu Spurenkontaminationen, d. h. Kontaminationen unterhalb der PCR-Nachweisgrenze kommen. Durch effektive Gestaltung einer kulturellen Voranreicherung sollte der nachfolgende PCR-Nachweis optimiert werden.

4.2.1 Ausgangssituation

Die Einteilung der brauereirelevanten Fremdhefen erfolgt traditionell in *Saccharomyces*- und Nicht-*Saccharomyces*-Fremdhefen (BACK 1994). Die *Saccharomyces*-Fremdhefen

(S-FH) werden als gefährlicher eingestuft, da sie gärkräftiger sind als Nicht-*Saccharomyces*-Fremdhefen (NS-FH) und teilweise Übervergärung, z. B. durch *S. diastolicus*, bewirken können (JESPERSEN und JAKOBSEN 1996). Die *Saccharomyces*-Hefen werden weiter unterteilt in die *Saccharomyces sensu stricto*- bzw. die *Saccharomyces sensu lato*-Gruppe, wobei die industriell genutzten Kulturhefen ausschließlich in der zuerst genannten Gruppe angesiedelt sind (BOULTON und QUAIN 2001). S-FH finden sich jedoch in beiden Gruppen (BACK 1994).

Der Nachweis und die Identifikation von Fremdhefen mit den zur Verfügung stehenden kulturellen Methoden bereitet jedoch noch immer Schwierigkeiten.

- Bei den klassischen kulturellen Identifizierungsmethoden ergeben sich oftmals Unterscheidungsschwierigkeiten durch die physiologische und biochemische Ähnlichkeit der S-FH zu den Kulturhefen (VAN DER AA KÜHLE und JESPERSEN 1998).
- Die verwendeten Methoden müssen hochsensitiv und selektiv sein, da z. B. im Unfiltratbereich die Anzahl der Kontaminationskeime von der Kulturhefe bei weitem übertroffen wird (VAN DER AA KÜHLE und JESPERSEN 1998).
- Zusammen mit den NS-FH bilden die S-FH eine sehr heterogene Gruppe, die den Einsatz mehrerer Selektivmedien notwendig macht (BACK 1994, PRIEST und CAMPBELL 1996). Daher existiert eine Vielzahl von Fremdhefe-Nachweismedien, wobei die Effektivität der zur Verfügung stehenden Nährböden unterschiedlich bewertet wird (JESPERSEN und JAKOBSEN 1996).
- Die NS-FH bilden eine umfangreiche und heterogene Gruppe mit - zumindest für Bier - teilweise geringem oder unbekanntem Schädigungspotential (EIDTMANN et al. 1998)

Aufgrund mangelhafter Identifizierungsmethoden ist davon auszugehen, dass Differenzierungen zwischen harmlosen und gefährlichen Fremdhefen oder eine Unterscheidung mit den in der Praxis angewandten Methoden nicht erfolgt oder nicht möglich ist.

Trotz dieser bekannten Schwierigkeiten war auch hier beabsichtigt, die Anzahl der notwendigen Voranreicherungsmedien möglichst gering zu halten, und nach Möglichkeit auf ein universelles Medium zu begrenzen.

4.2.2 Voranreicherung mit MYPG bzw. MYPG+CuSO₄

Basierend auf nur einem Grundmedium (MYPG) sollten mittels einer optimierten CuSO₄-Konzentration sowohl S-FH als auch NS-FH mittels PCR nachweisbar sein (2.6.1).

Bei Kulturhefen (unter- und obergärig) nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit zwischen 0-250 ppm CuSO₄ mit steigender Cu-Konzentration ab. Ab 250 ppm CuSO₄ war kein Wachstum von Brauhefen mehr nachzuweisen. Hierzu wurden jeweils 5 ml MYPG auf die jeweiligen CuSO₄-Konzentrationen eingestellt, mit 10³ Hefezellen/ml angeimpft und aerob

bei 28 °C bebrütet (n = 3). Die Wachstumskontrolle erfolgte täglich anhand der visuellen Trübung der Anreicherungen und durch Ausplattieren von 20 µl Aliquots auf MYPG-Platten, die nach 5-tägiger Inkubation ausgezählt wurden (Tab. 20).

Tab. 20: Sichtbare Trübung der Anreicherung und CFU in 20 µl Aliquots (MYPG + 0, 100, 200 und 250 ppm CuSO₄) zu definierten Zeitpunkten (0, 24, 48, 72 h)

Hefestamm / CuSO ₄ [ppm]	0 h		24 h		48 h		72 h	
	Trübung	CFU	Trübung	CFU	Trübung	CFU	Trübung	CFU
UG 34/70 / 0	--	50 ± 4	+	n. z.	++	n. z.	++	n. z.
UG 34/70 / 100	--	34 ± 5	+	n. z.	+	n. z.	++	n. z.
UG 34/70 / 200	--	7 ± 4	--	5 ± 2	--	102 ± 23	+	n. z.
UG 34/70 / 250	--	0	--	1	--	0	--	0
UG 66 / 0	--	44 ± 4	+	n. z.	++	n. z.	++	n. z.
UG 66 / 100	--	29 ± 2	+	n. z.	++	n. z.	++	n. z.
UG 66 / 200	--	1 ± 1	--	0	--	33 ± 8	+	n. z.
UG 66 / 250	--	0	--	0	--	0	--	0
OG 68 / 0	--	65 ± 8	+	n. z.	++	n. z.	++	n. z.
OG 68 / 100	--	43 ± 7	+	n. z.	+	n. z.	++	n. z.
OG 68 / 200	--	0	--	0	--	0	--	0
OG 68 / 250	--	0	--	0	--	0	--	0
OG 148 / 0	--	34 ± 4	+	n. z.	++	n. z.	++	n. z.
OG 148 / 100	--	32 ± 5	+	n. z.	++	n. z.	++	n. z.
OG 148 / 200	--	0	--	0	--	0	--	0
OG 148 / 250	--	0	--	0	--	0	--	0

Zeichenerklärung:

--: keine Trübung; +: schwache Trübung; ++: starke Trübung

Kolonien n. z.: nicht zählbar (> 500 / Platte)

Bei den NS-FH hatten dagegen selbst CuSO₄-Konzentrationen über 200 ppm keinen negativen Einfluß auf das Wachstum (Tab. 21). Im Gegensatz zu den Kulturhefen zeigten außerdem die getesteten *S. diastaticus* und *S. exiguus*-Stämme Wachstum bei 200 und 300 ppm CuSO₄.

Tab. 21: Sichtbare Trübung der Anreicherung und CFU in 20 µl Aliquots (MYPG + 200/300 ppm CuSO₄)

Hefestamm	MYPG + 200 ppm CuSO ₄				MYPG + 300 ppm CuSO ₄			
	Trübung/CFU				Trübung/CFU			
	0 h	24 h	48 h	72 h	0 h	24 h	48 h	72 h
<i>Pichia anomala</i> (1)	--/22 ± 3	+ n. z.	++/n. z.	++/n. z.	--/15 ± 2	+/n. z.	+/n. z.	++/n. z.
<i>Kloeckera apiculata</i>	--/54 ± 5	+/n. z.	++/n. z.	++/n. z.	--/41 ± 5	+/n. z.	+/n. z.	++/n. z.
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	--/70 ± 6	+/n. z.	++/n. z.	++/n. z.	--/45 ± 3	+/n. z.	++/n. z.	++/n. z.
<i>Candida tropicalis</i> (1)	--/30 ± 5	++/n. z.	++/n. z.	++/n. z.	--/23 ± 4	++/n. z.	++/n. z.	++/n. z.
<i>Pichia membranefaciens</i> (1)	--/34 ± 4	+/n. z.	+/n. z.	++/n. z.	--/36 ± 4	+/n. z.	+/n. z.	++/n. z.
<i>Candida sake</i>	--/58 ± 9	+/n. z.	++/n. z.	++/n. z.	--/35 ± 7	+/n. z.	++/n. z.	++/n. z.
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	--/20 ± 4	++/n. z.	++/n. z.	++/n. z.	--/30 ± 6	++/n. z.	++/n. z.	++/n. z.
<i>Rhodotorula rubra</i>	--/23 ± 6	+/n. z.	++/n. z.	++/n. z.	--/13 ± 4	+/n. z.	+/n. z.	++/n. z.
<i>S. diastaticus</i> (1)	--/14 ± 4	+/n. z.	++/n. z.	++/n. z.	--/14 ± 3	+/n. z.	++/n. z.	++/n. z.
<i>S. exiguus</i>	--/21 ± 3	+/n. z.	++/n. z.	++/n. z.	--/15 ± 3	+/n. z.	++/n. z.	++/n. z.

Zeichenerklärung:

--: keine Trübung; +: schwache Trübung; ++: starke Trübung

Kolonien n. z.: nicht zählbar (> 500 / Platte)

Diese Tatsache wurde genutzt, um die selektive Anreicherung von NS-FH bzw. S-FH in Unfiltratproben zu ermöglichen, da die Vermehrung der im Überschuss vorhandenen Brauhefe durch die Zugabe des CuSO_4 gehemmt wird. Auf diese Weise sollte eine verlässliche PCR-Identifizierung von Fremdhefen trotz Anwesenheit von non-target-DNA (Brauhefe) realisiert werden.

Die Auswirkungen unterschiedlicher CuSO_4 -Konzentrationen auf einen nachfolgenden PCR-Nachweis sind in Abb. 19 dargestellt. 5 ml Unfiltrat (WHB 34/70) wurden mit 10^2 Zellen/ml *S. diastaticus* beimpft und die Anreicherung erfolgte anschließend mit MYPG, MYPG + 125 ppm CuSO_4 bzw. MYPG + 250 ppm CuSO_4 (n = 2). Für die PCR-Versuche wurde das Sdi-Assay verwendet (3.2).

Bei 0 ppm CuSO_4 ist mittels PCR selbst nach 72 h Anreicherung kein *S. diastaticus*-Nachweis möglich. Im Gegensatz dazu zeigt sich sowohl bei 125 ppm als auch bei 250 ppm CuSO_4 schon nach 24 h ein eindeutiges *S. diastaticus* PCR-Signal, das sich nach 48 bzw. 72 h noch verstärkt. Bei den jeweiligen Zeitpunkten sind die C_t -Werte bei 250 ppm jeweils stärker ausgeprägt als bei 125 ppm. Da bei 0 ppm kein PCR-Nachweis erzielt wurde, zeigt sich hier, dass erst durch die CuSO_4 -bedingte Hemmung der Brauhefe ein Wachstum der Fremdhefe möglich wird. Anhand der PCR-Tests war weiterhin abzulesen, dass dieses Wachstum umso stärker ist, je höher die CuSO_4 -Konzentration ist (Abb. 19).

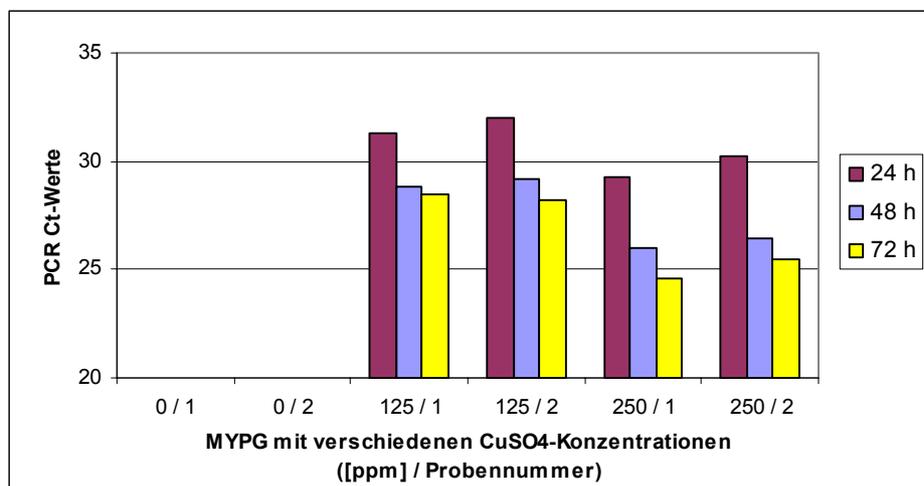


Abb. 19: PCR-Nachweis von *S. diastaticus* in Unfiltrat (WHB 34/70); MYPG + 0 ppm / 125 ppm / 250 ppm CuSO_4 ; PCR C_t -Werte zu definierten Zeitpunkten

Für *S. diastaticus* wurde parallel zu obiger Testreihe noch EV-Bier als selektives Nachweismedium eingesetzt. Das EV-Bier wurde nicht mit kontaminiertem Unfiltrat sondern direkt mit *S. diastaticus* angeimpft. Allerdings erfolgte in EV-Bier ein deutlich langsames Wachstum als in MYPG+ CuSO_4 , da nach 24 h noch kein PCR-Signal zu detektieren war (Abb. 20).

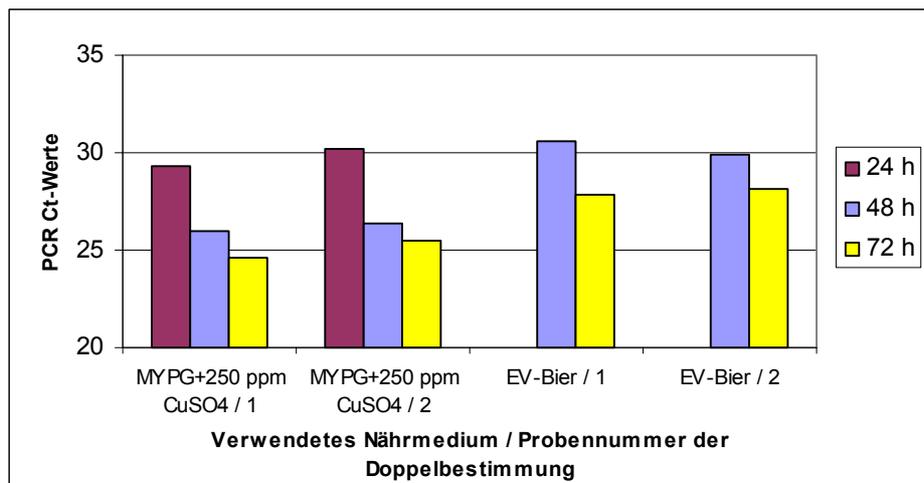


Abb. 20: PCR-Nachweis von *S. diastaticus* in Unfiltrat (WHB 34/70 mit MYPG + 250 ppm CuSO₄) und PCR-Nachweis von *S. diastaticus* in EV-Bier

Für alle anderen Fremdhefen, für die im Laufe der Arbeit PCR-Assays entwickelt wurden, konnten mit der oben erwähnten Methode (MYPG + 250 ppm CuSO₄) Voranreicherungszeiten von 24-48 h erzielt werden (ZIMMER 2004).

Durch zusätzliche Variation der Bebrütungstemperatur (28 °C/37 °C) lässt sich nochmals eine weitere Unterscheidung zwischen ober- und untergärrigen Hefen treffen. Untergärrige Hefen weisen bei 37 °C keine Vermehrung mehr auf, während obergärrige Hefen bei beiden Temperaturen Wachstum zeigen (JESPERSEN et al. 2000).

Auf Basis von MYPG bzw. MYPG+CuSO₄ und unterschiedlichen Bebrütungstemperaturen lässt sich folgendes Probenbearbeitungsschema zur Fremdhefeuntersuchung für untergärrige und obergärrige Brauweise ableiten (Abb. 21).

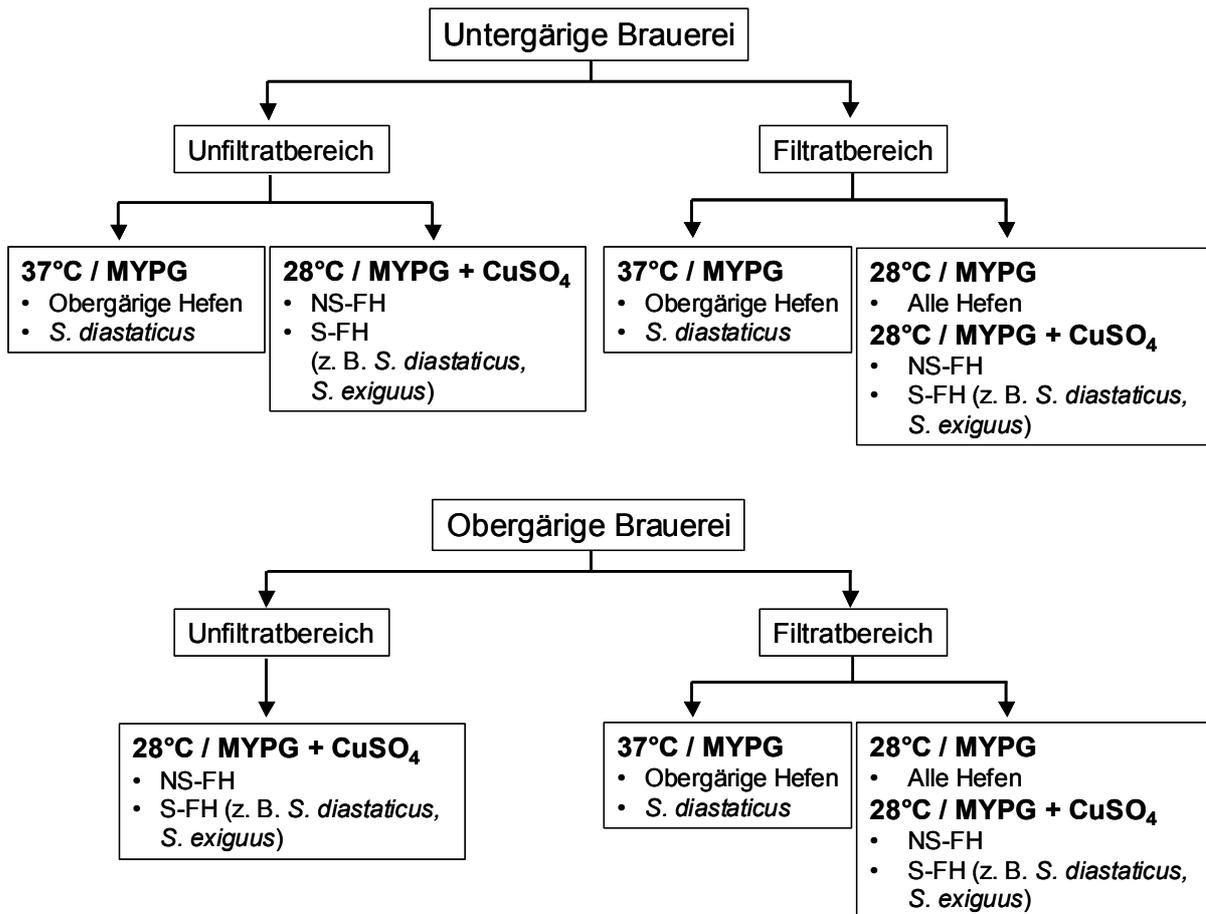


Abb. 21: Probenbearbeitungsschema zur Fremdhefeuntersuchung für untergärige und obergärige Brauweise

4.3 Optimierte DNA-Isolation und Beseitigung von PCR-Inhibitoren

Die DNA-Isolation aus den nachzuweisenden Zielorganismen ist eine der Grundvoraussetzungen für eine erfolgreiche PCR. Hierzu müssen die Zielkeime abhängig von der Probenart durch geeignete Maßnahmen (Zentrifugation, Filtration) aufkonzentriert werden und anschließend aufgeschlossen werden, so dass die DNA frei zugänglich wird. Erst jetzt kann eine PCR erfolgen, da die Reaktionskomponenten bei intakten Zellen nicht an die Zell-DNA gelangen können.

Die Zellyse kann u. a. durch physikalische Methoden (Hitze, mechanische Einwirkung) oder durch chemische Verfahren (z. B. Lysozym) erfolgen. Eine für den Braueibereich routinetaugliche DNA-Isolationsmethode sollte folgende Anforderungen erfüllen (WILSON 1997, GIRAFFA et al. 2000):

- Möglichst vollständige Lyse aller in der Probe enthaltenen Zielkeime
- Geringe DNA-Verluste während der Probenverarbeitung, d. h. möglichst wenig Pipettierschritte
- Möglichst reine DNA frei von PCR-inhibierenden Stoffen

- Vermeidung gesundheitsgefährdender Stoffe
- Einfaches und schnelles Handling
- Geringe Kosten

Hierbei ergeben sich konkurrierende Ziele, die vor allem die Aufreinigung der DNA betreffen. Eine Aufreinigung bzw. Entfernung PCR inhibierender Substanzen führt oft zu DNA-Verlusten und bedingt den Einsatz gesundheitsgefährdender Chemikalien (z. B. Phenol-Chloroform). Außerdem steigt durch die zusätzlichen Arbeitsschritte die Analysendauer (HAIKARA et al. 2003). Bei der Verwendung von *Taq*-Polymerase kann es aber ausreichen, ungereinigte bzw. schwach gereinigte DNA zu verwenden und somit den benötigten Zeitbedarf zu minimieren (VAN DER VOSSSEN 1996). Da PCR-inhibierende Stoffe aus der Probenmatrix (z. B. Blut, Gewebe, Kulturmedium), den Zielorganismen oder den bei der Probenaufarbeitung verwendeten Chemikalien stammen können (z. B. SDS, Triton X-100), hängt eine Verwendung ungereinigter bzw. schwach gereinigter DNA stark vom untersuchten Probenotyp ab (ROSSEN et al. 1992). Potentielle PCR inhibierende Substanzen beim Probenotyp Bier wären z. B. Proteine, Proteinasen, Polyphenole oder hohe Anteile von non-target DNA wie etwa Hefe (WILSON 1997, STEWARD und DOWHANICK 1996, RIJPENS und HERMAN 2002).

Für die unterschiedlichen Probenarten, die im Brauereibereich anfallen können, sollten möglichst schnelle und einfache DNA-Isolationsprotokolle entwickelt werden, die sich aber dennoch durch eine zufriedenstellende Sensitivität und eine hohe Robustheit gegenüber Inhibition auszeichnen.

4.3.1 Probenverarbeitung und DNA Isolation aus filtrierbaren bakterienhaltigen Proben

4.3.1.1 Ausgangssituation

Im Filtrat- bzw. Abfüllbereich besteht der größte Bedarf nach schnellen Ergebnissen, da das Produkt anschließend in den Handel gelangt und somit nicht mehr betriebsinternen Kontrollmöglichkeiten unterliegt.

Durch die Möglichkeit einer Filtration bestehen gute Voraussetzungen zur Aufkonzentration von Zellen. Allerdings ist die Keimzahl hier in der Regel so gering, dass zum Erreichen einer ausreichenden Nachweissicherheit folgende Punkte beachtet werden sollten:

- Untersuchung möglichst großer Probenvolumina
- Quantitative Aufkonzentrierung der Zellen durch Filtration

Nach der Filtration kann die PCR sofort erfolgen, d. h. der Filter mit den darauf befindlichen Zellen wird weiter bearbeitet (2.7.2.1). Alternativ kann zur Erhöhung der Nachweis-

sicherheit vor der DNA-Isolation eine Voranreicherung stattfinden (4.1.4).

4.3.1.2 Filteraufschluss mit PCMF – Optimierung der Methode

Da die Methode bereits als Bestandteil eines kommerziellen PCR-Kits vorlag, wurden sowohl am Lehrstuhl als auch bei den Brauereien Versuche zur Evaluierung der Methode unternommen. Von Anwenderseite wurden anfänglich folgende Vor- bzw. Nachteile der Methode festgestellt:

Vorteile

- Gute Filtrationsgeschwindigkeit (ca. 30 sec/100 ml)
- Hohes Probenvolumen möglich (500-1000 ml)

Nachteile:

- Chloroform (Abzug/Sondermüll)
- PCR-Inhibition

Das Hauptproblem lag in der PCR-Inhibition, da sowohl im Labormaßstab als auch bei den Brauereien vor allem bei Anwendung von Standard PCR in vielen Fällen sowohl von der Probe als auch von der IAC/EAC ein negatives Resultat erzielt wurde. Die Ergebnisse waren somit nicht auswertbar.

4.3.1.2.1 Beseitigung PCR-inhibierender Stoffe durch Waschschrirte

In den Brauerei-Tests wurde versucht, durch zusätzliche Filter-Waschschrirte mögliche PCR-Inhibitoren zu beseitigen. Da sich neben Zellen auch noch andere im Bier oder im Nährmedium befindliche Mikropartikel auf dem Filter anreichern, wurde der Membranfilter wie bei JUVONEN et al. (1999) und YASUI et al. (1997) beschrieben mit ddH₂O, NaOH und SDS behandelt. Die Verunreinigungen sollten somit entfernt werden.

Da jedoch auch nach diesen Änderungen der Großteil der Isolate inhibiert war, wurden die verwendeten Einzelkomponenten, die bei der DNA-Isolierung Anwendung fanden, untersucht.

Hierzu wurden die PCMF mit den während der Probenaufarbeitung verwendeten Substanzen (MRSF, Bier, NaOH, SDS, ddH₂O) gespült (n = 2). Die jeweiligen Filter wurden anschließend ohne nachträgliches Abwaschen der Komponenten für die DNA-Isolation verwendet und mit Standard PCR hinsichtlich PCR-Inhibition überprüft (Abb. 22). Von den DNA-Isolaten wurden je 3 µl/PCR eingesetzt. Als DNA wurde der PCR-Reaktion *L. brevis* Rein-DNA zugesetzt (1 ng/Reaktion).

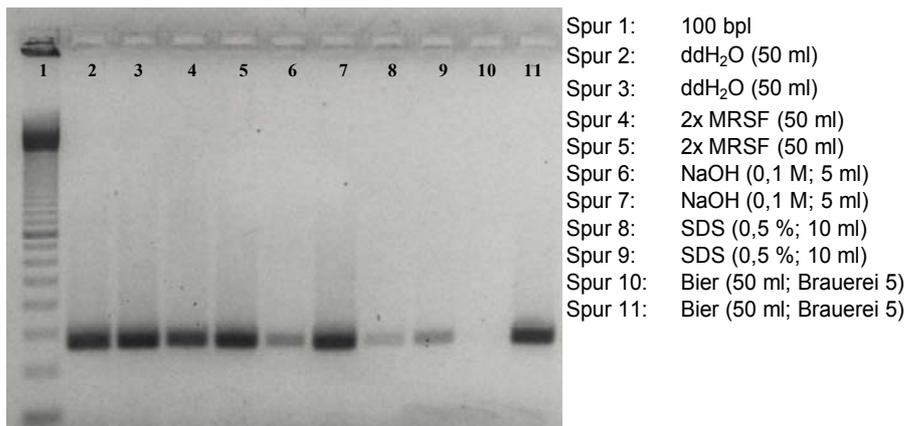


Abb. 22: Inhibierte DNA-Isolate nach PCMF-Auflösung; Spülen der PCMF mit verschiedenen Flüssigkeiten/Chemikalien; Kontroll-DNA in jeder PCR-Reaktion: *L. brevis*-DNA (1 ng/Reaktion)

Während MRSF und ddH₂O keine PCR-Inhibition verursachten, zeigte sich, dass neben dem Bier auch die Waschsubstanzen (NaOH, SDS) negative Auswirkungen auf die PCR haben können (Abb. 22). Auf den weiteren Einsatz dieser Waschschriffe wurde daher verzichtet.

Während der Brauerei-Tests konnte eine leichte Verbesserung durch eine Änderung der Waschschriffe erzielt werden. Anstatt mit NaOH/SDS wurden die Filter mit 50 ml Tween 20 (2 %) gespült (7.2.1), da Tween 20 als PCR-Enhancer gilt (ROSSEN et al. 1992). Allerdings waren auch mit dieser Methode noch einige der Isolate inhibiert.

4.3.1.2.2 Inaktivierung von PCR-Inhibitoren durch BSA-Zugabe

Bei den Brauereiversuchen fiel auf, dass in erster Linie bei Standard PCR Inhibitionen auftraten, während sich LightCycler Real-Time PCR als sehr robust gegen Inhibition erwies.

Ein Hauptunterschied bei diesen beiden Arten der PCR lag in der Verwendung verschiedener Polymerasen. Die in den Brauereien eingesetzten Polymerase-Mixe für Real-Time PCR sind oftmals mit vom Hersteller nicht näher definierten PCR-Enhancern versehen, während für die Standard PCR *Taq*-Polymerase ohne weitere Zusätze verwendet wurde. Typische PCR-Enhancer, die auch schon erfolgreich im Food-safety Bereich anhand von Milch, Trinkwasser und Fleisch getestet wurden, sind z. B. BSA, PVP, PEG oder DMSO (WILSON 1997, RUDI et al. 2004).

Da der LightCycler Polymerase-Mix BSA enthält, um ein Anlagern der Reaktionskomponenten an die Glaswand der PCR-Kapillaren zu verhindern, wurde getestet, ob die Verwendung von PCR-Beads, die BSA enthalten auch bei Standard PCR zu verbesserten Ergebnissen führen. Die verwendeten PCR-Beads beruhten auf der gleichen *Taq*-Polymerase (Amersham Biosciences), die ansonsten bei Standard PCR zu inhibierten

Reaktionen führte. 200 ml Bier wurden mit jeweils 10^6 Zellen/ml von *L. brevis* (BS 40) und *P. damnosus* (BS 41) beimpft und anschließend mittels PCMF-Filteraufschluss bearbeitet. Bei Verwendung der PCR-Beads war keine Inhibition mehr festzustellen (Abb. 23).

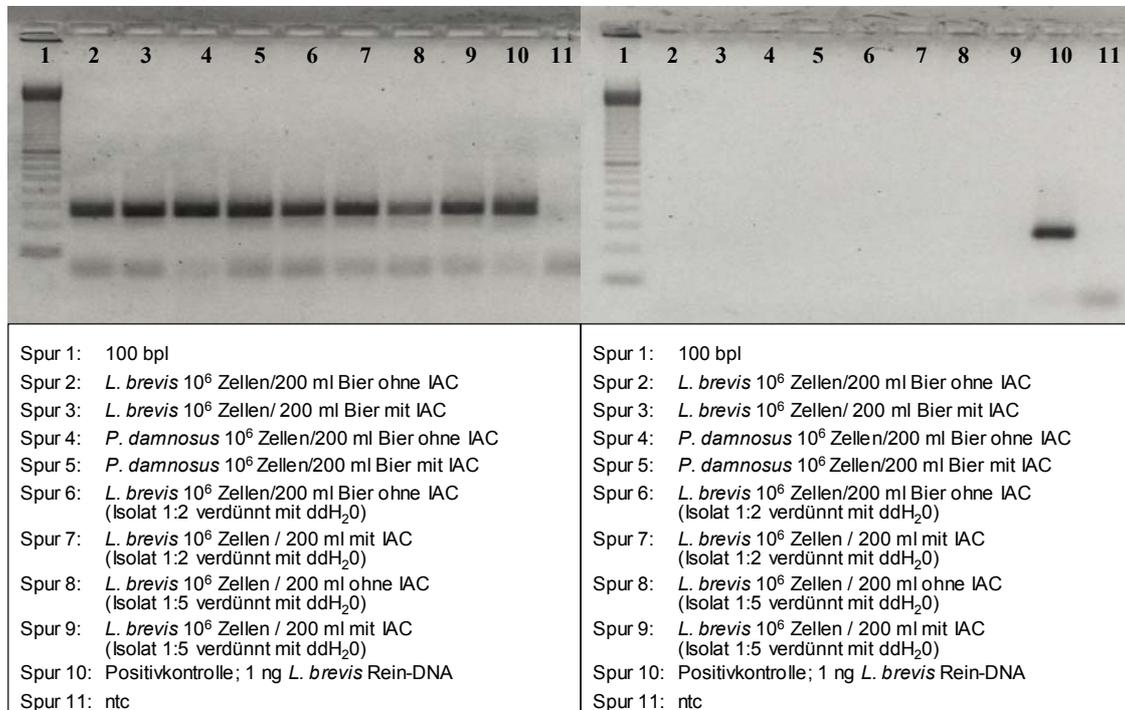


Abb. 23: PCR-Ergebnisse von DNA-Isolaten nach PCMF-Filteraufschluss unter Verwendung von PCR-Beads (linkes Bild) bzw. mit herkömmlicher *Taq*-Polymerase (rechtes Bild); PCR-Assay sLP200

Die mit den PCR-Beads erzielten positiven Ergebnisse konnten bei der Verwendung von herkömmlicher *Taq*-Polymerase bestätigt werden, sofern dem PCR-Mix BSA (100 μ g/ml) hinzugefügt wurde (Abb. 24).

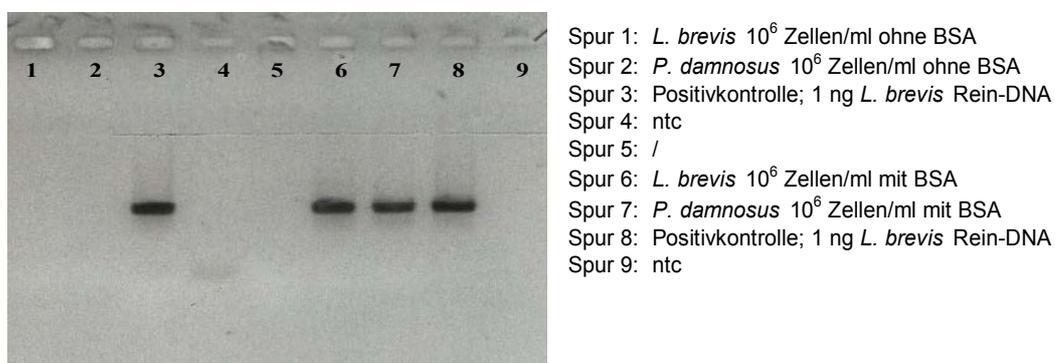


Abb. 24: PCR-Ergebnisse von DNA-Isolaten nach PCMF-Filteraufschluss unter Verwendung von herkömmlicher *Taq*-Polymerase ohne BSA (Spur 1-4) bzw. mit BSA (Spur 6-9); PCR-Assay sLP200

Die positiven Auswirkungen einer BSA-Zugabe wurden auch mittels Real-Time PCR bestätigt. Sowohl bei Verwendung eines Mixes mit konventioneller Polymerase, als auch bei speziellen Real-Time PCR Master-Mix Polymerasen war die Inhibition nach BSA-Zugabe beseitigt (Tab. 22).

Tab. 22: Auswirkungen einer BSA-Zugabe auf inhibierte DNA-Isolate bei Verwendung verschiedener Polymerasen (Standard und Real-Time PCR); DNA-Isolate aus PCMF-Filteraufschluss

PCR-Format	Polymerase	PCR-Ergebnisse ohne BSA-Zugabe		PCR-Ergebnisse mit BSA-Zugabe (100 µg/ml)	
		Inhibition	keine Inhibition	Inhibition	keine Inhibition
Standard PCR	PCR-Beads, Amersham Pharmacia	neg	+	neg	+
	Taq-Polymerase, Amersham Pharmacia	+	neg	neg	+
	Taq-Polymerase HotStar, Qiagen	+	neg	neg	+
	Taq-Polymerase HotMasterMix, Eppendorf	+	neg	neg	+
Real-Time PCR	Taq-Polymerase HotStar, Qiagen	+	neg	neg	+
	Hybridisation Probes Master-Mix, Roche (Light Cycler)	neg	+	neg	+
	AmpliTaq Gold Master-Mix, Applied Biosystems (ABI Prism 7000, iCycler)	+	neg	neg	+
	Quantitect Master-Mix, Qiagen (ABI Prism 7000, iCycler)	neg	+	neg	+
	iCycler Supermix, Bio-Rad (ABI Prism 7000, iCycler)	+	neg	neg	+
	Master-Mix, Eurogentec (ABI Prism 7000, iCycler)	+	neg	neg	+

4.3.1.3 Filteraufschluss mit PCMF – Sensitivität der optimierten Methode

Um die Sensitivität der optimierten Methode zu testen, wurden in zwei Testreihen 200 ml Bierproben mit *L. brevis* bzw. *P. damnosus* beimpft (10^6 - 10^1 Zellen/Probe; jede Stufe in Dreifachbestimmung). Die Proben wurden wie unter 2.7.2.1 beschrieben ohne zusätzliche Filter-Waschschritte behandelt. Im Anschluss erfolgte eine Real-Time PCR der DNA-Isolate mit einem in dieser Arbeit entwickelten Screening-Assay (sLP600). Bei beiden Systemen konnte mit der beschriebenen DNA-Isolationsmethode und BSA-Zugabe in den Reaktionsmix Nachweisgrenzen von 10^3 - 10^2 Zellen/filtrierter Probe erreicht werden (Tab. 23). Zur Kontrolle wurden im selben PCR-Lauf parallel einige der DNA-Isolate ohne BSA-Zugabe untersucht, wobei wiederum alle Proben inhibiert waren.

Der große Vorteil der Filtermethode liegt darin, dass durch die quantitative Zellsammlung die Sensitivität bzw. die Signalstärke unabhängig vom Probenvolumen ist, d. h. bei 1000 Zellen/ml und bei 1000 Zellen/100 ml würden die gleichen C_T -Werte erzielt werden.

Tab. 23: Sensitivität des PCMF-Filteraufschlusses; PCR C_t-Werte: Mittelwert und Standardabweichung (n = 3)

Organismus	Zellzahl (Zellen/200 ml Bier)	PCR C _t -Werte
<i>L. brevis</i> (BS 40)	7*10 ⁶	22,3 ± 0,5
	7*10 ⁵	25,9 ± 0,5
	7*10 ⁴	29,1 ± 0,6
	7*10 ³	34,1 ± 0,7
	7*10 ²	2 Proben: neg 1 Probe: 34,4
	7*10 ¹	Neg
<i>P. damnosus</i> (BS 41)	3*10 ⁶	23,1 ± 0,2
	3*10 ⁵	26,9 ± 0,3
	3*10 ⁴	30,3 ± 0,3
	3*10 ³	35,9 ± 1,2
	3*10 ²	neg
	3*10 ¹	neg

4.3.1.4 DNA-Isolation mit CellTrap-Filtern – Optimierung der Methode

Neben dem PCMF-Filteraufschluss wurden für filtrierbare Proben die CellTrap-Filter getestet. Die Vorteile dieser Methode liegen vor allem im schnellen und einfachen Probenhandling und in der Arbeitssicherheit, da hier kein Chloroform eingesetzt wird.

Um eine möglichst effektives Proben-Handling zu gewährleisten, wurden zunächst folgende Punkte geklärt:

- Waschschrift nach der Filtration: ja/nein?
- Welcher Puffer soll zur Elution verwendet werden und mit welcher DNA-Isolationmethode wird anschließend weitergearbeitet?

Ein Waschschrift mit 50 ml ddH₂O sollte zur Beseitigung von störenden Bierresten aus dem Filtergehäuse dienen. Als mögliche Puffer wurden Lyse Puffer F mit anschließendem Kochaufschluss-B (2.7.3.2) bzw. der 1-fach PCR-Puffer in Verbindung mit dem Kugelaufschluss-B (2.7.3.1) getestet. Die Elution erfolgte gemäß der vorliegenden Gebrauchsanweisung für die CellTrap-Filter mit jeweils 250 µl Puffer.

Für die Versuche wurden 200 ml Bierproben mit *L. casei*, *L. lindneri* und *P. damnosus* (10⁶ Keime/Probe) beimpft und anschließend mit dem PCR-System sLP600 untersucht (Tab. 24).

Tab. 24: DNA-Isolation mittels CellTrap-Filter; Auswirkung eines Waschschruttes auf die PCR-Ergebnisse; (n = 2)

Verwendeter Puffer	Waschschritt (50 ml ddH ₂ O)	PCR C _t -Werte		
		<i>L. casei</i>	<i>L. lindneri</i>	<i>P. damnosus</i>
1x PCR-Puffer	ja	29,0 / 30,5	31,6 / 32,0	30,0 / 29,3
	nein	30,7 / 30,4	37,3 / neg	34,2 / 33,5
Lyse Puffer F	ja	33,2 / 32,7	36,9 / 34,7	32,0 / 33,8
	nein	33,3 / 33,0	neg / neg	neg / 34,3

Aus den Ergebnissen wurde deutlich, dass sich ein Waschschritt positiv auf die Sensitivität der PCR auswirkt. Außerdem ergaben sich mit der Kombination Kugelaufschluss-B/1x PCR Puffer bessere Ergebnisse als mit Kochaufschluss-B/Lyse Puffer F.

4.3.1.5 DNA-Isolation mit CellTrap-Filtern – Sensitivität der optimierten Methode

Die erreichbare Nachweisgrenze für das optimierte CellTrap-Protokoll wurde anschließend mit der erreichbaren Sensitivität des PCMF-Filteraufschlusses verglichen. Hierzu wurden jeweils 200 ml Bier mit 10⁴ und 10³ Zellen *L. brevis* (BS 40) und *P. damnosus* (BS 41) beimpft und nach der DNA-Isolation mit dem sLP600-Assay untersucht (Tab. 25).

Tab. 25: Erreichbare PCR-Nachweisgrenze mit Hilfe der CellTrap-Filter im Vergleich zum PCMF-Filteraufschluss; PCR C_t-Werte: Mittelwert und Standardabweichung (n = 3)

Organismus	Zellzahl (Zellen/200 ml Bier)	PCMF-Filteraufschluss PCR C _t -Werte	CellTrap-Filter PCR C _t -Werte
<i>L. brevis</i> (BS 40)	7*10 ⁴	30,8 ± 0,5	34,2 ± 0,3
	7*10 ³	34,1 ± 0,7	neg
<i>P. damnosus</i> (BS 41)	5*10 ⁴	30,7 ± 0,6	2 Proben: 35,1/34,5 1 Probe: neg
	5*10 ³	34,6 ± 0,4	neg

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass der optimierte PCMF-Filteraufschluss für den Spurennachweis das deutlich empfindlichere Verfahren darstellt.

4.3.2 Probenverarbeitung und DNA-Isolation aus unfiltrierbaren Proben

4.3.2.1 Ausgangssituation

Durch ein frühzeitiges Erkennen von Primärkontaminationen im Unfiltratbereich (Hefereinzucht, Gär-, Lagerkeller) können im Produktionsprozess noch geeignete Gegenmaßnahmen, wie z. B. eine schärfere Filtration oder eine KZE, ergriffen werden. Vor allem die mikrobiologische Reinheit der Anstellhefe sollte ein Ziel für eine Schnellmethode darstellen, da durch unreine Hefe ganze Chargen kontaminiert werden können.

Zusätzlich können der Kategorie „unfiltrierbare Proben“ auch kontaminierte Rückbiere und

Proben zugeordnet werden, die nach erfolgter Anreicherung bereits deutliche Trübung aufweisen. Da bei diesem Probenotyp keine Filtration möglich ist, mussten alternative Methoden zur Zellsammlung und DNA-Isolation erprobt werden.

Des Weiteren war es Ziel, mögliche Probleme hinsichtlich PCR-Inhibition, die sich bei diesem Probenotyp durch hohe Hefekonzentrationen, d. h. erhöhte Gehalte an Nicht-Ziel-DNA, ergeben können, zu beseitigen (JUVONEN et al 2003; STEWARD und DOWHANICK 1996).

4.3.2.2 Probenverarbeitung und DNA Isolation aus Gär- und Lagertankproben

Zur Isolation von Bakterien-DNA aus hefehaltigem Bier mit einer Hefezellzahl von 10^6 - 10^7 Zellen/ml wurden 4 verschiedene Methoden erprobt (Tab. 26). Hierzu wurde 1 ml hefetrübes Bier (Hefezellzahl $1,2 \cdot 10^7$ Zellen/ml) mit $5-7 \cdot 10^5$ Zellen/ml des betreffenden Zielkeims beimpft. Die Probenverarbeitung erfolgte wie unter 2.7.3.1-2.7.3.4 beschrieben. Die PCR-Analyse der DNA-Isolate erfolgte mit dem sLP600-System. Für alle PCR-Reaktionen wurde BSA als PCR-Enhancer verwendet.

Als die erfolgversprechendsten Methoden stellten sich Kugelaufschluss-B, Kochaufschluss-B und IGM heraus, wobei bei keinem Verfahren PCR-Inhibition auftrat (Tab. 26).

Tab. 26: Vergleich der PCR C_t -Werte vier verschiedener DNA-Isolationsmethoden aus Unfiltrat (Hefezellzahl $1,2 \cdot 10^7$ Zellen/ml); PCR C_t -Werte: Mittelwert und Standardabweichung (n = 3)

Organismus	Kugelaufschluss-B PCR C_t -Werte	Kochaufschluss-B PCR C_t -Werte	IGM PCR C_t -Werte	Bugs´n Beads PCR C_t -Werte
<i>L. brevis</i> (BS 40)	29,4 ± 0,6	30,8 ± 0,3	28,6 ± 0,2	35,0 ± 0,6
<i>L. lindneri</i> (BS 4)	30,4 ± 0,3	30,2 ± 0,6	30,7 ± 0,3	neg
<i>P. damnosus</i> (BS 41)	28,4 ± 0,5	29,1 ± 0,2	28,4 ± 0,3	33,6 ± 0,4

Der Bugs´n Beads-Kit lieferte schlechtere Werte und wurde auch aufgrund der höheren Kosten nicht weiter angewendet. Der Grund für das etwas schlechtere Abschneiden dürfte darin zu sehen sein, dass er in erster Linie für pathogene gram-negative Zielkeime entwickelt wurde, so dass laut Kit-Beschreibung für gram-positive Keime eine sehr viel längere Inkubationszeit nötig sein kann.

Mit den Methoden Kugelaufschluss-B und IGM war eine Sensitivität von ca. 10^3 Zellen/ml in hefehaltigen Proben (Hefezellzahl $1,2 \cdot 10^7$ Zellen/ml) erreichbar (Tab. 27).

Für die Brauerei-Testreihen wurde der Kugelaufschluss-B verwendet, da dieser aus Zeit- und Kostengründen Vorteile gegenüber der IGM-Methode lieferte und sich im Vergleich zum Kochaufschluss-B besser für die Bearbeitung von Anstellhefe eignete (4.3.2.3, Tab. 28).

Allerdings wurde die Sensitivität der entwickelten Bakterien PCR-Assays (6.1) mit dem

IGM-Aufschluss ermittelt, da dieser im Vergleich zum Kugelaufschluss-B vor allem im Bereich der Nachweisgrenze (10^3 Zellen/ml) verlässlichere Ergebnisse lieferte (Tab. 27).

Tab. 27: Vergleich von Kugelaufschluss-B und IGM; Zellen beimpft in pasteurisiertes Bier; mit $1,2 \cdot 10^7$ Hefezellen/ml versetzt; PCR C_t -Werte: Mittelwert und Standardabweichung (n = 3)

Organismus	Zellzahl/ml Bier	Kugelaufschluss-B PCR C_t -Werte	IGM PCR C_t -Werte
<i>L. brevis</i> (BS 40)	$6 \cdot 10^4$	31,8 ± 0,8	31,5 ± 0,40
	$6 \cdot 10^3$	2 Proben: neg 1 Probe: 35,6	34,8 ± 0,5
<i>P. damnosus</i> (BS 41)	$7 \cdot 10^4$	32,0 ± 0,6	32,1 ± 0,4
	$7 \cdot 10^3$	1 Probe: neg 2 Proben: 34,2/35,6	34,7 ± 0,6

4.3.2.3 Probenverarbeitung und DNA-Isolation aus Anstellhefe

Für Ernte- und Anstellhefe mit Zellzahlen von 10^8 - 10^9 Zellen/ml wurden die Methoden Kugelaufschluss-B, Kochaufschluss-B sowie IGM getestet.

In einer ersten Testreihe fanden die Protokolle wie unter 4.3.2.2 beschrieben Anwendung, wobei 1 ml Hefeproben wiederum mit 5 - $7 \cdot 10^5$ Zellen/ml beimpft und mit dem sLP600-Assay untersucht wurden (n = 3). Hier zeigte sich, trotz der Verwendung von BSA als PCR-Zusatz, bei einigen DNA-Isolaten PCR-Inhibition (Tab. 28).

Tab. 28: Vergleich der PCR C_t -Werte dreier verschiedener DNA-Isolationsmethoden aus Anstellhefe (Hefezellzahl $2 \cdot 10^9$ Zellen/ml); PCR-Assay: sLP600 mit IAC; PCR C_t -Werte: Mittelwert und Standardabweichung (n = 3)

Organismus	Kugelaufschluss-B PCR C_t -Werte	Kochaufschluss-B PCR C_t -Werte	IGM PCR C_t -Werte
<i>L. brevis</i> (BS 40)	1 Probe: Inhibition 2 Proben: 30,3/31,0	3 Proben: Inhibition	1 Probe: Inhibition 2 Proben: 29,9/30,4
<i>L. lindneri</i> (BS 4)	30,2 ± 0,7	1 Probe: Inhibition 2 Proben: 30,8/29,9	29,8 ± 0,5
<i>P. damnosus</i> (BS 41)	1 Probe: Inhibition 2 Proben: 29,3/30,6	1 Probe: Inhibition 2 Proben: 29,2/31,6	1 Probe: Inhibition 2 Proben: 29,7/30,4

Die Beobachtung, dass sich Hefe bzw. Hefe-DNA bei einer zu hohen Konzentration negativ auf einen PCR-Nachweis der Zielkeime auswirken kann, bestätigte sich.

Vor allem der Kochaufschluss erwies sich besonders anfällig gegenüber PCR-Inhibition, weshalb in den Brauerei-Testreihen für Lager- und Gärtankproben sowie für Anstellhefe DNA-Isolationsprotokolle auf Basis des Kugelaufschlusses-B Anwendung fanden.

Zur Beseitigung der PCR-Inhibition wurde versucht, die Hefezellzahl vor der DNA-Isolation zu verringern. Da Hefezellen größer sind als Bakterien und somit schneller sedimentieren, sollten Hefen und Bakterien durch Zentrifugation voneinander getrennt werden. Der mathematische Zusammenhang für die stationäre Sinkgeschwindigkeit (Stokes-Bereich, $Re < 0,25$) lässt sich anhand von Formel 7 beschreiben:

Formel 7:

$$w_f = \frac{\Delta\rho \cdot g \cdot x^2}{18 \cdot \eta}$$

w_f : Stationäre Sinkgeschwindigkeit
 $\Delta\rho$: Dichteunterschied zwischen Partikel und Medium
 g : Erdbeschleunigung
 x : Partikeldurchmesser
 η : Zähigkeit des Fluids

Da der Partikeldurchmesser quadratisch in die oben genannte Beziehung eingeht, können unterschiedlich große Zellen, wie in diesem Fall Hefen und Bakterien durch Zentrifugation voneinander getrennt werden.

Es muss allerdings vermieden werden, dass die Bakterien durch eine zu hohe Zentrifugationsgeschwindigkeit mit der im Überschuss vorliegenden Hefe mitgerissen werden und ebenfalls abzentrifugiert werden. Für diesen Zweck stellte sich in Vorversuchen eine Zentrifugation bei einer RZB von 250-300 für 3 min als optimal heraus, wobei der Zusammenhang zwischen Drehzahl und RZB der jeweiligen Zentrifugenspezifikation zu entnehmen ist. Der Überstand mit den darin befindlichen Bakterien kann anschließend gemäß 2.7.3.1, 2.7.3.2 oder 2.7.3.3 für eine DNA-Isolation verwendet.

Weiterhin sollte berücksichtigt werden, dass es durch Agglutination in der Anstellhefe zur Bildung von Zellhaufen aus Hefen und Bakterien kommen kann, wodurch eine Trennung durch Zentrifugation nicht mehr möglich ist. Daher sollten Zellagglomerate vor der Zentrifugation durch Zugabe eines oberflächenaktiven Additives wie etwa Tween 20, und anschließendem Vortexen aufgelöst werden (4.3.2.3).

Die prinzipielle Eignung und die Sensitivität dieses modifizierten Verfahrens wurde anhand des Kugelaufschlusses-B erprobt (Tab. 29).

Tab. 29: Methodenvariation zur DNA-Isolation bierschädlicher Bakterien aus Anstellhefe; Methode1: Kugelaufschluss-B ohne Zentrifugation der Überschusshefe; Methode 2: Zentrifugation der Überschusshefe und Verwendung des Überstandes für Kugelaufschluss-B; PCR C_T-Werte: Mittelwert und Standardabweichung (n = 3)

Organismus	Zellzahl/ml	Methode 1 PCR C _T -Werte	Methode 2 PCR C _T -Werte
<i>L. brevis</i> (BS 40)	10 ⁵	1 Probe: Inhibition 2 Proben: 30,4/31,4	30,1 ± 0,5
	10 ⁴	1 Probe: Inhibition 2 Proben: 32,4/ 33,1	33,1 ± 0,4
	10 ³	neg	neg
<i>L. lindneri</i> (BS 4)	10 ⁵	1 Probe: Inhibition 2 Proben: 29,0/30,6	29,9 ± 0,2
	10 ⁴	1 Probe: Inhibition 2 Proben:33,8/34,0	33,2 ± 0,4
	10 ³	2 Proben: Inhibition 1 Probe: neg	neg
<i>P. damnosus</i> (BS 41)	10 ⁵	29,6 ± 0,5	29,8 ± 0,7
	10 ⁴	1 Probe: Inhibition 2 Proben: 32,7/33,7	33,2 ± 1,0
	10 ³	neg	neg

Mit dem modifizierten Verfahren (Methode 2) war keine PCR-Inhibition mehr zu beobachten, während es ohne Abtrennung der Hefe wiederum zu einigen inhibierten PCR-Reaktionen kam. Allerdings ist im Bereich der Nachweisgrenze (10³ Zellen/ml) eine verringerte Sensitivität zu beobachten.

4.3.3 Probenverarbeitung und DNA-Isolation zum PCR Nachweis von Hefen

Analog zu den Bearbeitungsprotokollen für Bakterien sollte auch für Hefen ein einfaches und effektives DNA-Isolationsprotokoll erarbeitet werden.

4.3.3.1 Optimierung des Kugelaufschlusses-H

Um die Effektivität des Zellaufschlusses in Verbindung mit einer anschließenden PCR zu testen, wurden Beads mit 0,11 mm und 0,5 mm Durchmesser eingesetzt. Die Bearbeitung erfolgte gemäß 2.7.5.1. In einer modifizierten Version wurde bei den verschiedenen Durchmessern eine zusätzliche Hitzeinkubation eingefügt (5 min/95 °C/700 U/min auf Thermoinkubator). Als Probenmaterial dienten jeweils 100 µl (~10⁶ Keime/100 µl) einer Übernachtskultur. Die untersuchten Keime wurden vor der DNA-Isolation in 900 µl Bier eingimpft (Dreifachbestimmung pro Keim und Methode). Für die PCR wurden die Assays Dan, Sx und Pan verwendet (Tab. 14). Beads mit 0,5 mm Durchmesser in Verbindung mit einer 5-minütigen Inkubation bei 95 °C lieferten die besten PCR-Resultate (Abb. 25).

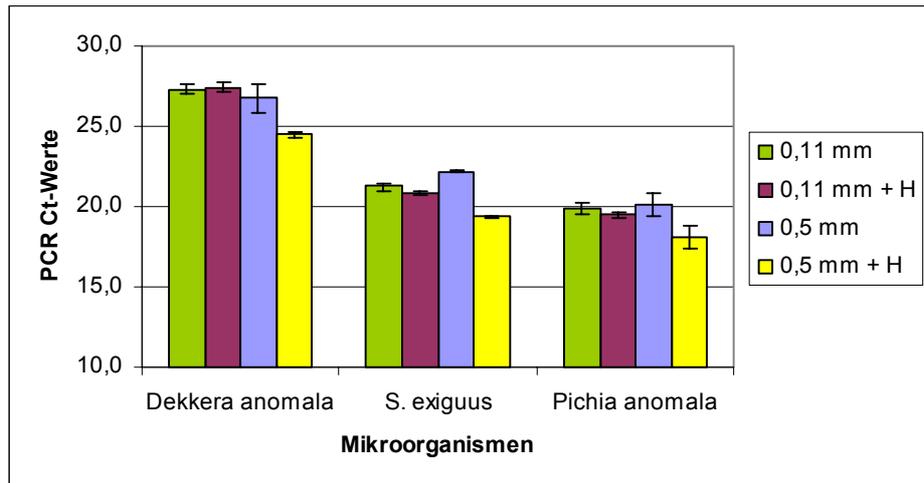


Abb. 25: PCR C_t-Werte verschiedener Hefe-DNA Isolate; Einsatz von Beads mit verschiedenen Durchmessern (0,11 und 0,5 mm) zum Zellaufschluss; mit/ohne Hitzeinkubation (H)

4.3.3.2 DNA-Isolation aus Hefe - Prinzipielle Eignung der IGM-Methode

Der Einsatzbereich des IGM-Verfahrens beschränkt sich laut Herstellerangaben auf die DNA-Isolation aus Blut, Säugetierzellen und Bakterien. Da an anderer Stelle jedoch die Vermutung geäußert wird, dass Chelex-basierte Protokolle für eine Vielzahl von Organismen und Probenmaterialien anwendbar sind (GIRAFFA et al. 2000), wurde versucht, das Protokoll auch auf die DNA-Isolation aus Hefezellen zu transferieren.

Die prinzipielle Eignung der Methode wurde anhand dreier Hefen (*Pichia anomala*, *S. diastaticus* und *Dekkera anomala*) überprüft. Als Probenmaterial dienten jeweils 100 µl einer Übernachtskultur (MYPG) der jeweiligen Keime, die vor der DNA-Isolation in 900 µl Bier eingepflegt wurden (n = 3). Da die Anwendung der IGM-Methode auf die untersuchten Hefen sehr erfolgversprechend verlief (Tab. 30), wurde ein Sensitivitätsvergleich zwischen Kugelaufschluss-H und IGM durchgeführt.

Tab. 30: Prinzipielle Eignung der IGM-Methode für die DNA-Isolation aus Hefen (Zellzahl ~10⁶ Zellen/ml); PCR C_t-Werte: Mittelwert und Standardabweichung (n = 3)

Organismen	PCR C _t -Werte
<i>Pichia anomala</i> (1)	18,0 ± 0,2
<i>S. diastaticus</i> (1)	23,1 ± 0,6
<i>Dekkera anomala</i> (1)	22,6 ± 0,4

Für den Vergleich zwischen Kugelaufschluss-H und IGM wurden 1 ml Bierproben mit *S. cerevisiae*, *S. diastaticus*, *Dekkera anomala*, *Pichia anomala* (10⁵-10³ Zellen/ml, Dreifachbestimmung pro Keim und Zellzahl) beimpft. Der Kugelaufschluss erfolgte mit 0,5 mm Beads und Hitzeinkubation (95 °C/5 min), der IGM-Aufschluss wurde wie unter 2.7.3.3 beschrieben ausgeführt. Für die anschließende PCR kamen die Assays Sce, Sdi, Dan

und Pan zum Einsatz. Für Zellzahlen von 10^5 Zellen/ml lieferten beide Methoden noch vergleichbare Werte. Bei 10^4 und 10^3 Zellen/ml wurde deutlich, dass der IGM-Aufschluss das sensitivere Verfahren darstellt (Tab. 31). Für die Bestimmung der Sensitivitäten der PCR-Assays (6.2) wurde daher das IGM-Verfahren angewendet.

Tab. 31: Vergleich zwischen Kugelaufschluss-H und IGM zur DNA-Isolation aus Hefen; PCR C_t -Werte: Mittelwert und Standardabweichung (n = 3)

Organismus	Zellzahl/ml	Kugelaufschluss-H PCR C_t -Werte	IGM PCR C_t -Werte
<i>S. cerevisiae</i> (WHB 68)	$5 \cdot 10^5$	30,2 ± 0,3	29,8 ± 0,2
	$5 \cdot 10^4$	33,7 ± 0,5	32,4 ± 0,3
	$5 \cdot 10^3$	Neg	35,6 ± 0,8
<i>S. diastaticus</i> (1)	$8 \cdot 10^5$	30,5 ± 0,2	29,7 ± 0,5
	$8 \cdot 10^4$	35,0 ± 0,3	32,9 ± 0,3
	$8 \cdot 10^3$	Neg	2 Proben: 36,3 / 37,0 1 Probe: neg
<i>Dekkera anomala</i> (1)	$2 \cdot 10^5$	28,4 ± 0,5	27,7 ± 0,2
	$2 \cdot 10^4$	33,1 ± 0,5	31,7 ± 0,2
	$2 \cdot 10^3$	2 Proben: neg 1 Probe: 35,9	35,5 ± 0,4
<i>Pichia anomala</i> (1)	$8 \cdot 10^5$	28,6 ± 0,4	26,1 ± 0,2
	$8 \cdot 10^4$	32,7 ± 0,2	30,2 ± 0,4
	$8 \cdot 10^3$	36,1 ± 0,4	33,9 ± 0,4

4.4 Innovative Ansätze zur Lebend/Tot-Differenzierung mittels EMA-PCR

4.4.1 Ausgangssituation

Die Möglichkeit falsch-positiver Befunde durch den Nachweis freier DNA oder die Detektion toter Zellen stellt ein Problem für PCR-Anwendungen in der mikrobiologischen Qualitätssicherung dar (RIJPENS und HERMAN 2002). Da DNA auch nach dem Zelltod nur langsam zerfällt, ist ein positives PCR-Ergebnis, bedingt durch tote Zellen nach erfolgter KZE oder Pasteurisation auch Tage später noch detektierbar (HERMAN 1997, MCKILLIP et al. 1999). Bisher konnten fragliche Proben mittels PCR nur indirekt über eine „Nachanreicherung“ auf die Anwesenheit von lebenden Zellen getestet werden. Hierzu wird eine PCR durchgeführt, bei der zusätzlich ein Rückstellanteil der Probe weitere 1-3 Tage angereichert wird und mit dem ursprünglichen C_t -Wert verglichen wird. Bei unverändertem oder schwächerem C_t -Wert wird das Signal von toten Zellen verursacht. Diese Methode ist jedoch unsicher sowie zeit- und kostenintensiv (DREIER und KLEESIEK 2004).

Durch den Zusatz von Ethidiumbromid Monoazid (EMA) während der PCR-Probenaufarbeitung sollte dieses Problem gelöst werden, so dass der selektive Nachweis von lebenden Keimen mittels PCR ermöglicht wird (NOGVA et al. 2003). Die an pathoge-

nen Keimen bereits erprobte Methode wurde in diesem Fall für die Detektion von bierschädlichen Bakterien angewandt.

4.4.2 Probenbehandlung mit EMA

Die Probenbehandlung und die Wahl der Parameter zu Beginn der Versuche erfolgte aufgrund der bereits vorliegenden Erkenntnisse von NOGVA et al. (2003).

- Zugabe von 50 µg/ml EMA
- Einwirkzeit: 5 min (in Dunkelheit)
- Bestrahlung: 3 min mit Halogenlampe (650 W)

Für die anschließende DNA Isolation wurde der Kugelaufschluss-B verwendet.

4.4.3 Auswirkungen von EMA auf freie DNA

Die prinzipielle Wirkungsweise von EMA wurde zu Beginn anhand von Rein-DNA getestet. Hierzu wurde *L. brevis*-DNA (1 ng/µl) mit 50 µg/ml EMA versetzt und wie oben beschrieben behandelt. Für die PCR-Analyse wurde das sLP600-Assay mit IAC verwendet. Durch die EMA-Behandlung konnte sämtliche freie DNA in der Probe inaktiviert werden (Abb. 26).

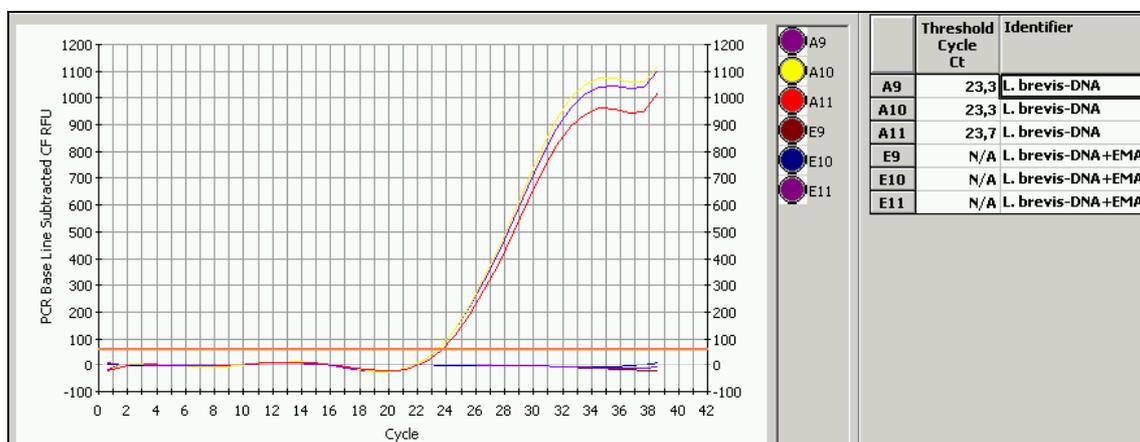


Abb. 26: Auswirkungen einer EMA-Behandlung (50 µg/ml) auf freie DNA; PCR-Assay: sLP600 mit IAC

Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine EMA-behandelte Probe die PCR-Reaktion nicht inhibiert, da die im PCR-Mix enthaltene IAC bei diesen Proben positiv reagierte.

4.4.4 Auswirkungen von EMA auf lebende und tote Zellen

Nachdem die Funktionsweise von EMA anhand von freier DNA bestätigt werden konnte, sollten die Auswirkungen von EMA auf lebende und tote Zellen mit anschließender PCR

überprüft werden. Hierzu wurden 4 Milchsäurebakterien (*L. brevis* BS 40, *L. lindneri* BS 4, *L. casei* BS 3, *P. damnosus* BS 41), *Pectinatus frisingensis* (BS 42) und *Megasphaera cerevisiae* (BS 46) untersucht. Als Abtötungsmethode wurde Hitze gewählt (5 min/75 °C), da sich in der Praxis vor allem bei Proben nach KZE oder Tunnelpasteur die Frage nach lebenden oder toten Keimen stellt.

4.4.4.1 Optimierung der EMA-Konzentration und der Einwirkdauer

Zunächst sollten bei der EMA-Konzentration und bei der Einwirkdauer die minimal notwendigen Grenzen bestimmt werden, um verlässlich ein DNA-Signal toter Zellen zu unterdrücken. Auf diese Weise sollte eine EMA-Überdosierung und mögliche negative Auswirkungen auf eine PCR vermieden werden.

Hierzu wurden Bierproben mit den jeweiligen Zielkeimen versetzt ($5 \cdot 10^6$ Keime/500µl, n = 2). Anschließend erfolgte die KZE (5 min/75 °C), eine EMA-Behandlung wie in 4.4.2 beschrieben, Kugelaufschluss-B zur DNA-Isolation und eine abschließende PCR mit dem sLP600-Assay. Zur Kontrolle der KZE wurde von den hitzebehandelten Proben 20 µl-Aliquots auf MRS-Agar ausplattiert und 7 Tage bei 28°C anaerob bebrütet. In keinem der Fälle war nach der KZE noch Wachstum feststellbar.

Nur für *L. brevis* und *L. lindneri* konnte durch die EMA-Behandlung eine deutliche Abschwächung des PCR-Signals bis hin zu einer negativen Reaktion beobachtet werden. Für die übrigen Keime konnte auch mit der längsten Einwirkdauer und der höchsten EMA-Konzentration ein positives PCR-Signal nicht unterdrückt werden (Tab. 32).

Tab. 32: Auswirkungen unterschiedlicher EMA-Behandlungen auf verschiedene Milchsäurebakterien (BS 40, BS 4, BS 3, BS 41; $\sim 10^6$ Zellen/500 µl); PCR-Assay: sLP600 mit IAC

Probenbehandlung	<i>L. brevis</i>	<i>L. lindneri</i>	<i>L. casei</i>	<i>P. damnosus</i>
	PCR C _t -Werte Probe 1 / Probe 2	PCR C _t -Werte Probe 1 / Probe 2	PCR C _t -Werte Probe 1 / Probe 2	PCR C _t -Werte Probe 1 / Probe 2
unbehandelt	21,6 / 21,5	24,3 / 23,7	20,1 / 19,1	22,3 / 21,7
KZE, ohne EMA	23,2 / 22,5	25,2 / 24,0	20,4 / 20,7	22,6 / 23,0
KZE, EMA: 0 min, 25 µg/ml	31,0 / 32,2	neg / neg	29,2 / 28,2	28,4 / 28,5
KZE, EMA: 2,5 min, 25 µg/ml	33,5 / 32,4	neg / neg	30,9 / 29,7	30,8 / 29,6
KZE, EMA: 5 min, 25 µg/ml	32,7 / 33,7	neg / neg	30,6 / 30,5	31,7 / 30,2
KZE, EMA: 0 min, 50 µg/ml	34,2 / 33,8	neg / neg	30,2 / 33,8	30,2 / 29,3
KZE, EMA: 2,5 min, 50 µg/ml	neg / 34,5	neg / neg	31,5 / 29,9	27,3 / 26,8
KZE, EMA: 5 min, 50 µg/ml	37,7 / 38,2	neg / neg	30,6 / 29,6	26,5 / 27,8

Noch deutlicher fielen die Ergebnisse für die gram-negativen Keime *Megasphaera cerevisiae* und *Pectinatus frisingensis* aus. Hier erwies sich eine EMA-Behandlung als nahezu wirkungslos (Tab. 33).

Tab. 33: Auswirkungen unterschiedlicher EMA-Behandlungen auf *Pectinatus frisingensis* (BS 42) und *Megasphaera cerevisiae* (BS 46, ~106 Zellen/500 µl); PCR-Assay: sPM mit IAC

Probenbehandlung	<i>Megasphaera cerevisiae</i>	<i>Pectinatus frisingensis</i>
	PCR C _i -Werte Probe 1 / Probe 2	PCR C _i -Werte Probe 1 / Probe 2
unbehandelt	21,1 / 20,1	21,7 / 23,9
KZE, ohne EMA	21,2 / 21,1	22,3 / 21,8
KZE, EMA: 0 min, 25 µg/ml	24,8 / 25,4	24,8 / 23,8
KZE, EMA: 2,5 min, 25 µg/ml	29,5 / 29,5	23,8 / 24,5
KZE, EMA: 5 min, 25 µg/ml	27,6 / 27,4	24,2 / 23,0
KZE, EMA: 0 min, 50 µg/ml	29,9 / 30,1	23,5 / 24,7
KZE, EMA: 2,5 min, 50 µg/ml	27,5 / 27,9	22,3 / 22,0
KZE, EMA: 5 min, 50 µg/ml	26,9 / 27,7	22,4 / 22,0

Eine weitere Erhöhung der Parameter Einwirkdauer und EMA-Konzentration erschien in diesen Fällen als nicht erfolgversprechend und wurde daher unterlassen.

Zudem zeigte sich, dass EMA toxisch auf lebende Zellen wirkt, da nach einer EMA Zugabe zu lebenden Zellen (*L. casei* BS 3, *L. lindneri* BS 4) kein Wachstum mehr zu beobachten war. Zu diesem Zweck wurden Bierproben mit $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml versetzt, nach EMA-Zugabe (25 µg/ml) 20 µl Aliquots auf MRS-Agar ausplattiert und 7 Tage bei 28°C anaerob bebrütet. Während in den unbehandelten Proben Wachstum nachzuweisen war, blieb bei den mit EMA versetzten Zellen eine Koloniebildung aus (Abb. 27).

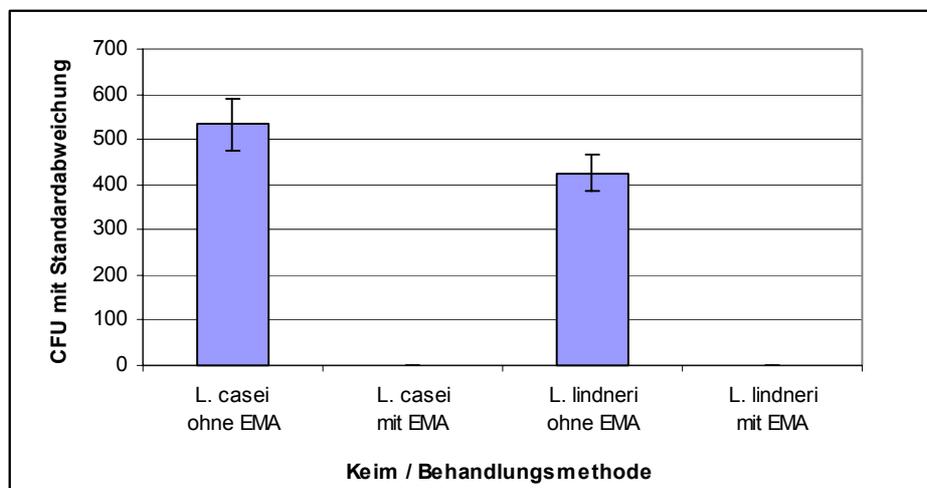


Abb. 27: Auswirkungen einer EMA-Zugabe zu lebenden Zellen (*L. casei* BS 3, *L. lindneri* BS 4); EMA-Zugabe: 25 µg/ml; CFU auf MRS-Agar nach 7 Tagen

Diese negativen Auswirkungen auf lebende Zellen dürften auch der Grund sein, weshalb sich die PCR-Sensitivität bei einer EMA-Zugabe zu lebenden Zellen im Vergleich zu unbehandelten Proben verschlechtert (PAWLOWSKY et al. 2006).

Da mit der Methode nicht für alle untersuchten Keime ein PCR-Signal von toten Zellen unterdrückt werden konnte und die PCR-Sensitivität für lebende Zellen abnahm, wurden keine weiteren EMA-Versuche durchgeführt.

5 Optimierung von PCR-Reaktionen

Um eine maximale PCR-Effizienz gewährleisten zu können, wurden die optimalen Reaktionsbedingungen für jedes PCR-Assay bestimmt und bei Bedarf optimiert.

5.1 Optimierung der PCR-Reaktionskomponenten

Alle Versuche wurden standardmäßig mit HotStar *Taq*-Polymerase, PCR-Puffer und $MgCl_2$ von Qiagen durchgeführt.

5.1.1 Primerkonzentration

Bei zu geringen Oligonukleotidkonzentrationen ist eine unbefriedigende PCR-Effizienz zu erwarten, während es bei zu hohen Konzentrationen vermehrt zu Fehlpaarungen und unspezifischen Produkten kommen kann (MÜLLER 2001). Der beigefügte PCR-Puffer ist durch den Zusatz von NH_4^+ -Ionen soweit optimiert, dass eine standardmäßige Primerkonzentration von 0,1-0,5 μM empfohlen wird (o. V. 2002). Durch die Gestaltung des Puffers wird eine hohe Stringenz beim Annealing gewährleistet, da die NH_4^+ -Ionen die schwachen H-Brückenbindungen fehlgepaarter Primer destabilisieren und somit eine höhere Spezifität erreicht wird (MISSEL 2003). Die Oligonukleotidkonzentration für ein neu entwickeltes PCR-Assay wurde daher standardmäßig bei 0,5 μM gewählt. Versuche mit Primerkonzentrationen über 0,5 μM zeigten bei gleicher Spezifität keine Verbesserung der Sensitivität.

5.1.2 $MgCl_2$ -Konzentration

$MgCl_2$ ist ein metabolischer Cofaktor für die *Taq*-Polymerase. Mg^{2+} -Ionen beeinflussen die Enzymaktivität, erhöhen die Schmelztemperatur der dsDNA und bilden mit den Nukleotiden einen löslichen Komplex, der das Substrat bildet, welches von der Polymerase erkannt wird. Die Menge an benötigten Mg^{2+} -Ionen hängt von der Menge an Mg^{2+} -bindenden Substanzen (dNTPs, EDTA) im PCR-Mix ab. Niedrige Mg^{2+} -Konzentrationen führen zu einer geringen und hohe Konzentrationen zu einer hohen PCR-Ausbeute. Allerdings kann bei überschüssigen Mg^{2+} -Ionen die Bildung unspezifischer PCR-Produkte gefördert werden (MÜLLER 2001).

Wie schon bei der Bestimmung der optimalen Primerkonzentration wird auch hier durch den Zusatz von NH_4^+ -Ionen verhindert, dass durch zu hohe Mg^{2+} -Konzentrationen Fehlpaarungen und unspezifische PCR-Produkte auftreten. Als standardmäßige Mg^{2+} -Konzentration wurde 3 mM im fertigen PCR-Mix eingesetzt, da hier die besten Ergebnisse erzielt wurden (Abb. 28). Niedrigere $MgCl_2$ -Konzentrationen (1,5 mM, 2,0 mM) führten zu schlechteren PCR-Ausbeuten, während mit einer Steigerung auf 4 mM keine weitere Ver-

besserung mehr erzielt werden konnte.

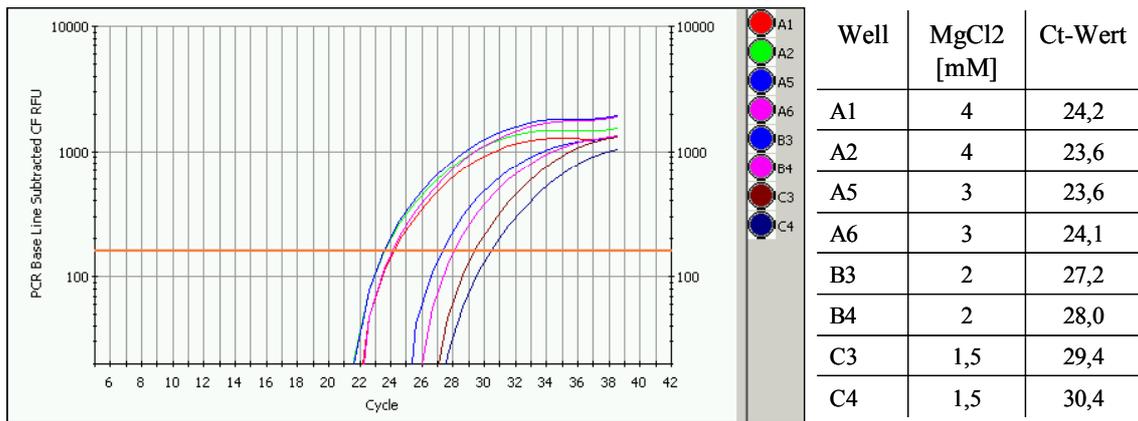


Abb. 28: Auswirkungen verschiedener MgCl₂-Konzentrationen auf die PCR-Effizienz

5.1.3 PCR-Enhancer

Zahlreiche Substanzen können, wenn sie in der richtigen Konzentration verwendet werden, als PCR-Beschleuniger wirken (MÜLLER 2001, NEWTON und GRAHAM 1995). Wie in Kapitel 4.3.1.2 erläutert, wurde BSA als PCR-Enhancer verwendet, da durch die Zugabe von BSA PCR-Inhibition beseitigt werden konnte. Außerdem lässt sich durch eine BSA-Zugabe die Fehlerquote der *Taq*-Polymerase senken (MÜHLHARDT 2002). Alle Tests hinsichtlich unerwünschter Kreuzreaktionen der entwickelten PCR-Systeme wurden mit BSA (100 µg/ml) im PCR-Mix durchgeführt. Negative Auswirkungen auf die erwartete Spezifität der PCR-Assays konnten durch eine BSA-Zugabe nicht beobachtet werden (Kapitel 6).

5.2 Multiplex Real-Time PCR

Die Tatsache, dass einige Real-Time PCR-Geräte vier verschiedene Fluoreszenzen messen können, bedeutet nicht automatisch, dass die Durchführung von 4-Kanal Simultanmessungen auch tatsächlich realisiert werden können. Aufgrund unterschiedlicher Geräteplattformen, die nicht für alle Farbstoffe kompatibel sind und einer begrenzten Auswahl an geeigneten Reporter/Quencher-Kombinationen muss man bei der Zusammenstellung von Multiplex-Systemen sehr überlegt vorgehen, um die Vorteile dieser Art der PCR nutzen zu können (MACKAY 2004).

5.2.1 Wahl der Sonden für Multiplex Real-Time PCR

Entgegen der häufig gewählten Variante, TAMRA als Quencher für Reporterfarbstoffe wie FAM, HEX oder VIC zu verwenden (LAGIER et al. 2004, GRUBER et al. 2001), wurde mit Black Hole Quenchern (BHQ-1, BHQ-2) gearbeitet, da diese keine Eigenfluoreszenz be-

sitzen und für Multiplexanwendungen besser geeignet sind. Mit BH-Quenchern kann somit ein größerer Bereich an Wellenlängen für die Messung unterschiedlicher Reporterfarbstoffe genutzt werden (o. V. 2004). Bei Verwendung von Quenchern mit Eigenfluoreszenz, wie z. B. TAMRA, sind Multiplex-Anwendungen nur in begrenztem Maß möglich, da gewisse Wellenlängen durch die Emission des Quenchers belegt sind (E_{\max} TAMRA = 582 nm). Somit kann kein zusätzlicher Reporter (z. B. ROX) mit ähnlichem Emissionsmaximum eingefügt werden (E_{\max} ROX = 600), da es sonst zu einer Überlappung („cross talk“) der Signale kommen würde (MACKAY 2004).

Um die theoretische Möglichkeit einer 4-Kanal-Simultan-PCR in der Praxis umzusetzen, wurden vier Einzelreaktionen zu einem einzigen PCR-System kombiniert.

Tab. 34: Reporter/Quencher-Kombination bei einer 4-Kanal-Multiplex-PCR (Fourplex-PCR)

PCR-Assay	Sonde	Reporter	Quencher
sLP600 (Laktobazillen/Pediokokken)	s700	FAM	BHQ-1
Dan (<i>Dekkera anomala</i>)	Y58	HEX	BHQ-1
sPM (<i>Pectinatus</i> spp., <i>Megasphaera cerevisiae</i>)	s560	ROX	BHQ-2
Lbr (<i>L. brevis</i>)	i200	CY5	BHQ-2

In vier getrennten Reaktionen wurde die Ziel-DNA für jeweils ein Assay zugegeben. Es sollte zu jeweils einer positiven Reaktion im betreffenden Fluoreszenzkanal kommen, während alle anderen Kurven negativ erwartet wurden.

Aus Abb. 29 ist ersichtlich, dass mit den gewählten Sonden eine zeitgleiche Detektion der vier verschiedenen Fluoreszenzen ohne cross-talk möglich war.

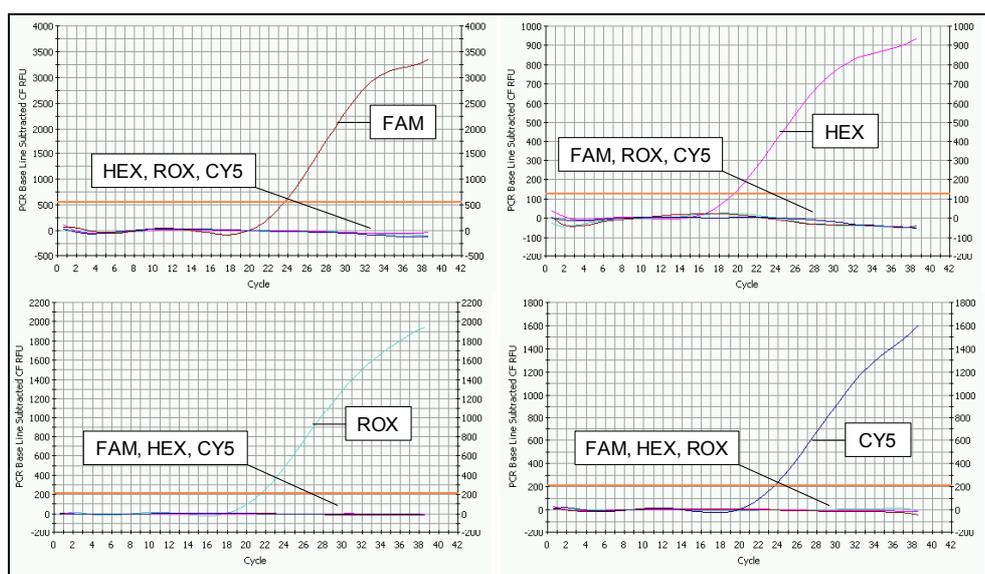


Abb. 29: Fourplex-PCR mit den Reporter-Farbstoffen FAM, HEX, ROX und CY5 unter Verwendung von BH-Quenchern

5.2.2 Grenzen von Multiplex Real-Time PCR-Anwendungen

Schwierigkeiten ergaben sich bei einer praktisch sinnvollen Gestaltung eines Fourplex-Systems, da die Sensitivität der Einzelsysteme bei ungünstiger Kombination beeinträchtigt werden kann.

In dem oben gewählten Beispiel (Abb. 29) war pro Reaktion nur jeweils eine Ziel-DNA anwesend. Bei gleichzeitiger Anwesenheit aller vier target-DNA's verteilt sich die Aktivität der Polymerase auf vier PCR-Reaktionen, was zu erheblichen Einbußen in der PCR-Effizienz der Einzelreaktionen führen kann. Vor allem wenn eine DNA nur in Spuren enthalten ist, kann dies zu einem Ausbleiben der PCR-Reaktion führen. Dieses Phänomen wurde beim Einsatz von Internen Amplifikationskontrollen beobachtet und ausgenutzt (5.4, 6.1.1.3).

Ein zusätzliches Problem kann sich ergeben, wenn eine DNA die target-DNA für zwei oder mehr gleichzeitig ablaufende PCR-Reaktionen darstellt, da dann eine Konkurrenz sowohl um die Polymerase-Aktivität als auch um die Ziel-DNA, d. h. die Primerbindestellen vorliegt. Dies wäre der Fall, wenn bei einer PCR im TaqMan-Format Screening- und Identifizierungs-PCR simultan erfolgen. Im dargestellten Fall nahm die Nachweisempfindlichkeit des kombinierten Systems (sLP600 + iLbr) im Vergleich zu den Einzelreaktionen (sLP600, iLbr) ab.

Tab. 35: Vergleich zwischen separaten Assays und Multiplex-Assays bei identischer Ziel-DNA; (n = 3)

PCR-Assays; PCR C _t -Werte; <i>L. brevis</i> -DNA (10 pg/Reaktion)			
Getrennte PCR-Assays		Multiplex-Assay: iLbr+sLP600	
iLbr	sLP600	iLbr (FAM)	sLP600 (HEX)
32,7 ± 0,3	29,6 ± 0,2	35,2 ± 0,5	31,4 ± 0,3

5.3 Optimierung des Temperaturprotokolls über Gradienten-PCR

Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer lässt sich über verschiedene Formeln berechnen (MÜHLHARDT 2002), und wird beim Primerdesign von der Software unter den gewählten PCR-Bedingungen automatisch errechnet. Allerdings empfiehlt es sich, die optimale Annealingtemperatur für jedes PCR-Assay, die oft etwa 5°C über T_m liegen kann, über eine Gradienten-PCR empirisch zu bestimmen. Durch intra- und intermolekulare Wechselwirkungen der beteiligten Oligonukleotide (Primer und Sonden) können Abweichungen von der errechneten Temperatur auftreten (LUNGE et al. 2002).

Bei einer Gradienten-PCR wird eine Ziel-DNA bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen amplifiziert. Durch den Vergleich der C_t-Werte kann die optimale Temperatur abgelesen werden. Sowohl bei zu hohen als auch bei zu niedrigen Anlagerungstemperaturen kann die Effizienz der PCR negativ beeinflusst werden. Ist die Annealingtemperatatur zu

hoch, können sich keine H-Brücken zwischen den Primern und der DNA ausbilden, während sich bei zu niedrigen Temperaturen vermehrt Primerdimere und Hairpin-Strukturen bilden können. Außerdem besteht bei zu niedrigen Temperaturen eine erhöhte Gefahr von Fehlpaarungen der Primer an non-target-DNA, was die Spezifität eines PCR-Systems negativ beeinflussen kann (o. V. 1999). Um die Stringenz des Assays zu erhalten, sollte eine Kombination aus möglichst hoher Temperatur bei gleichzeitig möglichst niedrigen C_t -Werten gewählt werden.

Für das dargestellte Beispiel (PCR-Assay: Lli) konnte mittels Gradienten-PCR eine optimale Annealingtemperatur von 57-61 °C ermittelt werden (Abb. 30).

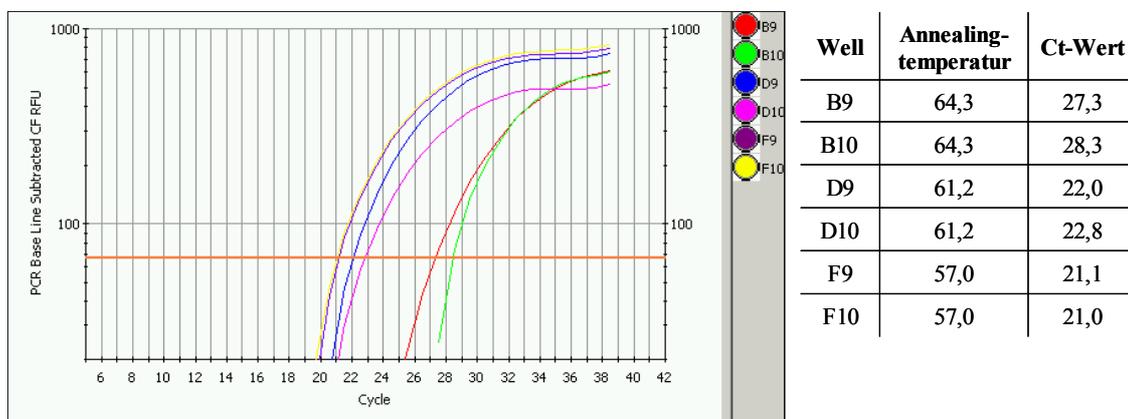


Abb. 30: Temperaturgradienten-PCR für das Lli-Assay

Analog dazu wurde mittels Gradienten-PCR für jedes PCR-Assay die optimale Annealingtemperatur empirisch bestimmt.

5.4 Integration interner Amplifikationskontrollen (IAC)

Eine IAC dient zur Vermeidung falsch-negativer PCR-Ergebnisse. Wird eine PCR ohne IAC durchgeführt, kann ein negatives Ergebnis die Abwesenheit von Ziel-DNA widerspiegeln. Negative Resultate könnten allerdings auch durch die Anwesenheit von PCR-inhibierenden Substanzen, durch Pipettierfehler, falsche Reaktionsbedingungen oder Gerätefehler verursacht sein (BURKARDT 2000).

Die IAC ist ein eigenes PCR-System bestehend aus Primern, Sonde und der zugehörigen DNA. Die IAC-DNA, die unterschiedlich zur DNA der Nachweisreaktion ist, wird dem Mix vor der PCR in definierter Menge zugefügt und muss unter standardisierten Bedingungen immer ein gleich starkes positives Signal erzeugen. Die Sonden von IAC und Nachweis-system sind mit unterschiedlichen Reportern versehen, so dass eine gleichzeitige Messung und Unterscheidung von IAC- und Ziel-DNA möglich ist. Wenn die positive Kontrolle (Ziel-DNA) und die NTC die erwarteten PCR-Ergebnisse liefern, können Pipettier- oder

Gerätefehler ausgeschlossen werden. Ein negatives Resultat von Ziel-DNA und IAC ist somit ein sicheres Zeichen für eine PCR-Inhibition (HOORFAR et al. 2003)

Es existieren verschiedene Strategien bei der Gestaltung einer IAC. Optimalerweise sollte das IAC-System nahezu identisch zum Nachweissystem sein und sich nur durch wenige aber entscheidende Basen an den Primer-Bindestellen unterscheiden (BURKARDT 2000).

Möglich ist auch die Verwendung eines künstlichen DNA-Fragments, z. B. eines Klonierungsvektors. Hier ist sichergestellt, dass die Ziel-DNA in natürlichen Proben wie Bier nie zusammen mit der IAC-DNA vorkommen kann und das IAC-Signal nur von der zugegebenen DNA-Menge im PCR-Mix stammt (MALORNY et al. 2003c).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein anderer Ansatz zur Integration einer IAC gewählt. Beim Nachweis von Bakterien diente das Ctr-System (*Candida tropicalis*) als IAC, und für die Hefen wurde das sPM-Assay (Screening für *Pectinatus* spp. und *Megasphaera cerevisiae*) eingesetzt. Bei beiden IAC-Systemen ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass die nachzuweisenden Zielkeime und die IAC-DNA in einer Praxisprobe simultan vorliegen. *Candida tropicalis* kommt in Produktproben keine Bedeutung zu, sondern spielt lediglich als Indikatorkeim und bei der Biofilmbildung im Abfüllbereich eine Rolle. *Pectinatus* spp. hingegen sind typische Sekundärkontaminanten im Abfüllbereich, die aufgrund der hohen O₂-Werte im Unfiltratbereich nicht nachzuweisen sind.

Als IAC-DNA diente nicht genomische DNA sondern aufgereinigte PCR-Produkte mit den entsprechenden Primer-Zielregionen. Für das Ctr-System wurde der ITS1-5.8S-ITS2 Abschnitt mittels der Primer 2236C/3124T amplifiziert (MONTROCHER et al. 1998) und für das sPM-Assay wurden die in der 16S lokalisierten Primer 27f/907r von SAKAMOTO et al. (2002) verwendet.

Die DNA der PCR-Produkte im PCR-Mix wurde so bemessen, dass sich ein schwaches aber dennoch deutliches und konstantes PCR-Signal mit einem C_t-Wert von 32 ± 0,5 ergab. So sollte gewährleistet werden, dass die Sensitivität des Nachweissystems bei Verkeimungen im Spurenbereich nicht durch die kompetitive Wirkung einer zu hoch dosierten IAC gemindert wird (MALORNY et al. 2003c). Bei einem stark positiven PCR-Ergebnis kann es daher vorkommen, dass das Signal der IAC aufgrund der konkurrierenden Effekte ausbleibt (Abb. 34).

Zudem lagen die Effizienzen der PCR-Systeme für die IAC mit 87 % (Ctr) bzw. 89 % (sPM) im unteren Bereich der entwickelten Assays. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die IAC-Reaktion nicht bevorzugt gegenüber der eigentlichen Nachweisreaktion abläuft (RIJPENS und HERMAN 2002). Sollte der theoretisch mögliche Fall eintreten, dass der IAC-Keim zusammen mit dem nachzuweisenden Keim auftritt, würde sich dies in nach unten abweichenden C_t-Werten für die IAC auswirken.

6 Neu entwickelte PCR-Assays

6.1 PCR-Assays zum Nachweis bierschädlicher Bakterien

Zum Nachweis bierschädlicher Bakterien wurden gruppen- und speziesspezifische Real-Time PCR-Systeme (TaqMan-PCR) getestet.

Lediglich für das sLP200-System erfolgte kein Transfer auf Real-Time PCR-Format, da sich dieses Assay als zu unspezifisch erwies. Eine weitere Charakterisierung dieses Systems wurde daher nicht durchgeführt. Für alle anderen Assays erfolgten die Versuche in Real-Time PCR-Format.

Für das System sLP600 wurde die Sensitivität und die PCR-Effizienz mit und ohne IAC bestimmt. Für die Multiplex-Assays sLPPM und iLbcp, bei denen verschiedene Systeme kombiniert wurde eine IAC integriert. Bei allen anderen Systemen erfolgten die Versuche ohne IAC.

6.1.1 sLP600 - Screening-System für Laktobazillen und Pedikokken

Das sLP600-System dient zur gruppenspezifischen Detektion von vorwiegend bierschädlichen Laktobazillen und Pediokokken. Es besteht aus je zwei Vorwärtsprimern und zwei Rückwärtsprimern, wobei der Consensusprimer LP600-f bierschädliche Laktobazillen mit Ausnahme von *L. lindneri* erfasst. Daher wurde zusätzlich noch LI-f eingefügt, der spezifisch diesen Keim detektiert. Als Rückwärtsprimer dienten LP600-r1, der alle bierschädlichen Keime bis auf *L. plantarum* erfasst, und LP600-r2, der ebenfalls einige Laktobazillen, darunter auch *L. plantarum*, detektiert. Das Grundgerüst dieses Systems bilden somit die Primer LP600-f und LP600-r1, während die Primer LI-f und LP600-r2 nur eingefügt wurden, um *L. lindneri* bzw. *L. plantarum* in das Screening zu integrieren. Alle Primer wurden so gewählt, dass die Sonde s700 für alle Amplikons verwendet werden konnte.

6.1.1.1 sLP600 – Reaktionsbedingungen und Spezifität

Die Konzentration der Primer wurde auf 500 nM (LP600-f, LI-f, LP600-r1) bzw. 250 nM (LP600-r2) eingestellt. Alle anderen Komponenten wurden gemäß Tab. 8 verwendet.

Mittels Gradienten-PCR wurde eine optimale Annealingtemperatur für das Gesamtsystem von 60-61°C bestimmt, weshalb für alle weiteren Versuche das in Tab. 9 beschriebene Temperaturprotokoll gewählt wurde.

Bei der Untersuchung der Rein-DNA Isolate (Tab. 3, Tab. 4) wurden folgende Resultate erzielt (Tab. 36).

Tab. 36: Spezifität des sLP600-Assays

PCR-Ergebnis	Getestete Organismen			
Positiv (Bakterien-DNA)	<i>L. brevis</i> (1-4)	<i>L. brevisimilis</i>	<i>L. buchneri</i>	<i>L. casei</i> (1+2)
	<i>L. collinoides</i>	<i>L. coryniformis</i> (1+2)	<i>L. curvatus</i>	<i>L. fructivorans</i>
	<i>L. hilgardii</i>	<i>L. kefirii</i>	<i>L. lindneri</i> (1-3)	<i>L. malefermentans</i>
	<i>L. parabuchneri</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracollinoides</i>	<i>L. plantarum</i> (1+2)
	<i>L. reuteri</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. sanfranciscensis</i>	<i>P. clausenii</i>
	<i>P. damnosus</i> (1+2)	<i>P. inopinatus</i>	<i>P. parvulus</i>	<i>P. pentosaceus</i>
Negativ (Bakterien-DNA)	<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>E. coli</i>
	<i>Gluconobacter oxydans</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. alimentarius</i>
	<i>L. amylolyticus</i>	<i>L. amylophilus</i>	<i>L. amylovorus</i>	<i>L. bifermentans</i>
	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. helveticus</i>
	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. perolens</i> (1+2)	<i>L. salivarius</i>	<i>L. sanfranciscensis</i>
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Megasphaera cerevisiae</i> (1+2)	<i>Micrococcus kristinae</i>	<i>Obesumbacterium proteus</i>
	<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	<i>Pectinatus frisingensis</i>	<i>Pectinatus</i> sp.
<i>Weissella paramesenteroides</i>	<i>Weissella viridescens</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>		
Positiv (Hefe-DNA)				
Negativ (Hefe-DNA)	<i>Dekkera anomala</i> (1)	<i>Dekkera bruxellensis</i> (1)	<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
	<i>Pichia anomala</i> (1)	<i>Pichia membranifaciens</i> (1)	<i>S. cerevisiae</i> var. <i>carlsbergensis</i> WHB 34/70	<i>S. cerevisiae</i> WHB 68
	<i>S. exiguus</i>	<i>S. diastaticus</i> (1)	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (1)	

Die mittels PCR erzielten Ergebnisse entsprachen den erwarteten Ergebnissen des Sequenz-Alignments und der BLAST-Analyse.

Mit dem sLP600-System können alle wichtigen in der Literatur genannten obligat und potentiell schädlichen Laktobazillen und Pediokokken erfaßt werden (JESPERSEN und JACOBSEN 1996; SUZUKI et al. 2004). Alle negativ getesteten Milchsäurebakterien spielen bisher – mit Ausnahme von *L. perolens* (6.1.2) - als Bierschädlinge keine Rolle oder werden zur Maische- bzw. Würzesäuerung verwendet (z. B. *L. amylovorus*, *L. amylolyticus*, *L. delbrueckii*). Neben obligat und potentiell schädlichen Keimen wurden auch einige brauereifremde Laktobazillen erfaßt (z. B. *L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. kefirii*). Ein Abgleich mit weiteren 16S rDNA-Sequenzen von derzeit akzeptierten *Lactobacillus* spp. ergab, dass noch andere Laktobazillen erfaßt werden könnten. Diese wurden im Rahmen der Arbeit aber nicht getestet. Im Anhang ist das zu erwartende Verhalten des sLP600-Assays hinsichtlich dieser Laktobazillen aufgelistet (Anh. 8).

Da ein Auftreten dieser Keime in Brauereien jedoch unwahrscheinlich ist, deutet ein positives sLP600-Signal vor allem in Verbindung mit einer selektiven oder bedingt selektiven Voranreicherung mit großer Wahrscheinlichkeit auf das Vorhandensein bierschädlicher Laktobazillen hin.

6.1.1.2 sLP600 - Sensitivität und PCR-Effizienz ohne IAC

Unter den oben genannten Reaktionsbedingungen konnte mit dem sLP600-Assay Rein-DNA (*L. brevis* BS 40) bis zu einer Menge von 500 fg detektiert werden. Bei 50 fg zeigte sich noch ein leichter Anstieg der Messkurven, allerdings konnte nur noch bei einer der drei Proben ein C_T -Wert ermittelt werden (Abb. 31, Tab. 37). Die Darstellungen der Meßreihen zur Bestimmung der Sensitivität aller weiterer Systeme sind im Anhang ersichtlich.

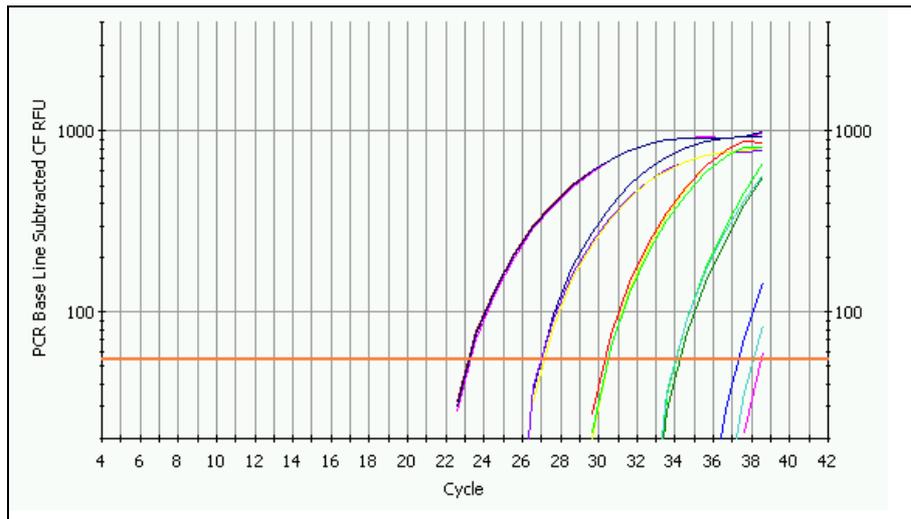


Abb. 31: Sensitivität des sLP600-Assays ohne IAC; *L. brevis* Rein-DNA von 500 pg-50 fg (n = 3)

Für das sLP600-System konnte aufgrund von Formel 4 eine PCR-Effizienz von 91,6% und eine lineare Regression mit einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,999 ermittelt werden (Abb. 32, Tab. 37).

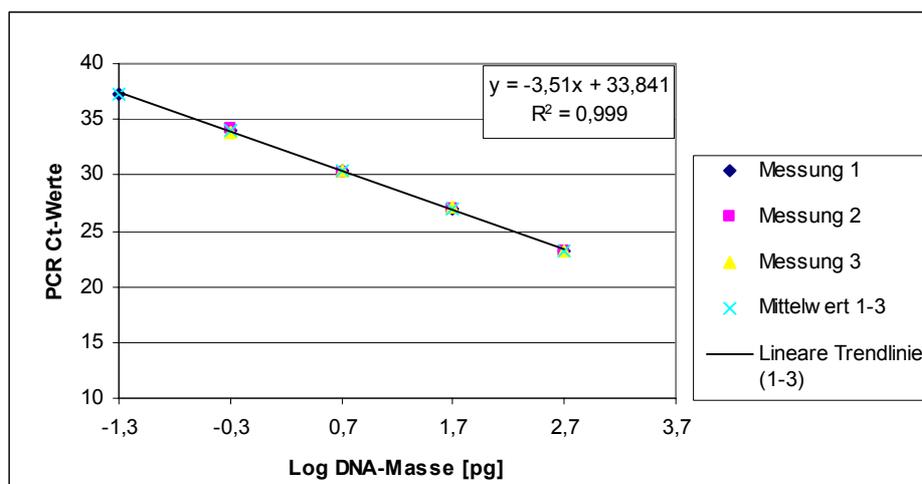


Abb. 32: Lineare Regression des sLP600-Assays ohne IAC; *L. brevis* Rein-DNA von 500 pg-50 fg (n = 3)

Tab. 37 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der DNA-Verdünnungsreihe (*L. brevis* BS 40) mit dem sLP600-System ohne IAC. Die Graphen zur linearen Regression und die dazugehörigen Daten aller weiterer DNA-Verdünnungsreihen und PCR-Systeme sind ebenfalls dem Anhang zu entnehmen.

Tab. 37: PCR-Ct-Werte und PCR-Kennzahlen zur Bestimmung der Sensitivität des sLP600-Assays ohne IAC; *L. brevis* Rein-DNA von 500 pg-50 fg (n = 3)

Getestete DNA	DNA-Masse [pg]	C _t -Werte Messung 1	C _t -Werte Messung 2	C _t -Werte Messung 3	C _t -Werte (Mittelwert 1-3)	s	PCR-Effizienz [%]	Slope	R ²
<i>L. brevis</i>	500	23,23	23,12	23,17	23,17	0,06	91,6	-3,51	0,999
	50	26,91	26,91	27,06	26,96	0,09			
	5	30,41	30,2	30,41	30,34	0,12			
	0,5	33,93	34,13	33,91	33,99	0,12			
	0,05	37,20	neg	neg	37,20				

Da das sLP600-System ein Multiplex-System darstellt (6.1.1), wurden für Verdünnungsreihen von *L. lindneri*- und *L. plantarum*- DNA ebenfalls die Nachweisgrenzen bestimmt. In beiden Fällen ergab sich auch hier eine Sensitivität von 500 fg. 50 fg wurde nicht in allen Fällen detektiert (Anh. 9, Anh. 10).

Bei Untersuchung einer Zell-Verdünnungsreihe von *L. brevis* (BS 40) in Bier konnte mit dem sLP600-System bis zu einer Keimdichte von $7 \cdot 10^2$ Zellen/ml ein positives PCR-Ergebnis erzielt werden (n = 3).

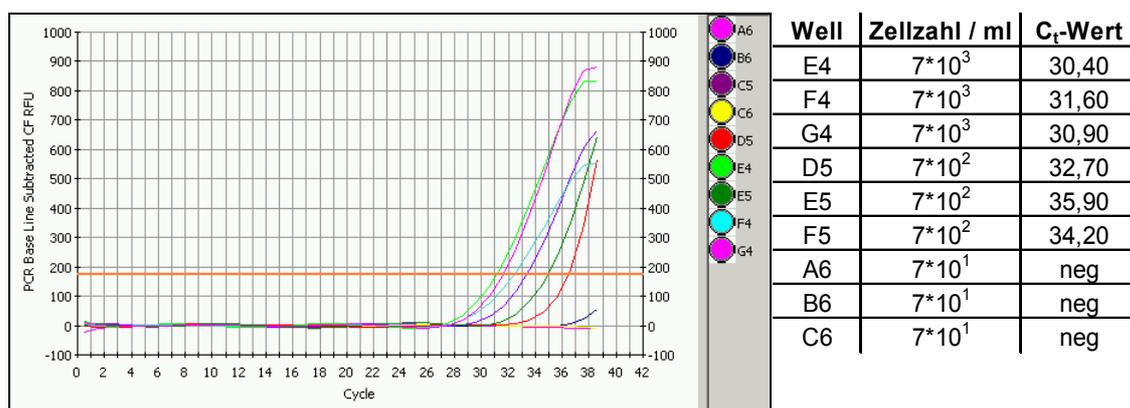


Abb. 33: Sensitivität des sLP600-Assays ohne IAC anhand einer *L. brevis*-Verdünnungsreihe (BS 40); $7 \cdot 10^3 - 7 \cdot 10^1$ Zellen/ml

Für *L. brevis* liegt die theoretisch notwendige Mindestzellzahl für ein positives PCR-Resultat bei etwa 80 Keimen (Formel 6).

Wie zu erwarten, lag die tatsächlich nachweisbare Zellzahl ($7 \cdot 10^2$) etwas über der Mindestzellzahl (80), was sich durch Verluste während der Probenverarbeitung erklären lässt. Im Gegensatz zu den Rein-DNA Testreihen ergaben sich durch die Einflüsse der Proben-

verarbeitung auch größere C_T -Wert Unterschiede innerhalb einer Verdünnungsstufe (Abb. 33). Alle weiteren Zell-Verdünnungsreihen zur Bestimmung der Sensitivität von PCR-Systemen befinden sich ebenfalls im Anhang.

6.1.1.3 sLP600 - Sensitivität und PCR-Effizienz mit IAC

Die IAC wurde dem PCR-Mix vor der PCR zugefügt (5.4). Bei Messung einer *L. brevis* DNA-Verdünnungsreihe ergab sich wiederum eine Sensitivität von 500 fg DNA und eine etwas niedrigere PCR-Effizienz von 89,2 % (Anh. 11).

Gleichzeitig konnte beobachtet werden, wie mit zunehmendem *L. brevis*-Signal eine Abschwächung des bei negativen oder schwach positiven Proben nahezu konstanten IAC-Signals erfolgte (Abb. 34). Diese Tendenz war bei allen folgenden Messungen, bei denen eine IAC verwendet wurde, zu beobachten, und wird an dieser Stelle daher exemplarisch dargestellt. Dieses IAC-Verhalten ist erwünscht, da die Indikation einer positiven IAC-Reaktion nur bei negativen PCR-Reaktionen eine Relevanz besitzt (RIJPENS und HERMAN 2002).

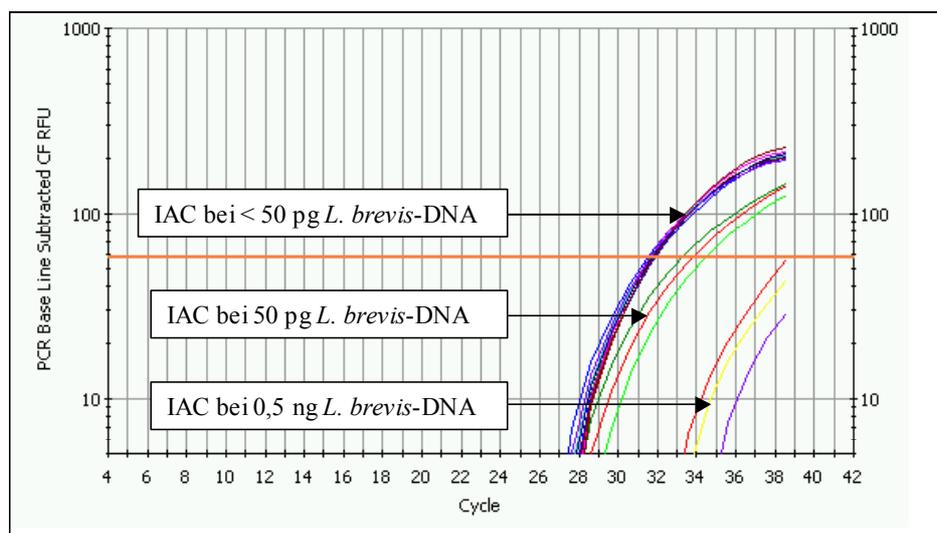


Abb. 34: Zusammenhang zwischen Stärke des IAC-Signals und eingesetzter Menge an Ziel-DNA (*L. brevis* BS 40)

Bei den *L. lindneri* und *L. plantarum* Verdünnungsreihen konnten die Nachweisgrenzen von 500 fg DNA bestätigt werden. Die PCR-Effizienzen betragen 90,5 bzw. 83,7 % (Anh. 12, Anh. 13).

Anhand der Verdünnungsreihe von *L. brevis* (BS 40) in Bier konnte mit einer Nachweisgrenze von $7 \cdot 10^2$ Zellen/ml eine identische Sensitivität zum sLP600-System ohne IAC ermittelt werden (Anh. 14).

Für dieses System konnte gezeigt werden, dass sich die Sensitivität des PCR-Systems bei Auswahl einer geeigneten IAC und bei optimaler Einstellung der IAC-Konzentration nicht oder nur minimal verschlechtert.

6.1.2 Identifizierungssysteme für Milchsäurebakterien

Für die am häufigsten in Bier bzw. in der Stufenkontrolle auftretenden Milchsäurebakterien, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. collinoides*, *L. paracollinoides*, *L. coryniformis*, *L. frigidus* (*L. parabuchneri*), *L. lindneri*, *L. perolens*, *L. plantarum* und *P. damnosus* wurden spezifische Nachweissysteme entwickelt. Jedes System besteht aus zwei Primern und einer Sonde (Tab. 12). Zum allgemeinen Design der Assays siehe Kapitel 3.1.

Die oben genannten Keime, ihre Eigenschaften sowie ihr Schädlichkeitspotential sind mit Ausnahme von *L. collinoides* bzw. *L. paracollinoides* und *L. perolens* hinlänglich beschrieben (BACK 1994; PRIEST und CAMPBELL 1996; SAKAMOTO und KONINGS 2003)

L. perolens trat bisher nicht als brauereirelevanter Schadkeim in Erscheinung. Während der Brauerei-Tests wurde er allerdings aus dem Umfeld einer Entalkoholisierungsanlage isoliert. Der Keim zeigte kein Wachstum im Bier der betreffenden Brauerei (alkoholfrei und alkoholhaltig), allerdings stellte sich in NBB-C + 95 % Bier und in Bier mit Bittereinheiten < 20 BE Wachstum ein. Der Keim wurde wegen seiner ausgeprägten Diacetylbildung daher als potentieller Schadkeim eingestuft und aufgrund der Häufigkeit an Befunden während der Brauerei-Tests in das Spektrum der Identifizierungsassays integriert.

Einige Laktobazillen, die erst in jüngerer Zeit aus Bier isoliert wurden und anfänglich *L. collinoides* zugerechnet wurden, konnten aufgrund molekularbiologischer Methoden vor kurzem exakt identifiziert und taxonomisch neu eingeordnet werden (FUNAHASHI et al. 1998; SUZUKI et al. 2004a, SUZUKI et al 2004b). Da *L. collinoides* nicht generell als bierschädlich eingestuft wird, die neuen Isolate aber hohes Wachstumspotential in Bier besitzen, wurden Zusammenhänge zwischen den Isolaten und *L. collinoides* auf Genomebene näher untersucht. Trotz 99 %-iger Übereinstimmung der 16S rDNA konnte im übrigen Genom nur eine Entsprechung von 46,8-57,6 % gefunden werden, weshalb für die neu isolierten bierschädlichen Keime die neue Spezies *L. paracollinoides* formuliert wurde (SUZUKI et al. 2004a). Im vorliegenden Fall wurde ein PCR-System zum Nachweis von *L. collinoides*/*L. paracollinoides* entwickelt.

6.1.2.1 Identifizierungsassays für Milchsäurebakterien - Reaktionsbedingungen und Spezifität

Die Reaktionskomponenten wurden gemäß Tab. 8 eingesetzt. Bei Temperaturgradienten-PCR lieferten alle Systeme bei Temperaturen zwischen 64 und 57°C nahezu identische

C_t-Werte. Um die Stringenz und die Polymeraseaktivität während der Elongation zu erhöhen, wurde das Temperaturprotokoll für die Identifizierungssysteme daher modifiziert (Tab. 38).

Tab. 38: Modifiziertes Temperaturprotokoll für Real-Time PCR

Temperatur / °C	Zweck	Zeit / sec	Zyklenzahl
95	Vordenaturierung der DNA in Einzelstränge; Aktivierung der Polymerase	780	1
95	Denaturierung	10	40
60	Annealing/Elongation	10	
63	Elongation	50	
15	Ende	∞	1

Mit Ausnahme der in Tab. 39 genannten Organismen wurde für alle anderen getesteten Keime (Tab. 36) kein PCR-Signal detektiert. Des Weiteren sind in Tab. 39 die Organismen genannt, die laut DNA-Alignment und BLAST theoretisch ein positives Ergebnis liefern müssten. Allerdings wurden diese Organismen in der Arbeit nicht getestet.

Tab. 39: Spezifität der Identifizierungsassays für Milchsäurebakterien

PCR-System	Positiv getestet	Nicht getestet; positiv zu erwarten gemäß BLAST
iLbr	<i>L. brevis</i> (1-4), <i>L. brevisimilis</i>	---
iLbu	<i>L. buchneri</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>L. kefir</i>	<i>L. ferintoshensis</i> , <i>L. parakefir</i>
iLca	<i>L. casei</i> (1+2), <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. zeae</i>
iLcol	<i>L. collinoides</i> , <i>L. paracollinoides</i>	---
iLcor	<i>L. coryniformis</i> (1+2)	---
iLli	<i>L. lindneri</i> (1-3)	---
iLpe	<i>L. perolens</i> (1+2)	---
iLpl	<i>L. plantarum</i> (1+2)	<i>L. paraplantarum</i> , <i>L. pentosus</i>
iPda	<i>P. damnosus</i> (1+2)	---

Anhand der erzielten PCR-Ergebnisse und der BLAST-Analyse stellten sich die Systeme iLbr, iLcor, iLli, iLpe und iPda als hochspezifisch für die jeweiligen Zielkeime dar. Bei den Assays, iLbu, iLca, iLcol und iLpl wurden eng verwandte Milchsäurebakterien miterfasst, die aufgrund der 16S rDNA nicht oder nur schwer zu differenzieren sind (Tab. 39).

Beim iLca-System ist anzumerken, dass die Taxonomie innerhalb der *L. casei*-Gruppe (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. zeae*) umstritten ist. Im Verlauf der letzten Jahre erfolgten zahlreiche Modifikationen und Vorschläge für Neuordnungen, die aber nur zum Teil akzeptiert wurden. So galten *L. rhamnosus* und *L. zeae* früher als Subspezies von *L. casei*, während sie jetzt als getrennte Spezies behandelt werden (DICKS et al. 1996). Alle vier Keime weisen auf Basis der 16S rDNA-Analyse eine sehr hohe Homologie untereinander auf (max. 19 variable Positionen in 1520 Basen) (FELIS et al. 2001). Mit dem ent-

wickelten Assay war daher eine Abgrenzung der einzelnen Spezies im Gegensatz zu den von WARD und TIMMINS (1999) entwickelten Primern nicht möglich und aufgrund der unklaren Nomenklatur auch nicht beabsichtigt. Vielmehr wird mit dem iLca-Assay die gesamte *L. casei*-Gruppe erfasst.

Ähnliches gilt für die *L. plantarum*-Gruppe, die aus *L. plantarum*, *L. paraplantarum* und *L. pentosus* besteht (TORRIANI et al. 2001) und für die *L. buchneri*-Gruppe, der *L. buchneri*, *L. parabuchneri*, *L. kefiri*, *L. parakefiri* und *L. ferintoshensis* zugeordnet werden (SIMPSON et al. 2001). Aufgrund der 16S rDNA ergeben sich kaum Unterscheidungsmöglichkeiten, weshalb wiederum die gesamten Gruppen erfasst werden sollten.

6.1.2.2 Identifizierungsassays für Milchsäurebakterien - Sensitivität und PCR Effizienz

Für die Identifizierungen wurden folgende Sensitivitäten anhand von Rein-DNA und Zell-Verdünnungsreihen ermittelt (Tab. 40). Die Darstellungen der Messreihen sowie Daten über PCR-Effizienz, Slope und lineare Korrelationskoeffizienten sind dem Anhang zu entnehmen (Anh. 15-Anh. 32).

Tab. 40: Sensitivitäten der PCR-Identifizierungsassays für Milchsäurebakterien; Angabe der Nachweisgrenze in pg DNA und Zellen/ml

PCR-System / Testkeim	Sensitivität [pg DNA]	Sensitivität (Zellen/ml)	Theoretisch notwendige Mindestzellzahl (Formel 6)
iLbr / <i>L. brevis</i>	1	$3 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^2$
iLbu / <i>L. parabuchneri</i>	1	$4 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^2$
iLca / <i>L. casei</i>	0,5	$2 \cdot 10^3$	$0,5 \cdot 10^2$
iLcol / <i>L. paracollinoides</i>	0,5	$1 \cdot 10^3$	$0,5 \cdot 10^2$
iLcor / <i>L. coryniformis</i>	0,5	$8 \cdot 10^2$	$0,5 \cdot 10^2$
iLli / <i>L. lindneri</i>	0,5	$1 \cdot 10^3$	$0,5 \cdot 10^2$
iLpe / <i>L. perolens</i>	1	$4 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^2$
iLpl / <i>L. plantarum</i>	1	$2 \cdot 10^3$	$0,6 \cdot 10^2$
iPda / <i>P. damnosus</i>	2	$5 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^2$

6.1.3 sPM – Screening-System zum Nachweis von *Pectinatus* spp. und *Megasphaera cerevisiae*

Die gram-negativen obligaten Bierschädlinge *Pectinatus* spp. und *Megasphaera cerevisiae* können aufgrund ihrer Stoffwechselprodukte (z. B. Propionsäure, H₂S) zur Ungenießbarkeit des Produktes führen. Die bisher existierenden Assays ermöglichen einen getrennten Nachweis von *Pectinatus* spp. und *Megasphaera cerevisiae*. Da bisher jedoch alle Isolate dieser Spezies Wachstum in Bier aufweisen (SAKAMOTO und KONINGS 2003), wurde ein gruppenspezifischer Nachweis entwickelt, der eine simultane Detektion beider Keime ermöglichen soll. Mit dem gewählten System sollte zusätzlich noch *Seleno-*

monas lactificex erfasst werden. Dieser bewegliche, strikt anaerobe Keim ähnelt morphologisch *Pectinatus* spp., trat bisher in Brauereien allerdings kaum in Erscheinung und ist noch nicht eingehender erforscht (PRIEST und CAMPBELL 1996). Da *Selenomonas lactificex* jedoch ebenfalls Propionsäure erzeugt, wurde der Keim in das sPM-System integriert.

6.1.3.1 sPM – Reaktionsbedingungen und Spezifität

Alle Reaktionskomponenten wurden gemäß Tab. 8 verwendet. Mittels Gradienten-PCR wurde eine optimale Annealingtemperatur von 60-63 °C bestimmt, weshalb für alle weiteren Versuche das modifizierte Temperaturprotokoll (Tab. 38) gewählt wurde.

Bei den Untersuchungen zur Spezifität wurden *Pectinatus frisingensis*, *Pectinatus cerevisiophilus*, *Pectinatus* sp., *Megasphaera cerevisiae* (1+2) und *Selenomonas lactificex* positiv getestet. Alle anderen DNA-Isolate aus Tab. 36 wurden negativ getestet. Die erzielten Ergebnisse stimmten mit den erwarteten Ergebnissen des DNA-Alignments und der BLAST-Analyse überein.

6.1.3.2 sPM - Sensitivität und PCR-Effizienz ohne IAC

Für das sPM-Assay wurde eine Sensitivität von 0,5 pg DNA bzw. $8 \cdot 10^2$ Zellen/ml festgestellt (Anh. 33, Anh. 34). Die Untersuchung erfolgte mit DNA und Zellen von *Pectinatus frisingensis* (BS 42). Mit *Megasphaera cerevisiae* und *Selenomonas lactificex* wurden keine Sensitivitätsversuche durchgeführt, da alle Keime an den Primer- und Sondenbindstellen identische Sequenzen aufwiesen.

6.1.4 sLPPM – Multiplex Screening-System für bierschädliche Bakterien

Aufbauend auf den bisherigen Ergebnissen wurde ein Multiplex-Assay getestet, bei dem das sLP600- und das sPM-System zusammen mit der in 5.4 erwähnten IAC (Ctr-Assay) kombiniert wurden. Somit sollte der simultane Nachweis von bierschädlichen Milchsäurebakterien (FAM) sowie *Pectinatus* spp. und *Megasphaera cerevisiae* (ROX) ermöglicht werden. Die Detektion der IAC erfolgte auf dem HEX-Kanal.

6.1.4.1 sLPPM – Reaktionsbedingungen und Spezifität

Der Einsatz der Reaktionskomponenten erfolgte gemäß Tab. 8. Als Temperaturprotokoll wurde das „2-Step“ Programm verwendet (Tab. 9).

Die Spezifitätsuntersuchungen des Multiplex-Systems ergaben im Vergleich zu den Ein-

zel-PCR Assays (sLP600 und sPM) identische Ergebnisse.

6.1.4.2 sLPPM - Sensitivität und PCR-Effizienz mit IAC

Die Sensitivität des sLPPM-Assays wie auch der folgenden Multiplexsysteme wurde anhand von Rein-DNA überprüft und mit den Sensitivitäten der jeweiligen Einzelassays verglichen. Ein Vergleich mit Zell-Verdünnungsreihen erfolgte hier nicht.

Für das sLPPM-Assay wurde eine Sensitivität von 0,5 pg DNA für *L. brevis*-DNA (Anh. 35) und von 0,5 pg für *Pectinatus frisingensis*-DNA festgestellt (Anh. 36). Die Sensitivität des kombinierten Systems (mit IAC) entsprach somit den Sensitivitäten der Einzelsysteme (mit IAC).

6.1.5 iLbcp – Multiplexsystem zum Nachweis von *L. brevis*, *L. casei* und *P. damnosus*

Wie in 3.1 erwähnt, sollte durch die Verwendung eines universellen Rückwärtsprimers und einer universellen Sonde die Synthese mehrerer Identifizierungsassays zu einem genau definierten und begrenzten Screening-System ermöglicht werden. Im vorliegenden Fall wurden die Systeme iLbr, iLca und iPda kombiniert und mit einer internen Amplifikationkontrolle (Ctr) versehen, die bei HEX detektiert wurde. Das Detektionssystem (FAM) bestand aus den jeweiligen spezifischen Vorwärtsprimern (Lbr-f, Lca-f, Pda-f), der Sonde i200 und dem Rückwärtsprimer sLP-r.

6.1.5.1 iLbcp – Reaktionsbedingungen und Spezifität

Der Einsatz der Reaktionskomponenten erfolgte gemäß Tab. 8. Als Temperaturprotokoll wurde das modifizierte Programm verwendet (Tab. 38).

Die Spezifitätsuntersuchungen des Multiplex-Systems ergaben identische Ergebnisse im Vergleich zu den Einzel-PCR Assays (iLbr, iLca und iPda).

Ein positiver Befund bei dem iLbcp-System bedeutet, dass das positive Signal von einem der drei möglichen Keime verursacht wurde. Im Spurenbereich wäre somit keine Abgrenzung möglich. Bei Zelldichten, die eine zusätzliche mikroskopische Absicherung ermöglichen, kann hier mit großer Wahrscheinlichkeit der betreffende Keim zugeordnet werden, da sich die drei Bakterien morphologisch gut unterscheiden lassen. Zur definitiven Absicherung wäre dennoch eine Identifizierungs-PCR nötig.

6.1.5.2 iLbcp – Sensitivität und PCR-Effizienz mit IAC

Für das iLbcp-Assay wurde eine Sensitivität von 1 pg DNA für *L. brevis*-DNA (Anh. 37)

und von 1 pg für *L. casei*-DNA (Anh. 38) festgestellt. Diese Werte sind trotz IAC nur geringfügig schlechter als bei den Einzelsystemen ohne IAC. Bei *P. damnosus* war die letzte mit Sicherheit detektierte Stufe 20 pg DNA. Bei 2 pg wurde nur bei einer Probe ein positives Ergebnis erreicht. Die tatsächliche Nachweisgrenze dürfte somit zwischen 20 und 2 pg DNA liegen, was einer leichten Verschlechterung gegenüber dem iLca-Assay ohne IAC gleichkommt (2 pg).

6.2 PCR-Assays zum Nachweis von Hefen

Zum PCR-Nachweis von Hefen wurden gruppen- und speziesspezifische Real-Time PCR Assays zur Differenzierung von Brauhefen und zum Nachweis bierschädlicher Fremdhefen entwickelt.

Die Ermittlung der Sensitivitäten bei den Einzelsystemen erfolgte ohne IAC. Beim Multiplexassay sSdD (6.2.6) wurde die in 5.4 beschriebene IAC integriert.

6.2.1 Sce – Nachweis von *S. cerevisiae*

Das Sce-System dient der Detektion von *S. cerevisiae*, wobei sich der Begriff hier nicht ausschließlich auf obergärige Brauhefen beschränkt. Gemäß der vorliegenden Sequenzen werden ober- und untergärige Brauhefen sowie Varietäten von *S. cerevisiae*, z. B. *S. diastaticus* erfasst (3.2.1). Beide Primer und die Sonde sind in der ITS1-Region lokalisiert.

6.2.1.1 Sce - Reaktionsbedingungen und Spezifität

Die Reaktionskomponenten wurden gemäß Tab. 8 verwendet. Mittels Gradienten-PCR wurde eine optimale Annealingtemperatur von 58-60 °C bestimmt, weshalb für alle weiteren Versuche das in Tab. 9 beschriebene Temperaturprotokoll gewählt wurde.

Bei der Untersuchung der Rein-DNA Isolate (Tab. 3, Tab. 4) wurden folgende Resultate erzielt (Tab. 41).

Tab. 41: Spezifität des Sce-Assays

PCR-Ergebnis	Getestete Organismen			
Positiv (Hefe-DNA)	<i>S. cerevisiae</i> WHB 68, 127, 175, 148, 184, 165, 177, 208, 210, 213, DSM 70449			
	<i>S. cerevisiae</i> var. <i>carlsbergensis</i> WHB 26, 34/70, 34/78, 44, 54, 88, 120, 122, 128, 168, 176, 194, 66, 71, 170			
	<i>S. cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i> (1-3)	<i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>	<i>S. paradoxus</i>	
Negativ (Hefe-DNA)	<i>Candida boidinii</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida tropicalis</i> (1+2)	<i>Candida sake</i>
	<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Debaromyces hansenii</i>	<i>Dekkera anomala</i> (1-3)
	<i>Dekkera bruxellensis</i> (1-3)	<i>Dekkera naardensis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>
	<i>Pichia anomala</i> (1-4)	<i>Pichia membranefaciens</i> (1-3)	<i>Rhodotorula rubra</i>	<i>S. bayanus</i> (1-4)
	<i>S. dairensis</i>	<i>S. exiguus</i>	<i>S. kluyveri</i>	<i>S. pastorianus</i> (1+2)
	<i>S. uvarum</i>	<i>Saccharomyces ludwigii</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Torulasporea delbrueckii</i>
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (1-3)	<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (1-3)	
Positiv (Bakterien-DNA)	---			
Negativ (Bakterien-DNA)	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Gluconobacter oxidans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>L. brevis</i> (1-4)
	<i>L. casei</i> (1+2)	<i>L. coryniformis</i> (1+2)	<i>L. parabuchneri</i>	<i>L. perolens</i> (1+2)
	<i>L. plantarum</i> (1+2)	<i>Megasphaera cerevisiae</i> (1+2)	<i>Pectinatus frisingensis</i>	<i>P. damnosus</i> (1+2)

Die mittels PCR erzielten Ergebnisse entsprachen den erwarteten Ergebnissen des DNA-Alignments und der *BLAST*-Analyse.

Das Sce-System ermöglicht den spezifischen Nachweis ober- und untergäriger Brauhefen, *S. cerevisiae*-Varietäten sowie *S. paradoxus*. Untergärige Typstämme von *S. bayanus*, *S. pastorianus* und *S. uvarum* werden nicht detektiert.

6.2.1.2 Sce – Sensitivität und PCR-Effizienz

Unter den oben genannten Reaktionsbedingungen konnte mit dem Sce-Assay Rein-DNA (WHB 68) bis zu einer Menge von 500 fg detektiert werden (Anh. 40).

Bei Untersuchung einer Zell-Verdünnungsreihe von *S. cerevisiae* (WHB 68) in Bier konnte mit dem Sce-System bis zu einer Keimdichte von $4 \cdot 10^3$ Zellen/ml ein positives PCR-Ergebnis erzielt werden ($n = 3$)(Anh. 41).

6.2.2 Sbp – Nachweis von *S. bayanus* und *S. pastorianus*

Mit dem Sbp-System sollte die spezifische Detektion von *S. bayanus* und *S. pastorianus* ermöglicht werden. Beide Primer und die Sonde sind in der ITS1-Region angeordnet. Anhand der ITS1-Sequenzdaten der Brauhefen war zu erwarten, dass mit dem Sbp-Assay eine Abgrenzung zwischen untergärigen Kulturhefen und *S. pastorianus*/*S. bayanus* Typstämmen möglich ist (3.2.1, Abb. 4).

6.2.2.1 Sbp - Reaktionsbedingungen und Spezifität

Die Reaktionskomponenten wurden gemäß Tab. 8 verwendet. Mittels Gradienten-PCR wurde eine optimale Annealingtemperatur von 58-60 °C bestimmt, weshalb für alle weiteren Versuche das in Tab. 9 beschriebene Temperaturprotokoll gewählt wurde.

Bei der Untersuchung der Rein-DNA Isolate (Tab. 3, Tab. 4) wurden folgende Resultate erzielt (Tab. 42).

Tab. 42: Spezifität des Sbp-Assays

PCR-Ergebnis	Getestete Organismen			
Positiv (Hefe-DNA)	<i>S. cerevisiae</i> var. <i>carlsbergensis</i> WHB 26, 34/70, 34/78, 44, 54, 88, 120, 122, 128, 168, 176, 194, 66, 71, 170			
	<i>S. bayanus</i> (1-4)	<i>S. pastorianus</i> (1+2)	<i>S. uvarum</i>	
Negativ (Hefe-DNA)	<i>S. cerevisiae</i> WHB 68, 127, 175, 148, 184, 165, 177, 208, 210, 213, DSM 70449			
	<i>Candida boidinii</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida tropicalis</i> (1+2)	<i>Candida sake</i>
	<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Debaromyces hanse-nii</i>	<i>Dekkera anomala</i> (1-3)
	<i>Dekkera bruxellensis</i> (1-3)	<i>Dekkera naardenen-sis</i>	<i>Kluyveromyces mar-xianus</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>
	<i>Pichia anomala</i> (1-4)	<i>Pichia membranefa-ciens</i> (1-3)	<i>Rhodotorula rubra</i>	<i>S. cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i> (1-3)
	<i>S. dairensis</i>	<i>S. ellipsoideus</i>	<i>S. exiguus</i>	<i>S. kluyveri</i>
	<i>S. paradoxus</i>	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Torulaspota del-brueckii</i>
	<i>Zygosaccharomyces baillii</i> (1-3)	<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (1-3)	
	Positiv (Bakterien-DNA)	---		
Negativ (Bakterien-DNA)	<i>Acetobacter pasteu-rianus</i>	<i>Gluconobacter oxi-dans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>L. brevis</i> (1-4)
	<i>L. casei</i> (1+2)	<i>L. coryniformis</i> (1+2)	<i>L. parabuchneri</i>	<i>L. perolens</i> (1+2)
	<i>L. plantarum</i> (1+2)	<i>Megasphaera cerevi-siae</i> (1+2)	<i>Pectinatus frisingensis</i>	<i>P. damnosus</i> (1+2)

Bis auf die untergärigen Brauhefen ergaben sich die erwarteten Resultate. Die Tatsache, dass alle untergärigen Brauhefen positiv getestet wurden, bekräftigt die Theorie, dass die untergärigen Brauhefen ein Hybrid aus *S. cerevisiae* und *S. bayanus*/*S. pastorianus* darstellen.

Allerdings ist der *S. pastorianus*/*S. bayanus*-Anteil in den untergärigen Brauhefen schwächer ausgeprägt. Beim Vergleich identischer Mengen gDNA-Mengen (3 ng) von *S. bayanus*/*S. pastorianus* und Brauhefen ergaben sich von den Brauhefen immer schwächere Signale, wodurch sich anhand der C_T -Werte zwei Gruppen ausbildeten (Abb. 35). Eine Zuordnung untergäriger Reinkulturen in eine der beiden Gruppen ist somit möglich und lässt erste Rückschlüsse auf die taxonomische Stellung zu.

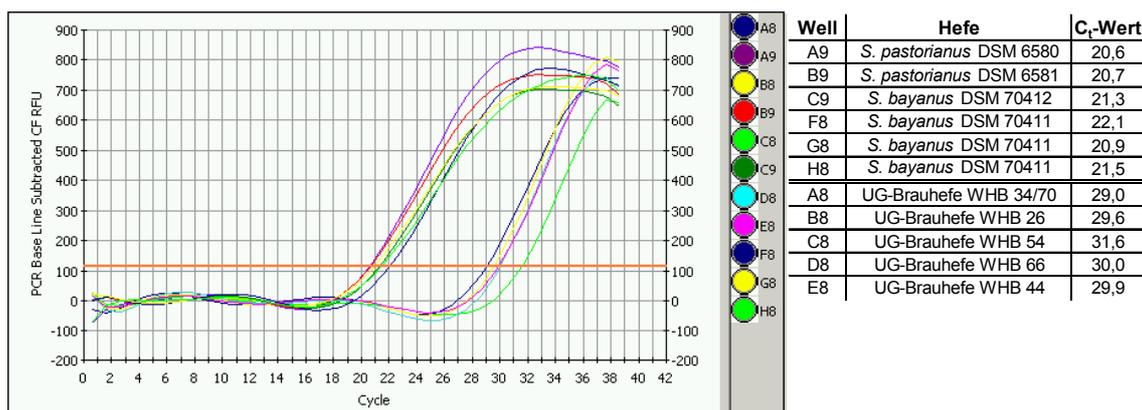


Abb. 35: Vergleich der PCR C_t-Werte von *S. bayanus*/*S. pastorianus* und untergäriger Brauhefen bei Verwendung des Sbp-Assays

6.2.2.2 Sbp – Sensitivität und PCR-Effizienz

Unter den oben genannten Reaktionsbedingungen konnte mit dem Sbp-Assay Rein-DNA (*S. bayanus* DSM 70412) bis zu einer Menge von 500 fg detektiert werden (Anh. 42).

Bei Untersuchung einer Zell-Verdünnungsreihe von *S. bayanus* (DSM 70412) in Bier konnte mit dem Sbp-System bis zu einer Keimdichte von $4 \cdot 10^3$ Zellen/ml ein positives PCR-Ergebnis erzielt werden ($n = 3$) (Anh. 43).

6.2.3 UG300 – Nachweis untergäriger Brauhefen

Das UG300-System dient zum Nachweis untergäriger Brauhefen (SCHERER 2002, 3.2.2). Bei der Entwicklung des Assays wurden untergärige Brauhefen sowie *S. pastorianus* erfasst. *S. bayanus* (DSM 70412) wurde negativ getestet. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob mit dem UG300-System auch weitere *S. bayanus*-Stämme negativ reagieren und somit eine Abgrenzung zwischen *S. bayanus* und *S. pastorianus* sowie untergärigen Brauhefen möglich ist.

6.2.3.1 UG300 - Reaktionsbedingungen und Spezifität

Die Reaktionskomponenten wurden gemäß Tab. 8 verwendet. Mittels Gradienten-PCR wurde eine optimale Annealingtemperatur von 58-60 °C bestimmt, weshalb für alle weiteren Versuche das in Tab. 9 beschriebene Temperaturprotokoll gewählt wurde.

Bei den Spezifitätsuntersuchungen ergaben sich bis auf drei Hefen die gleichen Resultate wie beim Sbp-System (Tab. 42). Die *S. bayanus*-Stämme DSM 70412 und DSM 70547 sowie *S. uvarum* wurden nicht detektiert. Allerdings lieferten die *S. bayanus*-Stämme DSM 70411 und 70508 ein positives Ergebnis. Aufgrund dieser Ergebnisse ist auch mit dem UG300-Assay keine eindeutige Abgrenzung zwischen *S. bayanus* und *S. pastoria-*

nus möglich.

6.2.3.2 UG300 – Sensitivität und PCR-Effizienz

Unter den oben genannten Reaktionsbedingungen konnte mit dem UG300-Assay Rein-DNA (WHB 34/70) bis zu einer Menge von 1 pg detektiert werden (Anh. 44).

Bei Untersuchung einer Zell-Verdünnungsreihe von *S. cerevisiae* var. *carlsbergensis* (WHB 34/70) in Bier, wurde mit dem UG-System bis zu einer Keimdichte von $6 \cdot 10^3$ Zellen/ml ein positives PCR-Ergebnis erzielt (Anh. 45, n = 3).

6.2.4 Sdi – Nachweis von *S. diastaticus*

Das Sdi-System soll den spezifischen Nachweis von *S. diastaticus* ermöglichen. Die Detektion beruht auf dem für *S. diastaticus* spezifischen *sta1*-Gen, welches für eine extrazelluläre Glucoamylase codiert (3.2.3).

6.2.4.1 Sdi - Reaktionsbedingungen und Spezifität

Die Reaktionskomponenten wurden gemäß Tab. 8 verwendet. Mittels Gradienten-PCR wurde eine optimale Annealingtemperatur von 60 °C bestimmt, weshalb für alle weiteren Versuche das beschriebene Temperaturprotokoll (Tab. 9) gewählt wurde.

6.2.4.2 Sdi - Sensitivität und PCR-Effizienz

Unter den oben genannten Reaktionsbedingungen konnte mit dem Sdi-Assay Rein-DNA (*S. diastaticus* DSM 70487) bis zu einer Menge von 1 pg detektiert werden (Anh. 46).

Bei Untersuchung einer Zell-Verdünnungsreihe von *S. diastaticus* (DSM 70487) in Bier wurde mit dem Sdi-System bis zu einer Keimdichte von $5 \cdot 10^3$ Zellen/ml ein positives PCR-Ergebnis erzielt (Anh. 47, n=3).

6.2.5 Identifizierungssysteme für Nicht-*Saccharomyces* Hefen

Für einige häufig in Brauereien auftretende Nicht *Saccharomyces*-Fremdhefen (NS-FH) wurden spezifische Nachweissysteme getestet. Jedes System besteht aus zwei Primern und einer Sonde (Tab. 14). Zum allgemeinen Design der Assays siehe Kapitel 3.2.

Die NS-FH umfassen eine sehr umfangreiche und heterogene Gruppe, und das Schädlichkeitspotential von NS-FH ist sehr unterschiedlich zu bewerten. Details zur physiologischen Charakterisierung der im Anschluss erwähnten NS-FH sind in der zitierten Literatur nachzulesen (BACK 1994, PRIEST und CAMPBELL 1996, EIDTMANN et al. 1998).

Im einzelnen wurden Identifizierungs-Assays für *Candida tropicalis*, *Dekkera anomala*, *Dekkera bruxellensis*, *Pichia anomala*, *Pichia membranefaciens*, *Saccharomyces ludwigii* und *Saccharomyces exiguus* entwickelt.

6.2.5.1 Identifizierungsassays für NS-FH - Reaktionsbedingungen und Spezifität

Die Reaktionskomponenten wurden gemäß Tab. 8 verwendet. Mittels Gradienten-PCR wurde für alle Systeme eine optimale Annealingtemperatur von 58-60°C bestimmt, weshalb für alle weiteren Versuche das oben beschriebene Temperaturprotokoll (Tab. 9) gewählt wurde.

Jedes der getesteten PCR-Systeme erwies sich als hochspezifisch für den jeweiligen Keim (Tab. 43). Kreuzreaktionen mit anderen Hefen oder Bakterien (Tab. 41) wurden nicht beobachtet. Die BLAST-Analyse ergab ebenfalls keine zu erwartenden Kreuzreaktionen mit Nicht-Zielkeimen.

Tab. 43: Spezifität der Identifizierungsassays für NS-FH

PCR-System	Positiv getestet	Positiv zu erwarten gemäß BLAST-Analyse
Ctr	<i>Candida tropicalis</i> (1+2)	---
Dan	<i>Dekkera naomala</i> (1-3)	---
Dbr	<i>Dekkera bruxellensis</i> (1-3)	---
Pan	<i>Pichia anomala</i> (1-4)	---
Pme	<i>Pichia membranefaciens</i> (1-3)	---
Slu	<i>Saccharomyces ludwigii</i>	---
Sx	<i>Saccharomyces exiguus</i>	---

6.2.5.2 Identifizierungsassays für NS-FH - Sensitivität und PCR-Effizienz

Für die Identifizierungsassays wurden folgende Sensitivitäten mit Rein-DNA und Zell-Verdünnungsreihen ermittelt (Tab. 44). Die Darstellungen der Messreihen sowie Daten über PCR-Effizienz, Slope und das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression sind dem Anhang zu entnehmen (Anh. 48-Anh. 61). Die Tests wurden ohne IAC durchgeführt.

Tab. 44: Sensitivitäten der PCR-Identifizierungsassays für NS-FH; Angabe der Nachweisgrenze in pg DNA und Zellen/ml

PCR-System / Testkeim	Sensitivität [pg DNA]	Sensitivität (Zellen/ml)
Ctr / <i>Candida tropicalis</i>	0,5	$2 \cdot 10^3$
Dan / <i>Dekkera anomala</i>	0,5	$9 \cdot 10^2$
Dbr / <i>Dekkera bruxellensis</i>	1	$5 \cdot 10^3$
Pan / <i>Pichia anomala</i>	0,5	$8 \cdot 10^2$
Pme / <i>Pichia membranefaciens</i>	0,1	$6 \cdot 10^2$
Slu / <i>Saccharomyces ludwigii</i>	0,1	$2 \cdot 10^3$
Sx / <i>Saccharomyces exiguus</i>	0,5	$2 \cdot 10^3$

6.2.6 sSdD – Multiplex-System zum Nachweis von *S. diastaticus* und *Dekkera* spp.

Analog zu den Bakterien wurde auch hier durch Kombination von Einzelidentifizierungen ein Multiplex-System zum simultanen Nachweis von *S. diastaticus*, *Dekkera anomala* und *Dekkera bruxellensis* erprobt.

Die Detektion von *S. diastaticus* erfolgte bei FAM, *Dekkera* spp. wurden bei HEX gemessen. Zusätzlich wurde eine IAC (sPM) eingefügt, die auf dem ROX-Kanal erfasst wurde (5.4).

6.2.6.1 sSdD - Reaktionsbedingungen und Spezifität

Der Einsatz der Reaktionskomponenten erfolgte gemäß Tab. 8. Als Temperaturprotokoll wurde das in Tab. 9 dargestellte Programm verwendet

Die Spezifitätsuntersuchungen des Multiplex-Systems ergaben im Vergleich zu den Einzel-PCR Assays (Sdi, Dan, Dbr) identische Ergebnisse.

6.2.6.2 sSdD - Sensitivität und PCR-Effizienz

Die Sensitivität des sSdD wurde mit Rein-DNA der jeweiligen Hefen getestet. Es ergaben sich für das Multiplex-System mit IAC vergleichbare Effizienzen und Sensitivitäten wie für die Einzelsysteme im Bereich von 1-0,5 pg DNA (Anh. 62-Anh. 64). Eine Kombination verschiedener Assays mit einer gleichzeitigen Integration einer IAC (C_t -Wert $32 \pm 0,5$) resultierte auch hier nicht in einer Sensitivitätsverschlechterung.

7 Umsetzung der PCR-Analytik in Brauereien

Im Rahmen des EU-Projektes BREWPROC (QLK-CT-2000-01251) wurden die in der Research-Phase entwickelten PCR-Methoden in fünf europäischen Brauereien (Brauerei 1-5) mit Proben aus der Produktion getestet.

7.1 Material und Methoden

Im Folgenden sind die während der beiden Testphasen verwendeten Materialien und Methoden aufgeführt. Zum Teil erfolgte die Methodenentwicklung während der Research-Phase. Die entsprechenden Methoden sind oben beschrieben und mit Querverweisen gekennzeichnet.

7.1.1 Verwendete PCR-Geräte und PCR-Assays

Die Versuche in den Betrieben waren zeitlich in zwei Phasen unterteilt, in denen von den teilnehmenden Partnern folgende PCR-Formate verwendet wurden (Tab. 45, Tab. 46).

Tab. 45: Verwendete PCR-Formate in Phase 1

Brauerei	Real-Time PCR Standard-PCR	PCR-Gerät	Elektrophorese
1	Standard-PCR	PTC 200, MJ Research	Agarosegel ¹⁾
2	Real-Time PCR	ABI Prism 7000, Applied Biosystems	Nein
3	Real-Time PCR	LightCycler 1.0, Roche	Nein
4	Real-Time PCR	LightCycler 1.0, Roche	Nein
5	Standard-PCR	PTC 200, MJ Research	Polyacrylamidgel ²⁾

¹⁾ Elektrophoresebedingungen wie unter 2.11 beschrieben

²⁾ Elektrophoresebedingungen und Anfärbung der Polyacrylamidgele siehe SCHERER (2003)

In Phase 2 wurde in allen Brauereien ausschließlich Real-Time PCR angewendet (Tab. 46).

Tab. 46: Verwendete PCR-Formate in Phase 2

Brauerei	Real-Time PCR Standard-PCR	PCR-Gerät	Elektrophorese
1	Real-Time PCR	ABI Prism 7000, Applied Biosystems	Nein
2	Real-Time PCR	ABI Prism 7000, Applied Biosystems	Nein
3	Real-Time PCR	LightCycler 1.0, Roche	Nein
4	Real-Time PCR	LightCycler 1.0, Roche	Nein
5	Real-Time PCR	ABI Prism 7000, Applied Biosystems	Nein

Während der beiden Testphasen wurden in den Brauereien die in Tab. 47 dargestellten PCR-Assays verwendet. Die zugrundeliegenden Sequenzen für die in den Brauerei-Tests eingesetzten Kits stammen von VTT Biotechnology und PIKA Weihenstephan GmbH und können an dieser Stelle nicht veröffentlicht werden. Die Produktion und Bereitstellung der PCR-Kits erfolgte durch PIKA Weihenstephan GmbH.

Tab. 47: Verwendete PCR-Kits während der Brauerei-Tests

Name des Kits	Detektierte Organismen	IAC / EAC	Probenart	Verwendet von Brauerei Phase 1/Phase 2
EU STD Tr Screening Filter Lactos D	<i>Lactobacillus</i> und <i>Pediococcus</i> spp, ohne Würzesäurer	EAC	filtrierbar	Brauerei 5 Phase 1
EU STD Tr Screening Filter Lactos gen	<i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> and <i>Weissella</i> spp.	EAC	filtrierbar	Brauerei 1 Phase 1
EU STD Screening additional strictly anaerobics	<i>Megasphaera</i> , <i>Pectinatus</i> , <i>Selenomonas</i> und <i>Zymophilus</i> spp.	EAC	filtrierbar	Brauereien 1+5 Phase 1
EU STD Tr Ident <i>L. brevis</i> & <i>L. lindneri</i> (IPC):	Identifizierung von <i>L. brevis</i> und <i>L. lindneri</i>	IAC	Nach Screening oder für sichtbar trübe Proben	Brauereien 1+5 Phase 1
EU STD Tr Ident <i>Megasphaera</i> + <i>Pectinatus</i> (IPC)	Identifizierung von <i>Megasphaera</i> und <i>Pectinatus</i> spp.	IAC	Nach Screening oder für sichtbar trübe Proben	Brauereien 1+5 Phase 1
EU STD Tr Identification Lactos (IPC)	Identifizierung von <i>L. brevis</i> , <i>casei</i> , <i>coryniformis</i> , " <i>frigidus</i> ", <i>lindneri</i> , <i>perolens</i> , <i>plantarum</i> und <i>P. damnosus</i>	IAC	Nach Screening oder für sichtbar trübe Proben	Brauerei 5 Phase 1
EU LC Screening Lactos (IPC)	Nachweis von <i>L. brevis</i> , <i>casei</i> , <i>coryniformis</i> , " <i>frigidus</i> ", <i>lindneri</i> , <i>perolens</i> , <i>plantarum</i> und <i>P. damnosus</i>	EAC und IAC	filtrierbare oder unfiltrierbare Proben; je nach Ausstattung für DNA-Isolation	Brauereien 3+4 Phase 1+2
EU LC <i>Megasphaera</i> & <i>Pectinatus</i> (IPC)	Identifizierung von <i>Megasphaera</i> , <i>Pectinatus</i> spp.	IAC	Nach Screening oder für sichtbar trübe Proben	Brauereien 3+4 Phase 1+2
EU TM Tr Screening Lactos (IPC)	Nachweis von <i>L. brevis</i> , <i>casei</i> , <i>coryniformis</i> , " <i>frigidus</i> ", <i>lindneri</i> , <i>perolens</i> , <i>plantarum</i> und <i>P. damnosus</i>	IAC	filtrierbare oder unfiltrierbare Proben; je nach Ausstattung für DNA-Isolation	Brauerei 2 Phase 1+2 Brauereien 1+5 Phase 2
EU TM Tr Identification Lactos (IPC)	Identifizierung von <i>L. brevis</i> , <i>casei</i> , <i>coryniformis</i> , " <i>frigidus</i> ", <i>lindneri</i> , <i>perolens</i> , <i>plantarum</i> und <i>P. damnosus</i>	IAC	Nach Screening oder für sichtbar trübe Proben	Brauerei 2 Phase 1+2 Brauereien 1+5 Phase 2
EU TM Tr Ident <i>Megasphaera</i> & <i>Pectinatus</i> (IPC)	Identification of <i>Megasphaera</i> and <i>Pectinatus</i>	IAC	Nach Screening oder für sichtbar trübe Proben	Brauerei 2 Phase 1+2

7.1.2 Versuchsplan Phase 1

In Phase 1 wurden Proben aus dem Filtratbereich untersucht. Zielorganismen waren obligat und potentiell bierschädliche Bakterien. Die Proben wurden geteilt und auf drei Arten parallel untersucht (Abb. 36). Die Referenz-Kultivierungsmethode wurde in jeder Brauerei identisch angewandt, die Routine-Kultivierungsmethoden waren jedoch voneinander unterschiedlich.

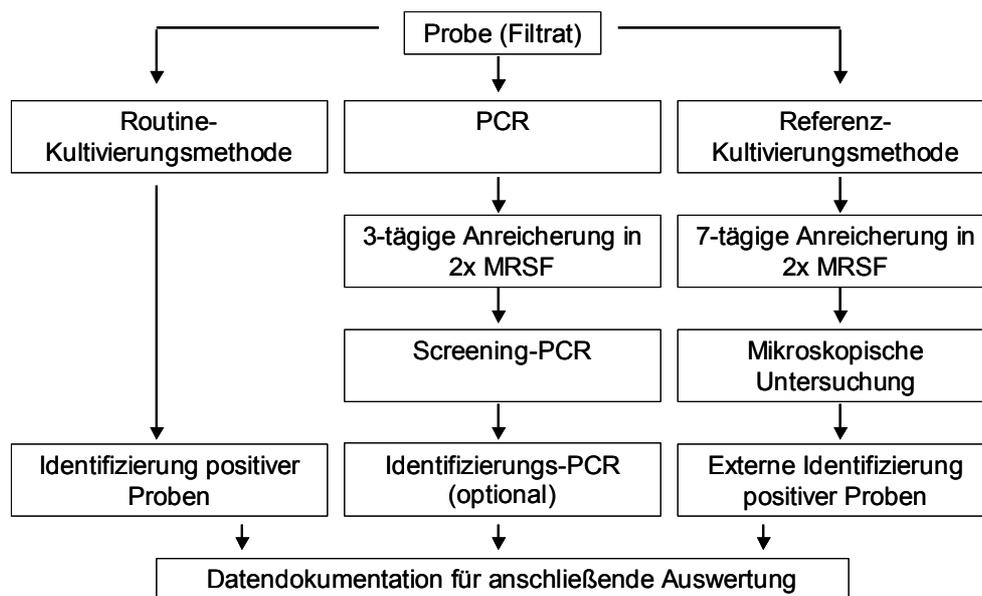


Abb. 36: Probenuntersuchungsschema in Phase 1

7.1.2.1 Probenbearbeitung für PCR

Die Voranreicherung für eine nachfolgende PCR-Analyse erfolgte in 50 ml Falcon-Röhrchen nach folgendem Schema:

- Mischen von 25 ml 2x MRSF mit 25 ml Probe (2x MRSF nach Möglichkeit bis zum Gebrauch in Anaerobentopf lagern)
- Anaerobe Inkubation: 3 Tage, 28 °C
- Falls Probe nach 3 Tagen noch klar: PCMF-Filteraufschluss mit SDS/NaOH-Waschschritten (2.7.2.1)
- Falls Probe nach 3 Tagen trüb: Kugelaufschluss-B (2.7.3.1)
- PCR-Analyse gemäß Kit-Anleitung

7.1.2.2 Referenz-Kultivierungsmethode

Die Referenz-Kultivierungsmethode wurde in allen Brauereien identisch angewandt und erfolgte ebenfalls in 50 ml Falcon-Röhrchen.

- Mischen von 25 ml 2x MRSF mit 25 ml Probe (2x MRSF nach Möglichkeit bis zum Gebrauch in Anaerobentopf lagern)
- Anaerobe Inkubation: 7 Tage, 28 °C
- Bei Wachstum: Externe Identifikation durch einen der Research-Partner

Die externe Identifikation positiver Proben erfolgte bei allen Research-Partners durch konventionelle Methoden (Mikroskop, Gram-Test, Katalase-Test, Oxidase-Test, Gasbil-

derung). Bei den am Lehrstuhl durchgeführten Identifizierungen wurden die Isolate zusätzlich mit den neu entwickelten PCR-Systemen überprüft (Tab. 12).

7.1.2.3 Routine-Kultivierungsmethode

Die Routine-Kultivierungsmethoden der Brauereien 1-5 in Phase 1 stellten sich wie folgt dar (Tab. 48).

Tab. 48: Routine-Kultivierungsmethoden der Brauereien in Phase 1

Brauerei	Methodenbeschreibung Routine-Kultivierungsmethode
1	Filtration 100 ml Bier; 0,45 µm Membran; anaerobe Inkubation des Filters auf RR-3-Agar (7 Tage bei 27°C); Parallel dazu Filtration von weiteren 100 ml Bier; anaerobe Inkubation des Filters auf WLN-Agar (3 Tage bei 28°C), Mikroskopische Auswertung
2	200 ml Bier + 10 ml NBB-C; anaerobe Inkubation (7 Tage bei 27°C); Mikroskopische Auswertung
3+5	Filtration der Probe; 0,45 µm Membran; anaerobe Inkubation des Filters auf NBB-A-Agar (7 Tage bei 27°C); Mikroskopische Auswertung; Probenvolumen: 100-500 ml
4	100-280 ml Bier + 5% NBB-C; anaerobe Inkubation (7 Tage bei 28°C); Mikroskopische Auswertung

7.1.3 Versuchsplan Phase 2

In Phase 2 wurden Proben aus dem Unfiltratbereich von Brauereien untersucht. Zielorganismen waren erneut obligat und potentiell bierschädliche Bakterien. Die Teilung der Proben erfolgte ähnlich zu Phase 1. Die Proben wurden wiederum auf drei Arten parallel untersucht (Abb. 37).

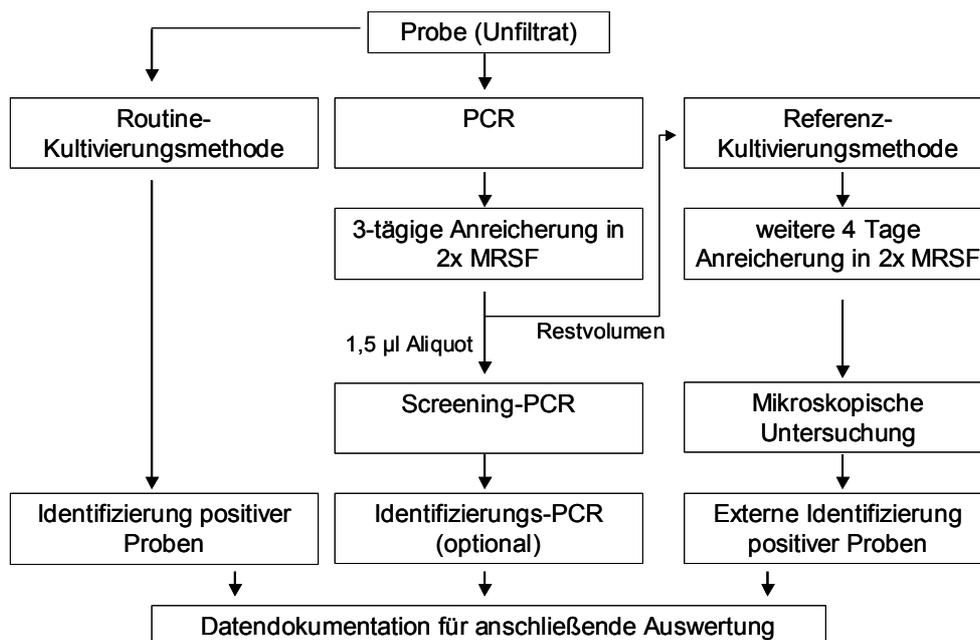


Abb. 37: Probenuntersuchungsschema in Phase 2

7.1.3.1 Probenbearbeitung für PCR

Die Methoden für Proben aus dem Gär- und Lagerkellerbereich unterschieden sich von den für Anstellhefe gewählten Verfahren.

7.1.3.1.1 Voranreicherung und DNA-Isolation für Gär- und Lagerkellerproben

Die Voranreicherung für eine nachfolgende PCR-Analyse erfolgte in 180 ml BVF nach folgendem Schema:

- Mischen von 90 ml 2x MRSF mit 90 ml Probe (2x MRSF nach Möglichkeit bis zum Gebrauch in Anaerobentopf lagern)
- Anaerobe Inkubation: 3 Tage, 28 °C (Deckel der BVF nur auflegen, nicht verschließen)
- Nach drei Tagen: 1,5 ml der Anreicherung für Kugelaufschluss-B verwenden (2.7.3.1)
- PCR-Analyse gemäß Kit-Anleitung

7.1.3.1.2 Voranreicherung und DNA-Isolation für Anstellhefe

Aufgrund möglicher inhibitorischer Effekte durch die erhöhte Hefe-Konzentration in diesen Proben, wurde der modifizierte Kugelaufschluss-B angewandt (2.7.4). Die Inkubation erfolgte ebenfalls in 180 ml BVF, wobei hier ein höherer Steigraum berücksichtigt wurde.

- Mischen von 3 g dickbreiiger Hefe mit 30 ml 2x MRSF und 30 ml pasteurisiertem Bier (2x MRSF nach Möglichkeit bis zum Gebrauch in Anaerobentopf lagern)
- Anaerobe Inkubation: 3 Tage, 28°C (Deckel der BVF nur auflegen, nicht verschließen)
- Nach drei Tagen: 1,5 ml der Anreicherung für modifizierten Kugelaufschluss-B verwenden (2.7.4)
- PCR-Analyse gemäß Kit-Anleitung

7.1.3.2 Referenz-Kultivierungsmethode

Als Referenzmethode wurde das verbleibende Restvolumen der Anreicherung (7.1.3.1.1, 7.1.3.1.2) weitere 4 Tage inkubiert und anschließend mikroskopiert. Bei positiven Befunden wurde eine externe Identifizierung durch einen der Research-Partner durchgeführt.

7.1.3.3 Routine-Kultivierungsmethode

Die Routine-Kultivierungsmethoden der Brauereien 1-5 für Unfiltratproben in Phase 2 stellten sich wie folgt dar (Tab. 49).

Tab. 49: Routine-Kultivierungsmethoden der Brauereien in Phase 2

Brauerei	Methodenbeschreibung Routine-Kultivierungsmethode
1	5 ml Probe in RR-3 und WLN Gussplatten; Inkubation 3-7 Tage bei 27°C; Mikroskopische Auswertung
2	100-200 µl Probe auf UBA-Platten (+ Actidion) ausplattieren; Inkubation 7 Tage bei 27°C; Mikroskopische Auswertung
3	max. 1000 ml Probe + 5 % NBB-C; Inkubation 14 Tage bei 27°C; Mikroskopische Auswertung
4	max. 300 ml Probe + 5% NBB-C; Inkubation 10 Tage bei 28°C; Mikroskopische Auswertung
5	max. 200 ml Probe + 5 % NBB-C; Inkubation 14 Tage bei 27°C; Mikroskopische Auswertung

7.1.4 Datenauswertung und Bewertung der PCR-Methode

Die Ergebnisse der drei parallel durchgeführten Analysen wurden dokumentiert und für jede Phase getrennt ausgewertet. Die subjektiven Meinungen der Anwender über die PCR-Methode wurden am Ende jeder Testphase anhand von Fragebögen ermittelt. Durch die Befragung sollten die erzielten Ergebnisse weiter erläutert werden und somit zu einem aussagekräftigeren Gesamteindruck über die Einsatzmöglichkeiten der PCR-Analyse beitragen.

7.1.4.1 Statistische Datenauswertung

Für die Auswertung wurde die Routine Methode als Standard Methode und PCR als alternative Methode betrachtet. Durch Gegenüberstellung der möglichen Fälle in Form einer Kontingenztafel (Abb. 38) wurden Resultate als „richtig-positiv“, „richtig-negativ“, „falsch-positiv“ und „falsch-negativ“ bewertet. Die Berechnung der Kontingenz-Kennzahlen bei der Gegenüberstellung zweier Analysenmethoden erfolgte anhand der in Abb. 38 dargestellten Formeln (FELDSINE et al. 2002, MALORNY et al. 2003b).

		Alternative Methode (PCR)	
		positiv (a+c)	negativ (b+d)
Standard Methode (Kultivierung)	positiv (a+b)	a richtig- positiv	b falsch- negativ
	negativ (c+d)	c falsch- positiv	d richtig- negativ

Kontingenz-Kennzahlen:
 Relative Sensitivität [%] = $100 \times a/(a+b)$
 Relative Spezifität [%] = $100 \times d/(c+d)$
 Relative Übereinstimmung [%] =
 = $100 \times (a+d)/(a+b+c+d)$

- a: Probenzahl, bei der Standard Methode und alternative Methode positiv (richtig-positiv)
 b: Probenzahl, bei der Standard Methode positiv und alternative Methode negativ (falsch-negativ)
 c: Probenzahl, bei der Standard Methode negativ und alternative Methode positiv (falsch-positiv)
 d: Probenzahl, bei der Standard Methode negativ und alternative Methode negativ (richtig-negativ)

Abb. 38: Gegenüberstellung zweier Analysenmethoden (Standard Methode und alternative Methode) zur Berechnung der Kontingenz-Kennzahlen

Die Aussagekraft der Performance-Indikatoren lässt sich folgendermaßen formulieren:

- Hohe relative Sensitivität → wenig falsch-negative Befunde
- Hohe relative Spezifität → wenig falsch-positive Befunde
- Hohe relative Übereinstimmung → wenig falsch-negative und falsch-positive Befunde

Bei der Betrachtung dieser Kennzahlen ist zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse der Routinemethode stets als richtig vorausgesetzt werden, was in Wirklichkeit aber nicht zwingend zutreffen muss.

Proben, bei denen die Ergebnisse nicht vollständig dokumentiert wurden und Proben, bei denen eine PCR-Auswertung aufgrund von Inhibition nicht möglich war, wurden in die Auswertung nicht mit einbezogen.

7.1.4.2 Bewertung mittels Fragebögen

Die Evaluierung der PCR-Methoden durch die Anwender fand mittels Fragebögen statt. Ausgewählte Aspekte der PCR-Analyse wurden im Vergleich zur herkömmlichen Methode anhand eines Ranking-Systems von 1-5 bewertet (1 = sehr gut, 2 = gut, 3 = befriedigend, 4 = schlecht, 5 = sehr schlecht). Des weiteren sollten spezielle Fragestellungen mit „Ja/Nein“-Wertungen beantwortet werden oder ggf. mit Kommentaren näher erläutert werden.

7.2 Ergebnisse der Brauerei-Tests

Im folgenden sind die erzielten Ergebnisse der beiden Testphasen dargestellt. Neben der Auswertung der Analyseergebnisse und der Fragebögen sind auch weiterführende Erläuterungen und Schlussfolgerungen zu bestimmten Resultaten gegeben.

7.2.1 Phase 1 - Analyseergebnisse

In Phase 1 wurden filterbare Proben untersucht. Vor allem bei den Standard PCR-Anwendern trat häufig PCR-Inhibition auf, weshalb die Filter-Waschschritte geändert wurden (Tween 20 statt SDS/NaOH; siehe 4.3.1.2.1). Bei Real-Time PCR Anwendern wurden die Filter nur mit 50 ml ddH₂O gespült, da hier kaum PCR-Inhibition beobachtet wurde. Die effektivste Lösung des Inhibitions-Problems, die in der Zugabe von BSA zum Reaktions-Mix beruhte, wurde erst nach Phase 1 erprobt und kam daher nicht zum Einsatz. In der folgenden Tabelle ist ein Überblick über die erzielten Ergebnisse ersichtlich. Anmerkungen zu den jeweiligen Versuchen sind mit Fußnoten kenntlich gemacht (Tab. 50).

Tab. 50: Auswertung der Analyseergebnisse aus Phase 1; Probenart: Filtrierbares Bier; Vergleich zwischen PCR (alternative Methode) und Routinemethode (Standardmethode)

Filtrierbares Bier (Probenart)	Brauerei						
	1	2	3	4	5	6	7
Probenanzahl gesamt	257	295	323 ¹	78 ²	224 ¹	121 ²	288
Davon fehlende Proben [%]	9,3 ³	22,7 ⁴	0	0	38,6 ⁵	2,5 ⁶	46,8 ⁷
Probenanzahl für Auswertung	233	227	323	78	141	117	153
PCR positiv [%]	48,9	26,9	2,2	1,3	12,8	3,4	26,8
Routine positiv [%]	38,6	36,6	2,2	1,3	7,8	1,7	5,2
Vergleich PCR - Routine Methode (a, b, c, d siehe Kontingenztabelle Abb. 38)	a = 68 b = 22 c = 46 d = 97	a = 58 b = 25 c = 3 d = 141	a = 7 b = 0 c = 0 d = 316	a = 1 b = 0 c = 0 d = 77	a = 8 b = 3 c = 10 d = 120	a = 1 b = 1 c = 3 d = 112	a = 4 b = 4 c = 37 d = 108
Relative Sensitivität [%]	75,6	69,9	100	100	72,7	50,0	50,0
Relative Spezifität [%]	67,8	97,9	100	100	92,3	97,4	74,5
Relative Übereinstimmung [%]	70,8	87,7	100	100	90,8	96,6	73,2

¹: Ergebnisse erzielt mit Kit-Version 1, ²: Ergebnisse erzielt mit Kit-Version 2

³, ⁶: Fehlende Proben aufgrund von PCR-Inhibition

⁴: Fehlende Proben aufgrund von PCR-Inhibition (3,5 %) und unvollständiger Datendokumentation (19,2 %)

⁵: Fehlende Proben aufgrund unspezifischer PCR-Signale

⁷: Fehlende Proben aufgrund unspezifischer PCR-Bandenmuster (39,8 %) und PCR-Inhibition (7 %)

Zu den Versuchen in den Brauereien 3 und 4 ist anzumerken, dass der PCR-Kit während Phase 1 umgestellt wurde, da von vielen negativen Proben unspezifische PCR-Signale mit hohen C_t-Werten zwischen 34-40 erhalten wurden. Bei Brauerei 3 wurden die fraglichen Proben negativ gewertet, während sie von Brauerei 4 als nicht auswertbar eingestuft

wurden.

Um die Gefahr falsch-positiver Befunde zu vermeiden, wurde das Kit-Setup geändert. Kit-Version 1 war ein kombiniertes Screening für *Lactobacillus* spp., *P. damnosus*, *Megasphaera cerevisiae* und *Pectinatus* spp., während bei Kit-Version 2 zwei getrennte Assays zur Detektion von Milchsäurebakterien und strikt anaeroben Keimen zur Verfügung standen. Nach Umstellung des Detektions-Formates waren keine unspezifischen PCR-Signale mehr zu beobachten.

Bei Brauerei 5 waren zusätzlich zu den PCR-Inhibitionen viele Gele aufgrund von unspezifischen Bandenmustern nicht auswertbar (46,8 %). Die Verlässlichkeit der PCR-Methode war somit unbefriedigend und ein Zusammenhang zwischen Routinemethode und PCR kaum erkennbar. Mögliche Gründe für dieses Problem (z. B. unspezifisches PCR-Assay, Pipettierfehler, Kontamination, falsche Reaktionsbedingungen) konnten nicht eindeutig ermittelt werden.

Ein direkter Vergleich der PCR-Methoden in den jeweiligen Brauereien gestaltete sich schwierig, da teilweise große Abweichungen in den Verfahren der jeweiligen Brauereien vorlagen (z. B. PCR-Assay, Anreicherung Routinemethode, Elektrophorese, Probenvolumen). Dennoch wurde versucht aus den Ergebnissen allgemein erkennbare Trends abzulesen (Tab. 50).

- Beim Vergleich zwischen PCR und Routinemethode ergaben die Real-Time PCR-Methoden eine bessere Übereinstimmung und eine bessere Spezifität als die Standard PCR-Verfahren.
- Bei der Sensitivität war kein eindeutiger Trend zwischen Real-Time PCR und Standard PCR erkennbar. Durch eine längere oder modifizierte Voranreicherung hätten die Werte hier verbessert werden können. Im Fall der Brauerei 2 handelte es sich z. B. bei den falsch-negativen PCR-Befunden ausschließlich um einen langsam wachsenden *P. damnosus* Stamm (BS 242), der innerhalb der 3-tägigen Voranreicherung kein ausreichendes Wachstum für eine PCR-Detektion aufwies.

7.2.2 Phase 1 - Fragebögen

Die Brauereien wurden am Ende von Phase 1 zu bestimmten Kriterien der PCR-Analytik befragt. Die anhand eines Ranking-Systems getroffenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt (Tab. 51). Standard PCR (Brauerei 1 + 5) und Real-Time PCR (Brauereien 2-4) sind im direkten Vergleich gegenübergestellt.

Tab. 51: Bewertung der PCR-Tests in Phase 1 anhand eines Ranking-Systems (1 = sehr gut, 2 = gut, 3 = befriedigend, 4 = schlecht, 5 = sehr schlecht); Brauerei 1 + 5: Standard PCR, Brauereien 2-4: Real-Time PCR

Brauerei	Benutzerfreundlichkeit	Arbeits-sicherheit	Verläß-lichkeit	Sensiti-vität	Umsetzung	Vertrauen in Ergebnis	Interpretation der Ergebnisse	Kosten
1	3	3	2	1	4	2	2	5
5	4	3	4	2	4	4	4	5
2	3	4	2	3	3	3	1	5
3	2	2	1	2	2	2	2	3
4	2	3	2	2	2	2	2	4

Aus den Befragungsergebnissen ließen sich folgende Schlüsse ableiten:

- Bei der Benutzerfreundlichkeit wurden die Real-Time PCR Methoden besser bewertet als die Standard PCR Verfahren, da hier eine Auswertung durch nachfolgende Elektrophorese hinfällig ist. Die Analysendauer und die Fehlerwahrscheinlichkeit sinkt somit, was sich positiv auf die Umsetzung und Integration in die Laborroutine auswirkte.
- Die Punkte Verlässlichkeit, Vertrauen und Interpretation differierten sehr stark bei den Standard PCR Anwendern, so dass ein direkter Vergleich zu den Real-Time PCR Verfahren nicht möglich war. Grund hierfür waren die vielen nicht auswertbaren Proben bei Brauerei 5 und die hohe Abweichung zwischen PCR und Routinemethode, was letztendlich auch zu einer schlechten Bewertung der PCR führte. Aufgrund der übereinstimmenden negativen Meinung der Brauereien 1 und 5 bei den Punkten Benutzerfreundlichkeit und Umsetzung wurde entschieden, in Phase 2 mit Real-Time PCR zu operieren.
- Die Arbeitssicherheit wurde mit „befriedigend“ bewertet, da die Verwendung von Chloroform beim PCMF-Filteraufschluss das Arbeiten im Abzug nötig macht.
- Am negativsten wurden von allen Brauereien die hohen Kosten der PCR-Analyse bewertet.
- Bei den Real-Time PCR Anwendern wurden die Punkte Benutzerfreundlichkeit, Verlässlichkeit, Sensitivität, Umsetzung, Vertrauen und Interpretation positiv (1-3) bewertet.

Neben dem Ranking-System wurden Fragestellungen, denen vorgefertigte Antworten zugeordnet waren, mit Zustimmung oder Ablehnung beantwortet (Tab. 52). In der Tabelle sind die Zahlen der jeweiligen Ja/Nein-Nennungen der Brauereien angegeben.

Tab. 52: Subjektive Meinungen der Brauereien zu ausgewählten Aspekten der PCR-Analyse; Zahl der Ja/Nein-Nennungen

Welcher Schritt der PCR-Methode birgt noch Optimierungspotential?						
	Voranreicherung		DNA-Isolation		PCR-Reaktion	
Ja	3		3		2	
Nein	2		2		3	
Welches Maß an Wissen ist erforderlichlich zur Durchführung einer PCR-Analyse?						
	Kenntnisse der allgemeinen Laborpraxis		Kenntnisse in grundlegenden mikrobiologischen Arbeitstechniken		Vorkenntnisse im Umgang mit DNA	
Ja	5		5		0	
Nein	0		0		5	
Bei welchen Probenarten gab es PCR-Signale von toten Zellen?						
	KZE / Tunnelpasteur		Biologische Säuerung		Verwertung von Rückbier	
Ja	2		0		2	
Nein	3		5		3	
Ermöglicht PCR eine bessere Identifizierung und eine exaktere Lokalisierung von Kontaminationsquellen als die Routinemethode?						
	Bessere Identifizierung			Exaktere Lokalisierung		
Ja	5			4		
Nein	0			0		
Enthaltung	0			1		
Bei welchen Probenarten wird der voraussichtliche Schwerpunkt künftiger PCR-Untersuchungen liegen?						
	Troubleshooting Filtrat	Troubleshooting Unfiltrat	Troubleshooting Hefe	Filtrat allgemein	Unfiltrat allgemein	Hefe allgemein
Ja	5	5	4	1	1	3
Nein	0	0	1	4	4	2

Zur Begründung der getroffenen Antworten lassen sich folgende Anmerkungen treffen:

- Die Voranreicherungsmethode (2x MRSF, 7.1.2.1) erwies sich prinzipiell als geeignet zur PCR-Voranreicherung. Allerdings sollte das verwendete Probenvolumen (25 ml) vergrößert werden, um die Nachweissicherheit zu erhöhen und eine bessere Vergleichbarkeit mit der Routinemethode zu gewährleisten.
- Die Verwendung von 50 ml Falcon-Röhrchen erwies sich als ungeeignet. Zur Anreicherung strikt anaerober Keime waren die Falcon-Röhrchen nicht ausreichend gasdicht, weshalb für künftige Versuche gasdicht verschließbare BVF verwendet werden sollten.
- Trotz zu erwartender Probleme bei der Kultivierung strikt anaerober Keime würde von den Brauereien 3 und 4 für künftige Versuche eine Filtration der Probe vor der Anreicherung bevorzugt werden. Anschließend erfolgt eine Inkubation des Filters mit entsprechenden Nährmedien.

Die Kommentare und Verbesserungsvorschläge zur Voranreicherung während Phase 1 wurden bei der oben beschriebenen optimierten Voranreicherungsmethode für filtrierbare

Proben (4.1.4) mit berücksichtigt.

- Die PCMF DNA-Isolationsmethode zeigte eine gute Sensitivität (10^2 - 10^3 Zellen/filtrierbare Probe). Nachteilig wurde die Verwendung von Chloroform vermerkt, sowie der hohe Zeitbedarf der Methode. Die Angaben schwankten hier zwischen 140-260 min für 20 Proben (Filtration + DNA-Isolation). Der Probendurchsatz von mehr als 40 Proben/d ist somit schwer zu realisieren.
- Die IAC-Verwendung bei der Real-Time PCR wurde positiv bewertet, da die Verbrauchsmittel und der Enzymeinsatz im Vergleich zu externen Kontrollen um die Hälfte reduziert werden konnte.
- Das Nachweisspektrum der PCR-Kits sollte aus Gründen der Benutzerfreundlichkeit ein kombiniertes Screening für Milchsäurebakterien und strikt anaerobe Keime umfassen.
- Die Integration der PCR-Methode war bei allen Brauereien möglich, ohne dass bei dem durchführenden Laborpersonal spezielle molekularbiologische Kenntnisse oder Schulungen notwendig gewesen wären.
- Die Vorteile, die PCR bei der Identifizierung von Mikroorganismen bietet, führten auch zu einer besseren Lokalisierung von Kontaminationsquellen (HAGE und WOLD 2003).
- Das Haupteinsatzgebiet künftiger PCR-Analysen wird vor allem Bereich Troubleshooting gesehen (Identifizierung positiver Befunde, Lokalisierung von Kontaminationsquellen, vermehrte Stichproben nach positiven Befunden oder in gefährdeten Bereichen).
- Limitierende Faktoren für eine Ausweitung der PCR-Analyse sind in erster Linie die hohen Analysenkosten und die personal- und zeitintensivere Probenaufbereitung für die PCR.
- Die PCR-Anschaffungskosten wurden mit ca. 20.000€ für Standard PCR und 50.000-70.000€ für Real-Time PCR angegeben. Die laufenden Kosten (PCR-Kit, Polymerase, Pipettenspitzen, etc.) belaufen sich auf ca. 13-14€ pro Reaktion.
- Die gesamte Analysendauer für 20 Proben betrug für Standard PCR 5-6 h, wobei die Personalbeanspruchung bei 1,5-2,5 h liegt (Angaben ohne Membranfiltration). Die entsprechenden Zeiten für Real-Time PCR liegen bei 2,5-4 h (gesamte Analysendauer) und 1-1,5 h (Personalbeanspruchung).

7.2.3 Phase 2 - Analysenergebnisse

In Phase 2 wurden Proben aus dem Unfiltratbereich analysiert. Die Ergebnisse sind getrennt nach Gär- Lagerkellerproben (Tab. 53) und Anstellhefe (Tab. 54) protokolliert. Die Ergebnisse von Brauerei 1 sind in den Tabellen zwar dargestellt, werden aber in der weiteren Auswertung und Interpretation nicht berücksichtigt, da die Durchführung der PCR

nicht ordnungsgemäß verlief. Durch verspätete Lieferung des PCR-Gerätes konnten die DNA-Isolate erst nach Beendigung der zweiten Phase analysiert werden. Die DNA-Isolate wurden bis zum Zeitpunkt der PCR teilweise über mehrere Monate tiefgefroren. Alle Kategorien in Tab. 53 und Tab. 54 zeigen bei Brauerei 1 im Gegensatz zu den anderen Brauereien unerklärlich schlechte Werte, so dass von Fehlern in der Probenaufarbeitung oder -lagerung ausgegangen werden musste.

Tab. 53: Auswertung der Analysenergebnisse aus Phase 2; Probenart: Unfiltrat aus Gär- und Lagerkeller; Vergleich zwischen PCR (alternative Methode) und Routinemethode (Standardmethode)

Probenart: Gär- Lagertanks	Brauerei				
	1	2	3	4	5
Probenanzahl gesamt	234	89	192	317	468
Davon fehlende Proben [%]	5,1 ¹	2,3 ²	0	0,3 ³	5,8 ⁴
Probenanzahl für Auswertung	222	87	192	316	441
PCR positiv [%]	37,8	52,8	3,1	14,2	3,6
Routine positiv [%]	16,2	13,8	3,1	11,1	4,5
Vergleich PCR - Routine Methode (a, b, c, d siehe Kontingenztabelle Abb. 38)	a = 19 b = 17 c = 65 d = 121	a = 12 b = 0 c = 34 d = 41	a = 6 b = 0 c = 0 d = 186	a = 19 b = 16 c = 26 d = 255	a = 11 b = 9 c = 5 d = 416
Relative Sensitivität [%]	52,8	100	100	54,3	55,0
Relative Spezifität [%]	65,1	54,7	100	90,7	98,8
Relative Übereinstimmung [%]	63,1	60,9	100	86,7	96,8

^{1, 2, 3, 4}: Fehlende Proben aufgrund von PCR-Inhibition

Tab. 54: Auswertung der Analysenergebnisse aus Phase 2; Probenart: Anstell- und Erntehefe; Vergleich zwischen PCR (alternative Methode) und Routinemethode (Standardmethode)

Probenart: Anstellhefe	Brauerei				
	1	2	3	4	5
Probenanzahl gesamt	61	22	314	60	0
Davon fehlende Proben [%]	0	0	0	0	---
Probenanzahl für Auswertung	61	22	314	60	---
PCR positiv [%]	34,4	68,2	1,3	0	---
Routine positiv [%]	29,5	36,4	0,6	0	---
Vergleich PCR - Routine Methode	a = 7 b = 11 c = 14 d = 29	a = 8 b = 0 c = 7 d = 7	a = 2 b = 0 c = 2 d = 310	a = 0 b = 0 c = 0 d = 60	---
Relative Sensitivität [%]	38,8	100	100	---	---
Relative Spezifität [%]	67,4	50	99,4	100	---
Relative Übereinstimmung [%]	59,0	68,2	99,4	100	---

- Der Prozentsatz an PCR-Inhibition war bei den Brauereien 3 und 4 (LightCycler PCR; Mix mit BSA) verschwindend gering, während bei den TaqMan PCR-Anwendern 2,3 bzw. 5,8 % Inhibition verzeichnet wurde (Mix ohne BSA). Dieser Unterschied ist eine

weitere Bestätigung für die positiven Auswirkungen einer BSA-Zugabe im PCR-Mix.

- Beim Vergleich PCR-Routinemethode betrug die Sensitivität bei Brauerei 2 100 % und die Spezifität 54,7% (Tab. 53). Die niedrige Spezifität ist hier nicht auf einen hohen Prozentsatz falsch-negativer Befunde zurückzuführen. Vielmehr erwies sich die PCR-Methode als sensitiver im Vergleich zur etablierten Methode (Tab. 49). Die positiven PCR-Befunde konnten hier alle durch eine positive Referenzprobe nach sieben Tagen bestätigt werden.
- Die relative Spezifität beim Vergleich PCR/Routinemethode lag bei den übrigen Brauereien über 90 %
- Bei der Sensitivität wurden differierende Resultate erzielt (Tab. 53). Während bei Brauerei 3 100 % erreicht wurden, lag die Sensitivität in den Brauereien 4 und 5 nur bei 54,3 bzw. 54,5 %. Die Sensitivität hätte - wie schon bei Brauerei 2 in Phase 1 – durch eine verlängerte Voranreicherung gesteigert werden können. In Brauerei 4 wurde nach Hälfte von Phase 2 die Voranreicherungszeit von 3 auf 4 Tage verlängert, wodurch die Übereinstimmung zwischen PCR und Referenzmethode verbessert wurde (Tab. 55).

Tab. 55: Übereinstimmung zwischen PCR und Referenzmethode bei 3-tägiger und 4-tägiger Voranreicherung (Brauerei 4)

	PCR positiv	PCR negativ aber Referenzmethode positiv nach 7 Tagen
3 Tage Voranreicherung	10	13
4 Tage Voranreicherung	30	3

7.2.4 Phase 2 - Fragebögen

Wegen der oben genannten Probleme wurden von Brauerei 1 keine Antworten in die Wertung mit einbezogen. Die übrigen Resultate sind in Tab. 56 und Tab. 57 ersichtlich.

Tab. 56: Bewertung der PCR-Tests in Phase 2 anhand eines Ranking-Systems (1 = sehr gut, 2 = gut, 3 = befriedigend, 4 = schlecht, 5 = sehr schlecht); Brauerei 2 + 5: TaqMan Real-Time PCR; Brauerei 3+4: LightCycler Real-Time PCR

Brauerei	Benutzerfreundlichkeit	Arbeits-sicherheit	Verlässlichkeit	Sensitivität	Umsetzung	Vertrauen in Ergebnis	Interpretation der Ergebnisse	Kosten
2	2	2	1	1	2	1	1	3
3	2	2	2	2	2	2	2	3
4	3	2	3	3	2	3	2	4
5	3	2	2	1	2	2	2	5

Die Punkte Benutzerfreundlichkeit, Arbeitssicherheit und Umsetzung wurden besser bewertet als in Phase 1. Grund hierfür war der ausschließliche Einsatz von Real-Time PCR,

sowie eine DNA-Isolationsmethode, die ohne die Verwendung von Chloroform durchgeführt werden konnte.

Bis auf die Analysenkosten wurden alle anderen Punkte ebenfalls positiv bewertet. Die Kosten der PCR waren wie schon in Phase 1 der größte Kritikpunkt.

Die Meinungen der Brauereien zu ausgewählten Aspekten der PCR fielen nahezu identisch zu den Antworten aus Phase 1 aus (Tab. 52). Viele der Schlussfolgerungen aus Phase 1 konnten somit bestätigt werden. Bei der Befragung nach Phase 2 wurden zusätzlich noch erläuternde Kommentare eingefügt, die mit großer Übereinstimmung beantwortet wurden (Tab. 57).

Tab. 57: Subjektive Meinungen der Brauereien zu ausgewählten Aspekten der PCR-Analyse; Zahl der Ja/Nein-Nennungen

	War es möglich, PCR als Teil der täglichen Labor-Routine zu etablieren?
Ja	4
Nein	0
	PCR eignet sich sehr gut zu Identifizierungszwecken und für diese Art der Anwendung liefert die Methode schnellere und exaktere Ergebnisse als die Routinemethode.
Ja	4
Nein	0
	PCR (incl. Voranreicherung und DNA-Isolation) kann hinsichtlich Nachweisgeschwindigkeit und Sensitivität immer noch verbessert werden
Ja	4
Nein	0
	Um den Erfolg der Analyse zu gewährleisten, ist es von entscheidender Bedeutung, Zellen bzw. DNA aus einem großen Probenvolumen in die PCR zu transferieren. Die Verbesserung der PCR-Probenvorbereitung steht hier an erster Stelle.
Ja	4
Nein	0

8 Diskussion der Ergebnisse

Konventionelle mikrobiologische QS-Methoden in der Getränkeindustrie basieren auch heute noch zum Großteil auf kulturellen Nachweistechiken. Zur Verbesserung und Ergänzung der etablierten Verfahren wurde versucht, praxistaugliche PCR-Methoden zum Einsatz in Brauereilabors zu entwickeln und sinnvolle Einsatzgebiete für die PCR-Analytik aufzuzeigen.

Verschiedene Aspekte bei der Voranreicherung und Probenverarbeitung sowie der effektiven Gestaltung von PCR-Reaktionen wurden erörtert. In diesem Zusammenhang wurden auch neue Real-Time PCR-Systeme erprobt. Zusammen mit den parallel verlaufenden PCR-Tests in Brauereien ergaben sich hilfreiche Ansatzpunkte zur Verbesserung der Methode.

8.1 Voranreicherung

Um Kontaminationen im Spurenbereich (z. B. 1-10 Zellen/Flasche) mit PCR sicher erfassen zu können, ist es immer noch zu empfehlen, PCR in Verbindung mit einer Voranreicherung zu verwenden (JUVONEN et al. 1998). Sofern die Probe nicht von Beginn an eine hohe Anzahl an toten Zellen enthält ($> 10^4$ Zellen/ml), erhöht eine Voranreicherung die Wahrscheinlichkeit, dass lebende Zellen erfasst werden (JUVONEN et al. 2003).

Um den Zeitvorteil der PCR-Methode nicht durch unsachgemäße Voranreicherung zunichte zu machen, muss dieser Schritt so effektiv wie möglich gestaltet werden. Erschwerend kommt hinzu, dass speziell bei den Nachweismedien für Milchsäurebakterien unterschiedliche Meinungen über das optimale Nachweismedium vorherrschen (JESPERSEN und JAKOBSEN 1996).

Generell empfohlene Medien wie modifiziertes MRS (MRSF), RR-3 oder NBB-C (PRIEST und CAMPBELL 1996) stellten sich für die getesteten Milchsäurebakterien als geeignet heraus. Bei keinem der Nährböden wurden negative Auswirkungen auf eine anschließende PCR, z. B. durch PCR-Inhibition, beobachtet.

Aufgrund der besseren Nährstoffversorgung im Vergleich zu festen Nährböden wurden flüssige Medien zur Spurenanreicherung bevorzugt. Gleichzeitig erleichtern diese die PCR-Probenaufarbeitung, da Möglichkeiten zur Filtration bzw. Zentrifugation gegeben sind.

Bei den jeweiligen Methoden wurden Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit der Keime festgestellt. Hierbei ergaben sich abhängig von den Bieranteilen und pH-Werten der Medien Differenzen zwischen den einzelnen Nährböden sowie auch innerhalb eines Mediums.

Bei allen Medien konnte gezeigt werden, dass die Vermehrungsgeschwindigkeit der Keime mit zunehmendem Bieranteil abnimmt. Diese Beobachtungen wurden anhand dreier Meßmethoden bestätigt: Zeitdauer bis zur visuellen Trübung, CFU und PCR zu definierten Zeitpunkten der Anreicherung.

Die Auswirkungen eines hohen Bieranteils auf obligat bierschädliche Keime waren allerdings weniger ausgeprägt als bei den potentiell schädlichen Keimen. Bei Letzteren (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. perolens*) ergaben sich Verzögerungen von bis zu 5 Tagen, bis das Keimniveau der unselektiven Methode (Medium ohne Bier) auch mit der selektivsten Variante erreicht wurde (5x Medium mit 80% Bier bzw. NBB-C + 95 % Bier). Bei den obligat schädlichen Keimen (*L. brevis*, *L. lindneri*, *P. damnosus*) ergaben sich während der Anreicherung Keimzahlverschiebungen, die nur auf einen 24 h-Zeitraum zwischen den einzelnen Methoden beschränkt waren.

Dieses unterschiedliche Verhalten ist in erster Linie durch die Hopfenresistenzmechanismen obligat bierschädlicher Milchsäurebakterien begründet (SAKAMOTO und KONINGS 2003, SUZUKI et al. 2004c). Die Kombination aus niedrigem pH-Wert (< 5,0) und undissoziierten Hopfensäuren stellt die wichtigste selektive Eigenschaft von Bier dar (GÄNZLE und VOGEL 2004). Die antibakterielle Wirkung von Hopfensäuren erklärt sich durch die Tatsache, dass Hopfensäuren in die Cytoplasmamembran diffundieren können und dadurch den für Bakterien lebenswichtigen Protonengradienten zerstören (SIMPSON 1993, SIMPSON und FERNANDEZ 1994). Hopfenresistente Milchsäurebakterien verfügen über membrangebundene Transportsysteme, welche Hopfensäuren unter Energieverbrauch aus der Membran entfernen können oder den pH-Gradienten durch den Export von Protonen wiederherstellen (HAYASHI et al. 2001, SAKAMOTO und KONINGS 2003).

Der Zusammenhang zwischen Hopfenresistenz und Wachstumsverhalten konnte mit den Voranreicherungsversuchen verdeutlicht werden. Das Wachstum der aus Bier isolierten Keime wurde durch die unterschiedlichen Bieranteile kaum negativ beeinflusst. Die potentiell schädlichen Keime, bei denen keine Vermehrung in Bier nachzuweisen war, zeigten deutlich verlangsamtes Wachstum bei steigenden Bieranteilen und abnehmenden pH-Werten. Diese Tendenz konnte unabhängig vom verwendeten Medium (MRSF, RR-3) beobachtet werden. Der genaue Bieranteil der aktuellen NBB-B-Version ist nicht bekannt. Dennoch kann aber davon ausgegangen werden, dass er bei ca. 50 % liegt (JESPERSEN und JAKOBSEN 1996). Somit wäre die Tendenz auch für die NBB-Medien gültig.

Im Hinblick auf eine maximale Nachweisgeschwindigkeit ist für einen Schnellnachweis daher kein oder ein möglichst geringer Bieranteil zu bevorzugen. Vor allem mit dem Hintergrund, dass mit einer nachfolgenden PCR eine selektive Nachweismethode zur Verfügung steht, kann argumentiert werden, dass die Voranreicherung unselektiv und mög-

lichst schnell sein sollte.

Bei dieser Vorgehensweise wird allerdings nicht berücksichtigt, dass obligat bierschädliche Keime oftmals durch eine verlängerte lag-time gekennzeichnet sind und von schneller wachsenden Organismen unterdrückt werden können (BACK 1994). Diese Tatsache konnte anhand von Keimgemischen, die in unterschiedlich selektivem Milieu inkubiert wurden, bestätigt werden. Unter unselektiven Bedingungen (MRSF) vermehrten sich ausschließlich die potentiell schädlichen Keime, während sich bei selektiver Anreicherung (NBB-C + 95 % Bier) die obligaten Schädlinge durchsetzten. Nur bei „halb-selektiven“ Methoden (2x MRSF + 2x MIB + 70% Bier, pH 5,1 oder NBB-C + 75% Bier + 20% ddH₂O, pH 5,0) war es möglich, beide Keime gleichzeitig über PCR und mikroskopischen Nachweis zu erfassen.

Eine unselektive Voranreicherung beinhaltet daher das Risiko, dass falsch-negative Befunde resultieren können, oder dass das Organismenspektrum nicht vollständig detektiert wird. Dieses Problem kann nur durch einen definierten Anteil an selektiven Komponenten (Bier) in der Anreicherung vermieden werden.

Die Anreicherungsversuche verdeutlichten, dass Nachweisgeschwindigkeit, Spezifität und Nachweisspektrum konkurrierende Ziele darstellen. Eine Methode zur PCR-Voranreicherung sollte einen Kompromiss zwischen diesen Zielen darstellen. Je nach Prozentsatz an Bier in der Anreicherung kann die Methode nach Bedarf in Richtung Schnelligkeit oder Spezifität modifiziert werden. Hierbei gilt es, den pH-Wert und den Bitterstoffgehalt des jeweiligen Bieres zu berücksichtigen. Generell können allerdings Anteile zwischen 50-75% Bier und pH-Werte von 4,9-5,4 als geeignet erachtet werden.

Denkbar wäre auch eine Abstufung der Selektivität im Verlauf des Produktionsprozesses. Im Unfiltrat und bei der Umfeldanalyse könnte mit Bieranteilen von 40-50 % gearbeitet werden, um ein breiteres Keimspektrum zu erfassen, und somit potentielle Gefahren frühzeitig zu erkennen. Beim fertigen Produkt könnte der Fokus verstärkt auf obligat schädlichen Organismen liegen, die einen höheren Bieranteil (70-75 %) tolerieren müssen.

Höhere Bieranteile sind zudem aufgrund der Alkoholempfindlichkeit einiger *Megasphaera cerevisiae*-Stämme nicht zu empfehlen (JESPERSEN und JAKOBSEN 1996). Selektive Bedingungen könnten auch durch eine künstliche pH-Absenkung des Mediums und Zudosierung von iso- α -Säuren erreicht werden. Dennoch ist der Zusatz von Bier zu bevorzugen, da hier die realen Bedingungen, unter denen später das Wachstum von Schadkeimen erfolgt, am treffendsten simuliert werden.

Neben der Selektivität der Voranreicherung spielt das Proben-Handling eine entscheidende Rolle. Aus Gründen der Nachweissicherheit und der quantitativen Aufkonzentrierung

der Zellen ist bei filtrierbaren Proben eine Filtration vor der Anreicherung zu befürworten. Der oxidative Stress bei einer Membranfiltration auf strikt anaerobe Keime führte jedoch, wie erwartet, zu negativen Ergebnissen bei der nachfolgenden Kultivierung.

Um beide Ziele – quantitative Zellsammlung und Vermeidung von oxidativem Stress – zu erreichen, sollte ein gewisser Prozentsatz der Probe nicht filtriert werden. Mit diesem Probenanteil wird auch die gewünschte Selektivität der Anreicherung eingestellt, indem das Biervolumen mit konzentriertem Nährmedium auf Einsatzkonzentration ausgemischt wird. Anschließend wird der Filter mit den restlichen, aber oxidativ belasteten Keimen hinzugefügt (4.1.4). Alternativ bzw. zusätzlich zu dieser Methode könnte die Membranfiltration unter CO₂-oder N₂-Begasung stattfinden, wodurch sich der apparative Aufwand aber erhöht.

Zur Durchführung der beschriebenen Methode müssen konzentrierte und nach Möglichkeit vorevakuierte Medien verwendet werden, die mit dem Bieranteil auf die jeweilige Einsatzkonzentration gebracht werden. Die Verwendung eines Antioxidationsmittels als Additiv, z. B. Cystein-HCl, ist zu empfehlen.

Zur Kultivierung möglichst aller potentiell und obligat schädlichen Bakterien hat sich eine Mischung aus 2x MRSF/2x MIB oder NBB-C mit einem Bieranteil von 50-75 % als tauglich erwiesen. 2x MRSF/2x MIB zeigte bei der Kultivierung von *Pectinatus* spp. und *Megasphaera cerevisiae* Vorteile gegenüber NBB-C, was in Einklang steht mit den Erkenntnissen von JUVONEN et al. (2003). Allerdings muss das Medium in der beschriebenen Form hergestellt werden, während NBB-C bereits als flüssiges Fertigmedium kommerziell erhältlich ist. Speziell die NBB-Medien wurden für die PCR optimiert, da mit NBB-B anfänglich falsch-positive Befunde aufgrund von DNA-Verunreinigungen im Medium festgestellt wurden (HOMANN et al. 2003). Durch eine Weiterentwicklung der Nachweismedien ist eine Kombination von handelsüblichen Kultivierungsmethoden und PCR mittlerweile möglich (AMMON et al. 2004).

Die Versuche im Labor und in der Brauereipraxis haben ergeben, dass für filtrierbare Proben mit einer Voranreicherungszeit von 1-3 Tagen und für unfiltrierbare Proben mit 2-4 Tagen Voranreicherungszeit kalkuliert werden sollte.

Dennoch bleibt trotz einer optimierten Voranreicherung ein Restrisiko bestehen, dass sich vorgeschädigte, schwer zu kultivierende oder langsam wachsende Keime in der zur Verfügung stehenden Zeit nicht immer bis über die PCR-Nachweisgrenze hinaus vermehren (HUTTER et al. 2003).

Vor allem der Nachweis von Sekundärkontaminanten im Abfüllbereich, die für ca. 50 % aller Reklamationen verantwortlich sind (BACK 2003), würde aufgrund der Verlängerung

der Voranreicherungszeit den Zeitvorteil einer PCR weiter schmälern

Wird eine kostenintensive Schnellnachweismethode wie PCR oder FISH eingesetzt, so sollten daher alle Schritte im Vorfeld, d. h. Probennahme und –verarbeitung sowie Anreicherung kritisch überdacht und ggf. optimiert werden.

Neben einer optimierten Voranreicherung muss das weitere Ziel sein, möglichst repräsentative und große Probenvolumina zu untersuchen, um die Fehlermöglichkeiten bei der Probennahme zu minimieren. Eine Kombination mit einer kontinuierlichen Probenahme wäre hier empfehlenswert (BACK und PÖSCHL 1998, STRACHOTTA 2003).

Auch für Unfiltrat- und Hefeproben hat sich die Anreicherung mit den oben erwähnten Flüssignährmedien bewährt. Zusätzliche selektive Kriterien wie Nährstoffkonkurrenz bedingt durch Hefen, oder höhere Hopfengehalte können die benötigte Anreicherungszeit verlängern. Da dem Schnellnachweis im Gär- und Lagerkellerbereich weniger Bedeutung zukommt als bei der Abfüllung, sollte hier die Nachweissicherheit durch eine verlängerte Voranreicherung im Vordergrund stehen. Lediglich bei Ernte- oder Anstellhefe sind verkürzte Anreicherungszeiten in Betracht zu ziehen.

Sowohl für Filtrat- als auch für Unfiltratproben empfiehlt sich die Verwendung gasdicht verschließbarer BVF, da diese leicht zu handhaben und wiederverwendbar sind. Zudem entfallen zusätzliche Maßnahmen zur Schaffung eines anaeroben Milieus.

Zur PCR-Voranreicherung brauereirelevanter Fremdhefen konnte die Effektivität von MYPG bzw. MYPG + CuSO₄ bestätigt werden (VAN DER AA KÜHLE 1998, SALEK 2002, POWELL und SMART 2003). Bei CuSO₄-Konzentrationen > 200 ppm wurde kein Wachstum von Brauhefen mehr nachgewiesen. NS-FH wurden durch CuSO₄-Zugabe bis 500 ppm im Wachstum nicht beeinträchtigt. Zusätzlich zu den NS-FH konnte auch noch *S. diastaticus* und *S. exiguus* bei > 200 ppm CuSO₄ nachgewiesen werden. Eine Unterscheidung zwischen ober- und untergärischen Brauhefen der Hefebank Weihenstephan und *S. bayanus/S.pastorianus*-Typstämmen war mit MYPG + CuSO₄ jedoch nicht möglich.

Die Tauglichkeit von MYPG + 250 ppm CuSO₄ zur selektiven Spurenanreicherung von NS-FH in Brauhefe konnte ebenfalls belegt werden. Dadurch war ein direkter PCR-Nachweis von Fremdhefen innerhalb von 24-48 h auch in Keimgemischen möglich. Eine weiterführende Differenzierung über zusätzliche Selektivnährböden wie Lysinagar oder Kristallviolettagar kann somit vermieden werden.

In Kombination mit unterschiedlichen Bebrütungstemperaturen (28/37 °C) war es möglich, mit nur einem Basismedium (MYPG) unter Zusatz von CuSO₄ und nachfolgender PCR ein Probenbearbeitungsschema zum Hefe- bzw. Fremdhefenachweis in Brauereien zu entwickeln (Abb. 21).

8.2 Probenverarbeitung

Um die unter 4.3 genannten Anforderungen an die PCR-Probenverarbeitung zu erfüllen, wurden Bearbeitungsprotokolle für die verschiedenen brauereispezifischen Probentypen entwickelt bzw. verbessert.

Besonders für den Filtratbereich ergeben sich Schwierigkeiten, da die oftmals sehr niedrige Ausgangskeimzahl quantitativ in die PCR überführt werden muss, um einen gesicherten Befund zu gewährleisten. Zusätzlich zu einer optimierten Probennahme empfiehlt sich für filtrierbare Proben eine quantitative Zellsammlung mittels Filtration vor oder nach einer Voranreicherung.

Die verwendete PCMF-Methode (2.7.2.1, 4.3.1.2) erwies sich in der ursprünglichen Version anfällig in Bezug auf PCR-Inhibition. Verschiedene Filter-Waschschritte mit SDS und NaOH zur Beseitigung möglicher PCR-Inhibitoren (YASUI et al. 1997) führten zu keiner befriedigenden Lösung. Versuche zeigten, dass die eingesetzten Waschsubstanzen sogar PCR-inhibierende Wirkung haben können.

Erst durch Zugabe von BSA in den PCR-Reaktionsmix konnte eine PCR-Inhibition verlässlich beseitigt werden. Der Einsatz von BSA als erfolgreiche Methode zur Überwindung von PCR-Inhibition wurde bereits an anderer Stelle beschrieben (KREADER 1996, RIJPENS und HERMAN 2002, RUDI et al. 2004).

Für die Wirkungsweise von BSA als PCR-Enhancer gibt es mehrere Erklärungen. Eine Möglichkeit besteht darin, dass BSA eine höhere Affinität zur inhibierenden Substanz besitzt als die Polymerase und das Enzym dadurch nicht mehr gehemmt wird (MCGREGOR et al. 1996). Eine weitere Erklärung kann darin gesehen werden, dass BSA für mögliche störende Proteinase ein zusätzliches Substrat darstellt und die Polymerase dadurch geschont wird (WILSON 1997; RUDI et al. 2004). BSA ist außerdem in der Lage phenolische Bestandteile zu binden, die sich ansonsten an die Polymerase anlagern und auf diese Weise zu einer Inhibition führen können (KREADER 1996, RIJPENS und HERMAN 2002).

Da bei Bier sowohl Proteinase als auch phenolische Substanzen als störende Bestandteile in der Probenmatrix vorliegen, stellt BSA einen billigen, effektiven und unproblematischen Zusatzstoff zur Verbesserung von PCR-Reaktionen dar. Die Zugabe von BSA in den Reaktionsmix macht zudem die zeitintensiven Waschschritte überflüssig. Mit der optimierten PCMF-Methode ließ sich eine Sensitivität von 10^3 - 10^2 Zellen/Probe erreichen und die Sensitivität ist somit unabhängig vom filtrierten Probenvolumen. Der Sensitivität des Verfahrens steht jedoch ein hoher Zeit- und Personalbedarf gegenüber, der einen hohen Probendurchsatz (> 40 Proben/Tag) oder eine Automatisierung nicht erlaubt. Außerdem sind durch die Verwendung von Chloroform zusätzliche Maßnahmen zur Arbeitssicherheit notwendig.

Eine mögliche Alternative zum PCMF-Verfahren stellen die CellTrap-Filter dar (4.3.1.4, 4.3.1.5). Die Handhabung der Filter ist einfacher, der Probendurchsatz lässt sich steigern (ca. 15 Proben/Stunde bei 500 ml Proben) und es kommen keine gesundheitsgefährdenden Chemikalien zum Einsatz. Die Sensitivität ist wiederum unabhängig vom filtrierten Probenvolumen, da alle Keime quantitativ im CellTrap-Filter zurückgehalten werden. Allerdings ist die Sensitivität verglichen zum PCMF-Aufschluss schlechter, da bei 10^3 Zellen/Probe kein positives Ergebnis mehr erzielt werden konnte.

Für die Praxisanwendung gilt es, einen Kompromiss zwischen Nachweissicherheit und vertretbarem Arbeits- und Zeitaufwand zu finden.

Die sensitivste Methode beinhaltet eine zweimalige Filtration vor der Anreicherung und anschließendem PCMF-Aufschluss. Dieses Probenhandling dürfte jedoch aus zeitlichen Gründen nur in Ausnahmefällen praktikierbar sein. Falls ohne Voranreicherung gearbeitet wird, sollte für filtrierbare Proben die PCMF-Methode angewendet werden.

Bei Anwendung einer Voranreicherung kann alternativ die CellTrap-Methode oder ein auf Zentrifugation basiertes Verfahren (IGM, Kugelaufschluss-B) verwendet werden, wobei die Zentrifugationsmethoden deutlich kostengünstiger sind (CellTrap Filter: ~ 5 €/Probe; IGM: $\sim 0,60$ €/Probe; Kugelaufschluss-B: $\sim 0,10$ €/Probe). Nachteil der zuletzt genannten Verfahren liegt in der Tatsache, dass die Sensitivität stark vom verwendeten Probenvolumen abhängt, da der Anreicherung immer nur ein Bruchteil für die DNA-Isolation entnommen wird. Bei Verwendung von 1 ml-Proben müssten bei einer Nachweisgrenze von $5 \cdot 10^3$ Zellen/ml demnach bereits $2,5 \cdot 10^5$ Zellen in 50 ml vorliegen.

Zur DNA-Isolation von Bakterien-DNA aus trüben Proben sowie hefehaltigen Proben haben sich der Kugelaufschluss-B und die IGM-Methode am geeignetsten erwiesen. Der Bugs'n Beads-Kit erzielte hier schlechtere Ergebnisse, was aber wahrscheinlich an den gram-positiven Zielkeimen begründet war. An anderer Stelle wurden mit dieser Methode bei der Detektion gram-negativer Zellen bedeutend bessere Ergebnisse erzielt (RUDI et al. 2004).

Da der Kugelaufschluss-B die schnellste DNA-Isolationsmethode darstellt, empfiehlt es sich, trübes Rückbier, Kolonien auf Agarplatten und Proben, die nach der Anreicherung bereits sichtbar getrübt sind, mit diesem Verfahren zu behandeln. Die Zelldichten der erwähnten Probentypen ($> 10^6$ Zellen/ml) sind ausreichend für eine sichere Detektion mit allen erwähnten PCR-Assays. Zudem wurden mit Kugelaufschluss-B keine PCR-Inhibitionen für die erwähnten Probentypen beobachtet.

Für Lager- und Gärtankproben wurden vier Methoden erprobt: Kugelaufschluss-B, Kochaufschluss-B, IGM und Bugs'n Beads (4.3.2.2, 4.3.2.3). Kugelaufschluss-B, Kochauf-

schluss-B und IGM erwiesen sich als geeignete Aufschlussmethoden. Im weiteren Verlauf wurde jedoch nur mit Kugelaufschluss-B und IGM Versuche durchgeführt, da mit dem Kochaufschluss-B verstärkt PCR-Inhibitionen bei der Bearbeitung von Anstellhefe auftraten.

Die Nachweisgrenze bei Lager- und Gärtankproben (Hefezellzahl ca. $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml) lag mit dem Kugelaufschluss-B bei 10^3 - 10^4 Bakterienzellen/ml, während mit der IGM-Methode in allen Fällen 10^3 Zellen/ml nachgewiesen werden konnten. Zum Spurennachweis ist daher die IGM-Methode zu bevorzugen.

Für Anstellhefe wurden der Kugelaufschluss-B und die IGM-Methode um einen Zentrifugationsschritt erweitert, da durch zu hohe Hefezellzahlen verstärkt inhibierte PCR-Reaktionen beobachtet wurden (4.3.2.3). Dieses zu erwartende Phänomen (STEWART und DOWHANICK 1996) konnte durch eine weitgehende Zentrifugation überschüssiger Hefe vor der DNA-Isolation beseitigt werden. Mit der Verwendung des Überstandes nach der Zentrifugation konnte eine Sensitivität von 10^4 Zellen/ml erreicht werden. Die Sensitivität des modifizierten Kugelaufschlusses-B lag mit 10^4 - 10^3 Zellen/ml etwas geringer als das ursprüngliche Verfahren, was dadurch zu erklären ist, dass es, selbst bei mäßiger Zentrifugation, zu Verlusten bei den Zielkeimen (Bakterien) kommen kann.

Zur DNA-Isolation aus Hefen kamen der Kugelaufschluss-H und die IGM-Methode zur Anwendung (4.3.3). Der Kugelaufschluss-H wurde zum Zellaufschluss von Hefen modifiziert, indem 0,5 mm Beads (\emptyset) mit zusätzlicher Hitzeinkubation (5 min/95 °C) angewendet wurde. In Vergleichstests mit unterschiedlichen Bead-Durchmessern mit und ohne Hitzeeinwirkung wurden mit dieser Kombination die besten PCR-Ergebnisse erzielt.

Dennoch konnte auch mit dem optimierten Kugelaufschluss-H die Sensitivität der IGM-Methode nicht erreicht werden. Im Bereich der Nachweisgrenze (10^4 - 10^3 Zellen/ml) waren mit der IGM-Methode in allen Fällen bessere und gleichmäßigere PCR-Resultate zu erreichen. Obwohl das IGM-Verfahren laut Produktbeschreibung nicht zur DNA-Isolation aus Hefen konzipiert ist, konnte ein Transfer von Bakterien- auf Hefezellen erfolgreich durchgeführt werden.

Die IGM-Methode lieferte somit bei den auf Zentrifugation basierten Verfahren sowohl bei Hefen als auch Bakterien die verlässlichsten PCR-Ergebnisse. Außer für filtrierbare Proben die mit der PCMF-Methode bearbeitet werden, kann der IGM-Aufschluss für alle beschriebenen Probenarten verwendet werden. Das Verfahren ist gesundheitlich unbedenklich, leicht, schnell und kostengünstig durchzuführen und stellt daher ein praxistaugliches Verfahren dar. Da inhibitorische Substanzen gebunden werden können, werden Chelex-basierte Protokolle auch an anderer Stelle als erfolgversprechende DNA-Isolationsmethode für eine breitere Anwendung im Lebensmittelbereich vorgeschlagen

(JOSEFSEN et al. 2004).

Falsch-positive PCR-Befunde, die durch die Detektion von DNA aus toten Zellen resultieren können, sollten mittels EMA-Zugabe vor der DNA-Isolation vermieden werden (NOGVA et al. 2003). Da tote Keime keine weitere Produktschädigung mehr verursachen, können in der Praxis Schwierigkeiten bei der Interpretation von Befunden, z. B. nach einer KZE, entstehen. Dieses Problem stellt einen der Hauptgründe für die mangelnde Akzeptanz der PCR in der mikrobiologischen QS dar (RIJPENS und HERMAN 2002). Für einen selektiven Nachweis lebender Zellen muss EMA freie DNA inaktivieren und spezifisch in tote Zellen eindringen können, um die dort vorhandene DNA zu blockieren.

Die Wirkungsweise von EMA auf freie DNA konnte nachgewiesen werden, indem behandelte und unbehandelte Proben mit PCR untersucht wurden. Von EMA-behandelten Proben war anschließend im Gegensatz zu den unbehandelten kein PCR-Signal mehr zu detektieren.

Uneinheitliche Ergebnisse ergaben sich allerdings bei der Effektivität einer EMA-Behandlung auf tote Zellen. Bei *L. brevis* (BS 40) und *L. lindneri* (BS 4) war eine deutliche Abnahme des PCR-Signals bis hin zu negativen Signalen bei toten Zellen zu beobachten. Die Unterschiede bei den anderen Testkeimen (*L. casei* BS 3, *P. damnosus* BS 41, *Megasphaera cerevisiae* BS 46 und *Pectinatus frisingensis* BS 42) waren weniger ausgeprägt (BS 3, BS 41, BS 46) bzw. nicht erkennbar (BS 42).

Zudem zeigte sich an anderer Stelle, dass eine EMA-Zugabe die PCR-Sensitivität bei der Detektion lebender Zellen herabsetzt (PAWLOWSKY et al. 2006). Dies könnte in der toxischen Wirkung von EMA auf lebende Zellen begründet sein. Die ablaufenden Prozesse bei den unterschiedlichen Stämmen wurden an dieser Stelle jedoch nicht weiter untersucht und müssten in Folgearbeiten eingehender erforscht werden. Möglich wäre hier der Nachweis von MDR-Transportsystemen über Fluoreszenzmessungen (GÄNZLE und VOGEL 2004) oder die Untersuchung einer EMA-Behandlung auf tote und lebende Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Mit den gewählten Bedingungen konnte jedoch keine eindeutige Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen bei allen getesteten Stämmen erzielt werden. Nicht zuletzt wegen des kanzerogenen Potentials von EMA wurden keine weiteren Versuche durchgeführt, da auch von Seiten der Brauereien ein Praxiseinsatz der Substanz ausgeschlossen wurde.

Es empfiehlt sich daher, die erfolgversprechenden Ansätze mittels Reverser-Transkriptase PCR weiter zu verfolgen, da diese eher in der Praxis umgesetzt werden können. Hier ergaben sich jedoch ebenfalls Schwierigkeiten, da das zu analysierende Gen kontinuierlich exprimiert werden muss und das RNA-Transkript möglichst instabil sein

sollte (NOGVA et al. 2003, SUNG et al. 2004). Vor allem mRNA wird in diesem Zusammenhang als geeignetes Molekül für einen Vitalitätstest angesehen, da rRNA und tRNA stabiler als mRNA sind (SHERIDAN et al. 1998, RIJPENS und HERMAN 2002). Der Erfolg der mRNA Reverse-Transkriptase PCR zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wird zudem uneinheitlich bewertet. SUNG et al. (2003) führten Untersuchungen an *Campylobacter* spp. durch und zweifeln an der generellen Tauglichkeit eines Lebend/Tot-Nachweises auf mRNA-Basis. Allerdings berichteten DREIER und KLEESIEK (2004) kürzlich von der erfolgreichen Anwendung einer Reversen Transkriptase Real-Time PCR als Vitalitätsmarker bei *E. coli*. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf bierschädliche Bakterien wird für möglich gehalten, muss allerdings noch belegt werden (DREIER und KLEESIEK 2004).

8.3 PCR-Optimierungen

Durch die Vielzahl an potentiellen PCR-Reaktionbestandteilen ergeben sich zahlreiche Möglichkeiten zur Beeinflussung von PCR-Reaktionen (JOHNSON 2000, MÜLLER 2001). Die Variation der Primerkonzentration im empfohlenen Bereich (0,1-0,5 μM , o. V. 2002) ergab ebenso wie eine Erhöhung über 0,5 μM keine Unterschiede in Sensitivität und Spezifität der getesteten Assays. Die Primerkonzentration wurde daher durchgehend bei 0,5 μM gewählt.

Größere Auswirkungen auf die PCR-Effizienz wurden bei unterschiedlichen MgCl_2 -Konzentrationen beobachtet. Die im PCR-Puffer eingestellte Mg^{2+} -Konzentration (1,5 mM) führte zu einer geringen PCR-Ausbeute, während ansteigende Konzentrationen (2-4 mM) zu verbesserten PCR-Ergebnissen führten. Konzentrationen über 3 mM Mg^{2+} brachten jedoch keine weitere Effizienzzunahme. Um die Spezifität der Assays nicht durch zu hohe Mg^{2+} -Konzentrationen zu verändern (MÜLLER 2001), wurden standardmäßig 3 mM Mg^{2+} verwendet, da hier in keinem Fall die erwartete Spezifität beeinträchtigt wurde.

Als PCR-Enhancer wurde bei allen Reaktionen BSA (100 $\mu\text{g/ml}$) verwendet, da unerwünschte PCR-Inhibitoren beseitigt werden konnten (siehe 8.2).

Bei der Gestaltung von Multiplex-Assays war es möglich, Reporter- und Quencherkombinationen zu einer Fourplex-PCR zu vereinen. Durch die Verwendung von BH-Quenchern war eine Messung in den jeweiligen Fluoreszenzkanälen ohne Beeinträchtigung (cross-talk) durch die anderen Wellenlängenbereiche möglich.

Dennoch sollte bei der Kombination einzelner PCR-Assays zu Multiplex-Systemen berücksichtigt werden, dass Keime oder Keimgruppen zusammengelegt werden. Somit besteht dann nur eine geringe Wahrscheinlichkeit, dass alle Zielkeime gleichzeitig in der

Probe vorliegen. Auf diese Weise kann gewährleistet werden, dass das komplette Spektrum vorhandener Keime detektiert wird.

Die simultane Erfassung mehrerer Organismen stellt eine Konkurrenzsituation um die Enzymaktivität dar. Dieses kann dazu führen, dass ein nur in Spuren vorhandener Keim auf Kosten der stärker ausgeprägten Kontamination unentdeckt bleibt. Diese Tatsache sollte auch beim Einfügen von IAC-DNA berücksichtigt werden, da ansonsten die Sensitivität des Nachweises verschlechtert wird (MALORNY et al. 2003c).

Aus dem gleichen Grund wurde vermieden, Screening- und Identifizierungs-PCR simultan ablaufen zu lassen, da es zusätzlich zur Konkurrenz um die Primerbindestellen kommt.

Zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur hat es sich bewährt, für alle Systeme eine Temperaturgradienten-PCR durchzuführen, da es zu Abweichungen von der rechnerisch ermittelten Temperatur kommen kann (LUNGE et al. 2002, ELNIFRO et al. 2000). Nur auf diese Weise können die tatsächlich stattfindenden Wechselwirkungen zwischen Primer, Sonde und DNA aufgeklärt werden. Auf Basis der Gradienten-PCR wurden für einige der Systeme an Stelle von 2-Step Temperaturprotokollen optimierte 3-Step Protokolle mit verkürzter Annealingphase und zusätzlicher Elongationsphase bei erhöhter Temperatur angewendet (Kapitel 6, Tab. 38).

Um falsch-negative Reaktionen aufgrund von PCR-Inhibition ausschließen bzw. erkennen zu können, wurden die Auswirkungen einer IAC auf verschiedene Primer-Systeme erprobt. Die in 5.4 beschriebene Vorgehensweise zur Integration einer IAC in bestimmte PCR-Systeme konnte erfolgreich umgesetzt werden. Die Sensitivität der entsprechenden PCR-Assays wurde aufgrund der kompetitiven Effekte nicht bzw. nur geringfügig beeinträchtigt. Zum Routineeinsatz in Brauereien oder für eine kommerzielle Nutzung der PCR-Assays sollten aber dennoch künstliche DNA-Fragmente, z. B. pUC-Plasmidvektoren als IAC verwendet werden. Im vorliegenden Fall ging es jedoch in erster Linie darum, die Abhängigkeiten zwischen Sensitivität des Meßsystems und Stärke des IAC-Signals zu bestätigen (MALORNY et al. 2003c). Es hat sich bewährt, die IAC knapp über der Nachweisgrenze zu dosieren, so dass negative Auswirkungen auf die PCR-Sensitivität vermieden werden. Durch eine geringe IAC-Konzentration sind auch geringe inhibitorische Effekte leichter erkennbar, da es schneller zum Ausbleiben des IAC-Signals kommt (BURKARDT 2000).

8.4 PCR-Assays

Zur gruppen- und speziesspezifischen Detektion bierschädlicher Bakterien wurden verschiedene Real-Time PCR Assays basierend auf TaqMan-Format entwickelt. Zielsequenz

für die Bakterienassays stellte die 16S rDNA dar, was in allen Fällen zu den erwarteten Spezifitäten führte.

Dennoch bleibt festzuhalten, dass anhand einer 16S rDNA-basierten PCR keine Aussage über die Bierschädlichkeit eines Milchsäurebakteriums möglich ist. Erfolgversprechendere Ansätze könnten hier PCR-Assays liefern, die auf die bisher aufgeklärten DNA-Sequenzen der Hopfenresistenzmechanismen abzielen (GÄNZLE und VOGEL 2004, SUZUKI et al. 2004b, SUZUKI et al. 2004c, SUZUKI et al. 2004d). Diesbezügliche Versuche sind derzeit Gegenstand von weiterführenden Arbeiten.

Mit dem sLP600 System werden, mit Ausnahme von *L. perolens*, alle obligat und potentiell schädlichen Laktobazillen und Pediokokken erfasst. Kreuzreaktionen mit Nicht-Zielkeimen wurden nicht beobachtet. Die Nachweisgrenze lag bei 0,5-0,05 pg Rein-DNA bzw. $7 \cdot 10^2$ Zellen/ml. Neben potentiell und obligat schädlichen Milchsäurebakterien können auch einige brauereifremde Laktobazillen erfasst werden, was allerdings in Verbindung mit der beschriebenen optimierten Anreicherung unwahrscheinlich ist.

Bei Integration einer IAC wurden identische oder nur geringfügig schlechtere Sensitivitäten und PCR-Effizienzen im Vergleich zum sLP600-System ohne IAC festgestellt.

Die Identifizierungsassays für Milchsäurebakterien erzielten ebenfalls die erwarteten Spezifitäten. Die Assays iLbr, iLcor, iLli, iLpe und iPda erwiesen sich als hochspezifisch für den betreffenden Zielkeim. Mit den Systemen iLbu, iLca, iLcol und iLpl wurden die Zielkeime und phylogenetisch engverwandte Milchsäurebakterien detektiert, die aufgrund ihrer taxonomischen Stellung zu Gruppen zusammengefasst sind.

Die Wahl eines spezifischen Vorwärtsprimers bei gleichzeitiger Verwendung eines universellen Rückwärtsprimers und einer universellen Sonde erwies sich somit als erfolgreiche Strategie zur Gestaltung von Identifizierungsassays. Allerdings wurden unterschiedlich stark ausgeprägte Fluoreszenzanstiege bei den PCR-Signalen der Identifizierungen beobachtet. Dies liegt wahrscheinlich in der unterschiedlichen Entfernung der jeweiligen Vorwärtsprimer zur Sonde. Diese sollte bei TaqMan-Assays möglichst gering sein, um optimale Fluoreszenzanstiege realisieren zu können (LUNGE et al. 2002). Zur weiteren Optimierung der Systeme müssten daher individuell gestaltete Sonden eingesetzt werden, was an dieser Stelle aus Kostengründen jedoch nicht durchgeführt wurde.

Die Sensitivitäten der Identifizierungen lagen zwischen 0,5-2,0 pg Rein-DNA bzw. $8 \cdot 10^2$ - $5 \cdot 10^3$ Zellen/ml des entsprechenden Zielkeims.

Zum Nachweis von *Pectinatus* spp. und *Megasphaera cerevisiae* wurde das sPM Screening-System entwickelt. Da beide Keime obligate Bierschädlinge sind und eine Kontami-

nation mit diesen Organismen auf jeden Fall zu verhindern bzw. zu beseitigen ist, fand keine getrennte Detektion der Keime statt.

Mit dem sPM-System konnten alle gewünschten Zielkeime erfasst werden. Die Nachweisgrenze lag bei 0,5 pg DNA bzw. $8 \cdot 10^2$ Zellen/ml.

Um ein vergleichbares Detektionsspektrum zu einem bereits kommerziell existierenden PCR-Kit zu schaffen (KIEHNE et al. 2003), wurden das sLP600 und das sPM-System zum sLPPM-System kombiniert und auf der HEX-Wellenlänge mit dem Ctr-Assays eine IAC integriert. Die Detektion der Milchsäurebakterien erfolgte bei FAM, während die strikt anaeroben Keime bei ROX erfasst wurden.

Die Spezifität des Multiplex-Assays war unverändert zu den entsprechenden Einzelsystemen. Die Sensitivität wurde durch die Kombination der unterschiedlichen Systeme nicht negativ beeinflusst. DREIER und KLEESIEK (2004) berichten ebenfalls, dass die Sensitivität der Einzelsysteme durch Multiplex-Assays unverändert bleibt. Eine generelle Sensitivitätsverschlechterung bei Multiplexansätzen, wie von BISCHOFF (2001) vermutet, ist somit nicht zwangsläufig die Folge. Vielmehr gilt es, die Kompatibilität und Kombinierbarkeit verschiedener Primer und Sonden in den betreffenden Einzelfällen empirisch zu überprüfen.

Die Kombination der Identifizierungen iLbr, iLca und iPda zu einem kleineren Screening-System (iLbcp) ergab geringfügig schlechtere Sensitivitäten verglichen mit den Einzelsystemen. Dies kann allerdings auch in der zusätzlichen Integration der IAC begründet sein. Dennoch bestehen hier durch Hinzufügen oder Entfernen der betreffenden Vorwärtsprimer gute Möglichkeiten, die Spezifität nach Bedarf zu variieren. Durch Einfügen weiterer Primer kann somit ausgehend von Identifizierungsassays ein Screening-System für bierschädliche Milchsäurebakterien gestaltet werden, das eine spezifischere Aussage als das sLP600-System liefert. Zudem könnte durch die Verwendung mehrerer Sonden mit unterschiedlichen Reporterfarbstoffen eine separate Detektion bei unterschiedlichen Wellenlängen erfolgen.

Zum PCR-Nachweis von Hefen wurden Identifizierungssysteme für Kultur- und Fremdhefen entwickelt. Mit Ausnahme des Sdi- und des UG300-Systems sind alle Primer und Sonden in der ITS1-5.8S rDNA-Region der betreffenden Hefen lokalisiert.

Das Sce-Assay ermöglicht den Nachweis von ober- und untergärigen Brauhefen. *S. cerevisiae*-Varietäten sowie *S. paradoxus*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. uvarum* sowie alle NS-FH werden nicht detektiert.

Die Nachweisgrenze des Sce-Systems liegt bei 500 fg Rein-DNA (WHB 68) und Hefezellen konnten bis zu $4 \cdot 10^3$ Zellen/ml erfasst werden.

Parallel zum Sce-Assay wurde das Sbp-Assay entwickelt, das den Nachweis von *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. uvarum* und untergärigen Brauhefen ermöglicht. Durch die Detektion untergäriger Brauhefen konnte bestätigt werden, dass es sich bei untergärigen Hefen um ein Hybrid aus *S. cerevisiae* und *S. bayanus* oder *S. pastorianus* handelt (CASAREGOLA et al. 2001). Allerdings deutete die Sequenzierung untergäriger Brauhefen an der entsprechenden Stelle im Vorfeld auf einen rein obergärigen Charakter hin.

Anhand der PCR-C_t-Werte war zudem ersichtlich, dass der *S. bayanus/S.pastorianus*-Anteil in untergärigen Brauhefen im Vergleich zu Typstämmen von *S. bayanus* oder *S. pastorianus* weniger stark ausgeprägt ist. Dadurch kann bei Untersuchung definierter Mengen an Rein-DNA schon eine Unterscheidung zwischen untergärigen Kulturhefen und Typstämmen getroffen werden.

Die Sensitivität des Sbp-Systems lag bei 1,0-0,1 pg Rein-DNA (*S. bayanus* DSM 70412) und bei der Untersuchung einer Zell-Verdünnungsreihe konnten noch $2 \cdot 10^3$ Zellen/ml detektiert werden.

Das UG300-System weist eine nahezu identische Spezifität zum Sbp-Assay auf. Lediglich beim Nachweis von *S. bayanus* wurden Unterschiede festgestellt, da zwei der vier getesteten Stämme nicht erfasst wurden. Somit konnte auch mit diesem Assay keine eindeutige Unterscheidung zwischen *S. bayanus* und *S. pastorianus* erzielt werden. Eine Differenzierung dieser beiden Hefen war auch mit PCR/RFLP nicht möglich (MORAKILE et al. 2002, MONTROCHER et al. 1998). Ein weitergehender Ansatz wird jedoch von TORRIANI et al. (2004) berichtet, denen eine auf Standard-PCR basierte Unterscheidung der beiden Hefen gelang.

Das UG300-System wies eine Sensitivität von 1 pg Rein-DNA (WHB 34/70) und $6 \cdot 10^3$ Zellen/ml auf. Zum Spurennachweis von untergärigen Kulturhefen ist das UG300-System dem Sbp-Assay vorzuziehen, da der *S. bayanus/S. pastorianus*-Anteil in Kulturhefen nur schwach ausgeprägt ist.

Mit den zur Verfügung stehenden PCR-Assays können Hefe-Reinkulturen somit eindeutig als ober- oder untergärige Kulturhefen identifiziert werden. Die Abgrenzung zu untergärigen Typstämmen wie *S. pastorianus*, *S. bayanus* und *S. uvarum* ist ebenfalls möglich.

Weiterhin kann eine Verunreinigung einer obergärigen Anstellhefe mit untergäriger Hefe festgestellt werden. Der umgekehrte Weg, eine untergärige Hefepopulation auf die Anwesenheit von obergärigen Hefen zu untersuchen, ist mit den vorliegenden PCR-Assays aufgrund des Hybrid-Ursprungs von untergärigen Brauhefen nicht möglich.

Für die weitergehende Differenzierung untergäriger Brauhefen auf Stammebene stehen

noch keine Real-Time PCR Systeme zur Verfügung. Die bisher erfolgreichsten Resultate wurden mit Mikrosatelliten-PCR und AFLP erzielt (RASSMANN und LEIBHARD 1999, SCHERER 2002, SCHÖNEBORN 2001). Allerdings könnten mit denen von SCHERER (2002) beschriebenen Methoden der subtraktiven Hybridisierung oder AFLP auch stamm-spezifische PCR-Assays entwickelt werden.

Zum Nachweis von *S. diastaticus* wurde das *sta1*-Gen von *S. diastaticus* verwendet. Dieses Gen codiert eine extrazelluläre Glucoamylase und bietet somit die Möglichkeit, übervergärende Hefen von Kulturhefen zu differenzieren. Sowohl ober- als auch untergäringe Kulturhefen wurden mit dem Sdi-Assay nicht nachgewiesen. Ein spezifischer Nachweis von *S. diastaticus* in gemischten Populationen war somit ohne einen nachträglichen Einsatz von Selektivmedien möglich.

Der Nachweis von *S. diastaticus* Rein-DNA war bis zu einer Menge von 1 pg möglich. Zellen konnten bis zu einer Konzentration von $5 \cdot 10^3$ Zellen/ml detektiert werden.

Die Identifizierungssysteme für häufig auftretende NS-FH waren in der ITS1-5.8S Region der betreffenden Hefen lokalisiert. Die Nachweissysteme für *Candida tropicalis*, *Dekkera anomala*, *Dekkera bruxellensis*, *Pichia anomala*, *Pichia membranefaciens*, *Saccharomyces ludwigii* und *Saccharomyces exiguus* sind ähnlich gestaltet wie die Identifizierungssysteme für Bakterien. Die für alle Hefen (S-FH und NS-FH) universell verwendbare Sonde Y58 und die Rückwärtsprimer waren jeweils in der konservierten 5.8S-Region platziert, während die Vorwärtsprimer im hochvariablen ITS1-Abschnitt gewählt wurden.

Die Sensitivitäten der einzelnen Assays lagen zwischen 0,5-1,0 pg der entsprechenden Rein-DNA. Der Nachweis von Zellen war bis zu Konzentrationen von $6 \cdot 10^2$ bis $5 \cdot 10^3$ Zellen/ml möglich.

Bei den Fremdhefesystemen wurden die am schädlichsten eingestuft Hefen zu einer Multiplex-PCR (System: sSdD) zusammengefaßt. Neben der Detektion von *S. diastaticus* (FAM) und *Dekkera anomala/Dekkera bruxellensis* (HEX), kam zusätzlich eine IAC (sPM-Assay) zum Einsatz, die auf dem ROX-Kanal gemessen wurde.

Mit dem kombinierten System ließen sich im Vergleich mit den Einzelsystemen nahezu identische Effizienzen und Sensitivitäten beim Nachweis von Rein-DNA erzielen.

Zur Angabe der Sensitivität von PCR-Systemen muss abschließend erwähnt werden, dass PCR-Nachweisgrenzen von 10^2 - 10^3 Zellen/ml in Einklang stehen mit den Ergebnissen anderer Veröffentlichungen (RIJPENS und HERMAN 2002, MALORNY et al. 2003c). Da es bei der Probenverarbeitung zu Verlusten kommt und immer nur ein Bruchteil des

DNA-Isolats für die PCR-Reaktion verwendet wird, sind der Nachweisempfindlichkeit in der Praxis hier Grenzen gesetzt. Die geforderte Nachweisempfindlichkeit von 1 Keim/Probe ist mit den derzeitigen PCR-Methoden somit nicht zu garantieren.

8.5 Schlussfolgerungen der Brauereiversuche

Bei der Untersuchung von Proben aus dem Filtratbereich in Phase 1 waren bei den Standard PCR-Anwendern viele PCR-Reaktionen aufgrund von Inhibitionen nicht auswertbar. Die Real-Time PCR-Systeme, vor allem das LightCycler-System, erwies sich dagegen als sehr robust gegen inhibitorische Effekte. Dies dürfte in der Zugabe von PCR-Enhancern zu den Real-Time PCR Polymerasen begründet sein, was sich in den BSA-Versuchen (4.3.1.2.2) bestätigt hat.

Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Interpretation von Analysendaten wurden die LightCycler-Kits während der Phase 1 modifiziert. Bedingt durch unspezifische positive Signale bei negativen Proben, musste das Detektionsformat geändert werden. Dies führte zu einer Verbesserung der Auswertung und zu einer eindeutigen Interpretation von Quantifizierungs- und Schmelzkurven. Allerdings war dadurch keine simultane Detektion von Laktobazillen/Pediokokken und *Megasphaera/Pectinatus* mehr möglich, da diese beiden Organismengruppen durch die Umstellung in getrennten Reaktionen erfasst wurden.

Die TaqMan-PCR Assays waren von Beginn an problemfrei auszuwerten. Allerdings konnte auch hier nur eine getrennte Detektion von Laktobazillen/Pediokokken und *Pectinatus/Megasphaera* durchgeführt werden, was aber in erster Linie durch die Geräte-Hardware bedingt war. Mit dem in den Brauerei-Tests verwendeten Real-Time PCR-Cycler (ABI Prism 7000) war die Detektion auf eine Duplexmessung beschränkt. Da immer ein Fluoreszenzkanal für die IAC vorgesehen war (VIC bzw. HEX), konnte die Detektion daher nur auf dem verbliebenden Kanal (FAM) erfolgen. Mittlerweile wird auch von diesem Hersteller die oben erwähnte Fourplex-PCR angeboten, wodurch die Bandbreite einer einzigen PCR-Reaktion erweitert werden kann.

Die Kombination eines Laktobazillen/Pediokokken-Systems (sLP600) mit einem *Pectinatus/Megasphaera*-System (sPM) auf TaqMan-Format konnte mit dem unter 6.1.4 erwähnten sLPPM-System verwirklicht werden. Zudem zeigte sich aus den Erfahrungen mit den am Lehrstuhl neu entwickelten Assays und anhand der Brauerei-Tests, dass sich TaqMan-PCR Assays besser zur Kombination und zur Gestaltung von Multiplex-PCR Systemen eignen als die komplexer aufgebauten LightCycler-Assays. Bei letzteren kam es bei der Kombination zweier getrennter Systeme zu den bereits erwähnten unspezifischen Signalen, die bei der oben erwähnten Kombination von TaqMan-Assays in keinem der Fälle beobachtet wurde.

Als großer Vorteil des LightCycler-Systems wurde dagegen die Möglichkeit zur Schmelz-

kurvenanalytik angesehen, die bei einem positiven Befund eine Quantifizierung und eine nachträgliche Identifizierung während einer einzigen PCR ermöglicht (KIEHNE et al. 2003). Bei Anwendung des TaqMan-Formates wären hierzu mindestens zwei getrennte PCR-Reaktionen notwendig (positives Screening + nachfolgende Identifizierung). Dennoch wurden die am Lehrstuhl entwickelten PCR-Assays aus Kostengründen ausschließlich auf TaqMan-Format entwickelt. Die Gesamtkosten an Verbrauchsmaterial und PCR-Chemikalien bei dieser Form der PCR beliefen sich auf 1,0-1,4 €/Reaktion, während eine LightCycler-PCR bei 2,7-3,2 €/Reaktion liegt.

Beim Vergleich von Standard PCR und Real-Time PCR mit der jeweiligen Routinemethode ergaben sich bei den Real-Time PCR-Anwendern bessere Werte bei der relativen Übereinstimmung und der relativen Spezifität. Die relative Sensitivität war bei den Standard PCR Formaten vergleichbar mit denen der Real-Time PCR.

Dennoch wurde bei der abschließenden Bewertung der Methoden anhand der Fragebögen deutlich, dass Real-Time PCR für einen Einsatz in der Routineanalytik deutliche Vorteile gegenüber der Standard PCR bietet. Der Wegfall einer elektrophoretischen Auswertung bei der Real-Time PCR beschleunigt die Analyse und senkt die Fehlerwahrscheinlichkeit, da zusätzliches Probenhandling vermieden wird. Zudem besteht nach der PCR keine Gefahr der Verschleppung von PCR-Produkten, wodurch die Gefahr falsch-positiver Befunde durch DNA-Kontamination gesenkt wird. Diese Punkte spiegelten sich letztendlich in einer schlechteren relativen Übereinstimmung und Spezifität der Standard PCR wider. Vor allem in Brauerei 5 konnte mit der angewandten Standard PCR keine befriedigende Übereinstimmung zwischen Routinemethode und PCR hergestellt werden.

Da sich die Real-Time PCR Methoden als erfolgversprechender erwiesen, wurde während Phase 2 keine Standard PCR mehr eingesetzt. Die Mehrzahl der befragten Aspekte zur PCR in Phase 1 (Benutzerfreundlichkeit, Verlässlichkeit, Sensitivität, Umsetzung, Vertrauen, Interpretation) wurden von den Real-Time PCR Anwendern positiv gewertet.

Nur die Aspekte Arbeitssicherheit und Kosten wurden mit „befriedigend“ bzw. „schlecht“ gewertet. Die Verwendung von Chloroform bei der DNA-Isolation (PCMF-Aufschluss) führte zu Bedenken aus Sicht der Arbeitssicherheit. Hier könnte als Alternative das IGM-Verfahren angewendet werden, was allerdings mit einer Voranreicherung als essentiellen Bestandteil der Analyse verbunden ist. Mit den unter 4.3.1.3 und 4.3.2.2 festgestellten Nachweisgrenzen von ca. 10^3 Zellen/filtrierter Probe (PCMF) und ca. 10^3 Zellen/ml (IGM) könnte mit dem PCMF-Verfahren am ehesten ohne eine Voranreicherung gearbeitet werden. Zur Vermeidung der Voranreicherung wurde von HUTTER et al. (2003) ein ähnlicher Ansatz verfolgt, bei dem die Zellsammlung mittels wiederverwendbarer Mikrosiebe statt-

fund. Allerdings war die Filtrationskapazität der Mikrofilter begrenzt (20-30 ml) und Versuche hinsichtlich der PCR-Nachweisgrenzen fanden mit der beschriebenen Methode nicht statt.

Ähnlich wie schon bei der Voranreicherung entstand somit auch bei der Probenverarbeitung eine Konkurrenzsituation, wobei hier die Ziele Schnelligkeit und Sensitivität in Einklang gebracht werden mussten. Sensitive Methoden, wie PCMF erfordern zeit- und personalintensives Handling, wodurch der Probendurchsatz limitiert wird. Probenaufbereitungen auf Basis von Zentrifugation (IGM, Kugelaufschluss-B) sind dagegen schneller durchzuführen, wobei eine ausreichende Sensitivität im Spurenbereich nur durch eine Voranreicherung erreicht werden kann.

Eine erfolgversprechende Weiterentwicklung bei der Probenaufarbeitung bzw. DNA-Isolation stellen automatisierte Systeme dar (METHNER et al. 2004), die im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht getestet wurden. Durch den Einsatz von Pipettierrobotern werden manuelle Pipettierschwankungen vermieden, was zu einer Verbesserung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit führt. Ein Nachweis von 10^2 Zellen/ml war mit dieser Probenaufbereitung bei jedem untersuchten Keim möglich. Außerdem wird eine Reduzierung des Personaleinsatzes erreicht, was die Umsetzbarkeit in die betriebliche Praxis verbessert. Zur Erhöhung der Nachweissicherheit wird vor der PCR jedoch ebenfalls eine kulturelle Voranreicherung angewendet.

Die Voranreicherung mit 2x MRSF + Bier im Verhältnis 1:1 wurde von den Brauereien prinzipiell als geeignet bewertet. Um die Nachweisempfindlichkeit zu erhöhen, sollte aber das Probenvolumen erhöht oder das unter 4.1.4 beschriebene Verfahren angewendet werden. Mit der Verwendung von bereits etablierten Medien wie NBB-C, NBB-B oder MRS wird auch dem vorläufigen Entwurf zur Durchführung von PCR-Tests Rechnung getragen (ISO/DIS 22174). Demnach sollten die der PCR vorgeschalteten Anreicherungsschritte so weit wie möglich der Routinemethode entsprechen, um die Umsetzung im Labor zu erleichtern. Zudem sollte eine Möglichkeit zur nachträglichen kulturellen Bestätigung des PCR-Ergebnisses anhand derselben Probe möglich sein (JOSEFSEN et al. 2004).

Während Phase 2 bestätigten sich viele der Erkenntnisse aus Phase 1. LightCycler-PCR erwies sich auch bei Unfiltratproben als sehr robust gegen PCR-Inhibition.

Als großer Vorteil wurde erneut die Spezifität der PCR festgestellt, während die Sensitivität bei einer dreitägigen Voranreicherung nicht in allen Fällen zufriedenstellend war. Ein

zusätzlicher Anreicherungstag führte zu einer deutlichen Verbesserung in der Nachweis-sicherheit und zu einer besseren Übereinstimmung zwischen PCR und Routinemethode. Bei Brauerei 2 erwies sich die PCR-Methode in Bezug auf Spezifität und Sensitivität als deutlich überlegen im Vergleich zur Routinemethode, weshalb sich PCR für Unfiltratproben als künftige Standardmethode etablierte.

Da bei der Probenverarbeitung für Unfiltratproben kein Chloroform zum Einsatz kam, wurden im Vergleich zu Phase 1 nur noch die Kosten als negativ bewertet, während die Arbeitssicherheit jetzt positiv eingestuft wurde.

Nach beiden Phasen kann abschließend festgehalten werden, dass das Haupteinsatzgebiet für die PCR-Analytik von Seiten der Brauereien in der Identifizierung von Befunden aus der Routineanalytik, in der Lokalisierung von Kontaminationsquellen und in der verstärkten Untersuchung von Proben aus sensitiven Bereichen gesehen wird (Anstellhefe, Filtrat, Abfüllung). Einer Ausweitung der Analytik sind vor allem aufgrund der Kosten und der zeitintensiveren Probenaufbereitung für eine PCR Grenzen gesetzt. Eine Erhöhung des Analysenumfanges wäre nur bei konkreten Verdachtsmomenten denkbar und gerechtfertigt. Vor allem die sehr hohen laufenden Kosten wurden bemängelt, die sich bei Verwendung kommerzieller Kits auf ca. 12 €/Reaktion belaufen. Zusätzlich sind weitere Aufwendungen für Polymerase und sonstige Verbrauchsmaterialien in Höhe von 1-3 €/Reaktion zu berücksichtigen. Bei Verwendung nicht-kommerzieller PCR-Assays könnten die Kosten um ca. 70-90 % pro PCR-Reaktion gesenkt werden und somit zu einer besseren Akzeptanz der Methode beitragen.

Der Hauptnutzen der PCR ist in den verbesserten Identifizierungsmöglichkeiten im Vergleich zur konventionellen Analytik zu sehen. Für bierschädliche Bakterien sowie für Kultur- und Fremdhefen existieren kommerzielle und nicht-kommerzielle Real-Time PCR-Nachweissysteme. PCR kann die klassische Mikrobiologie somit durch einen verbesserten Informationsgehalt ergänzen. Allerdings sollten alternative Nachweismethoden (PCR, fluoreszenzmarkierte Sonden) nicht als „Wunderwaffen“ betrachtet werden, vor allem dann, wenn sie zum Schnelldiagnose eingesetzt werden. In der mikrobiologischen QS genügt es nicht allein, durch den Einsatz moderner Nachweismethoden möglichst rasche Ergebnisse zu erzielen (SCHMIDT 1993). Zusätzlich muss ein Befund auch sicher beurteilt werden können, damit eine Bewertung des Gefährdungspotentials möglich ist.

Da für einen sicheren Nachweis eine Mindestzellzahl vorliegen muss, kann es hier zu Fällen kommen, bei denen Spurenkontaminationen unentdeckt bleiben. Beim Einsatz dieser Verfahren als Schnellmethoden gilt es daher, Probennahme, Voranreicherung und Probenverarbeitung zu optimieren, um nicht durch unsachgemäßes Handling falsche Er-

gebnisse zu erzielen. Deshalb ist es entscheidend, sich über die Leistungsfähigkeit der einzelnen Methoden im Klaren zu sein und diese als sinnvolle Ergänzung zur herkömmlichen Analytik einzusetzen. Ein vollständiger Ersatz der konventionellen QS-Methoden durch PCR oder eine andere Schnellmethode ist derzeit nicht denkbar.

Die Versuche in den Brauereien haben vielmehr gezeigt, dass für eine praxisgerechte Umsetzung einer PCR-Schnellmethode eine sinnvolle Kombination mit kulturellen Methoden erfordert. Eine effektiv gestaltete Voranreicherung ist weiterhin zu empfehlen und trägt dazu bei, dass die Gefahr falsch-positiver und falsch-negativer Befunde herabgesetzt wird. Andere Methoden zur Etablierung eines Lebend/Tot-Nachweises mittels PCR, z. B. auf Basis von Reverse-Transkriptase PCR müssen jedoch weiterhin auf ihre Tauglichkeit hin untersucht werden (DREIER und KLEESIEK 2004).

Zudem muss bei der PCR-Anwendung zwischen Zeitdauer bis zum Analysenergebnis, die mit PCR verkürzt wird, und direkter Arbeitszeit an der Probe (hands-on-time) unterschieden werden. Ohne eine automatisierte Probenverarbeitung liegt der Arbeits- und Personalaufwand im Vergleich zu konventionellen Methoden höher.

Falls keine automatisierte Probenverarbeitung möglich ist, muss bei der organisatorischen Gestaltung der Analytik berücksichtigt werden, dass die sensitivsten Methoden, wie z. B. PCMF, aus Zeitgründen nur zu einem bestimmten Maß in der Praxis umgesetzt werden können. Hier gilt es, einen Kompromiss zu treffen zwischen erwünschter Sensitivität und vertretbarem Arbeits- und Zeitaufwand.

Trotz des erhöhten Zeitbedarfs und der Komplexität der Methode, war die prinzipielle Durchführung und Integration der PCR dennoch in allen Brauereien möglich. Auch Personal ohne molekularbiologische Vorkenntnisse war in der Lage, die für eine PCR notwendigen Arbeitsschritte selbständig durchzuführen und die Ergebnisse anschließend auszuwerten. Vor allem die Einführung der Real-Time PCR anstelle von Standard PCR trug zu einer besseren Umsetzung bei.

9 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden entwickelt, um die mikrobiologische QS von Brauereien durch einen optimierten PCR-Einsatz zu verbessern.

In Kooperation mit Brauereien wurden die verschiedenen Teilbereiche einer PCR-Analyse wie Voranreicherung, Probenverarbeitung sowie unterschiedliche PCR-Formate getestet, optimiert und anschließend bewertet.

Die Integration der Methode in die betriebliche Praxis konnte mittels Real-Time PCR am besten umgesetzt werden. Mit Real-Time PCR wurden in den Brauereien schnellere und verlässlichere Ergebnisse erzielt als mit Standard PCR.

Im Vergleich zu der auf kultureller Anreicherung basierten Routinemikrobiologie ist der Hauptvorteil der PCR-Analytik in den verbesserten Identifizierungsmöglichkeiten zu sehen. Aufgrund der hohen Spezifität bietet die PCR wertvolle Hilfe bei der Suche nach Kontaminationsquellen und bei der exakten Bewertung von Befunden. Im Rahmen der Arbeit wurden für bierschädliche Bakterien sowie für Brau- und Fremdhefen gruppen- und speziesspezifische Real-Time PCR-Systeme (TaqMan-PCR) entwickelt. Mit den beschriebenen Assays wird der Großteil der relevanten Brauerei-Mikroflora abgedeckt. Zudem eigneten sich einige der Systeme für Multiplex-Messungen, wodurch mehrere Organismen simultan nachgewiesen werden konnten.

Zur Erreichung einer ausreichenden Sensitivität und für eine praxisgerechte Umsetzung ist eine Kombination mit einer effektiv gestalteten „halb-selektiven“ Voranreicherung empfehlenswert. Die Gefahr falsch-positiver und falsch-negativer Befunde wird somit herabgesetzt. Je nach Probenart oder Probenverarbeitung wurde eine Nachweisgrenze von ca. 10^3 Keimen/Probe oder 10^3 Keimen/ml erreicht. Zum Einsatz als Schnellnachweismethode müssen die der PCR vorausgehenden Schritte wie Probennahme, Voranreicherung und Probenverarbeitung optimiert werden, um nicht durch unsachgemäße Vorgehensweisen falsche Ergebnisse zu erzielen.

Ein Ersatz der konventionellen QS-Methoden durch PCR oder eine andere Schnellmethode ist zur Zeit nicht denkbar. Vielmehr sollte von Seiten der Brauereien versucht werden, die Vorteile von konventionellen Methoden mit den Vorteilen der PCR zu kombinieren. Eine Ausweitung der PCR-Analytik ist vor allem aufgrund der hohen Kosten und der zeitintensiveren Probenaufbereitung limitiert. Allerdings könnten die laufenden Kosten bei Verwendung nicht-kommerzieller PCR-Assays deutlich gesenkt werden, was zu einer besseren Akzeptanz der Methode beitragen könnte.

Für alle Probenarten konnten Bearbeitungsprotokolle entwickelt werden, die sich im Routinebetrieb umsetzen lassen. Zudem konnte die Anfälligkeit der PCR gegenüber Inhibitoren durch den Zusatz von BSA beseitigt werden.

Bei der Integration der PCR ist zu berücksichtigen, dass Analysengeschwindigkeit und

Spezifität bzw. Sensitivität vor allem bei der Voranreicherung und bei der DNA-Isolation konkurrierende Ziele darstellen. Daher muss zwischen Zeitdauer bis zum Analyseergebnis und Arbeitsaufwand an der Probe (hands-on-time) unterschieden werden. Falls keine personalsparende automatisierte Probenverarbeitung zur Verfügung steht, muss ein Kompromiss getroffen werden zwischen erwünschter Sensitivität und vertretbarem Arbeits- und Zeitaufwand.

Trotz der Komplexität der Methode war die prinzipielle Durchführung und Integration der PCR in allen Brauereien möglich. Auch Personal ohne molekularbiologische Vorkenntnisse war in der Lage, die für eine PCR notwendigen Arbeitsschritte selbständig durchzuführen und die Ergebnisse anschließend auszuwerten.

10 Summary

The main focus of the present work was the improvement of microbiological quality assurance in breweries by optimising PCR-based detection methods.

In cooperation with several breweries various aspects related with PCR like pre-enrichment, sample treatment and different PCR formats were optimised and evaluated subsequently.

Due to its convenient integration into laboratory routine, Real-Time PCR proved itself to be the method best suited for this purpose. Compared to Standard PCR the results achieved with Real-Time PCR were considerably faster and more reliable.

Especially the improvement in the identification process of microorganisms turned out to be the main advantage when using PCR instead of conventional microbiological methods, which are mostly based on cultivation. Due to the high specificity of the method, PCR was very helpful for tracing back infection sites or evaluating microbiological findings. Real-Time PCR assays were developed for beer spoilage bacteria as well as for brewing yeasts and wild yeasts. With these assays a major part of the microorganisms, which are of importance for brewing industry, can be detected. Moreover, the PCR-systems can be designed in a way so that multiplexing and therefore simultaneous detection of several microorganisms becomes possible.

In order to achieve a sufficient sensitivity and to implement PCR according to practical requirements, it is recommended to combine the method with a "half-selective" pre-enrichment. Thus, the risk of false-negative or false-positive results can be minimised. Depending on the sample type or the sample treatment, detection limits of approx. 10^3 germs/sample or 10^3 germs/ml could be obtained. When utilising PCR as a rapid method the preceding steps like sampling, pre-enrichment and sample treatment must be optimised. Otherwise inappropriate procedures might cause incorrect results.

The complete replacement of conventional quality assurance methods by PCR or any other rapid method is not yet conceivable at the moment. In this context, breweries should combine the advantages of both techniques PCR and conventional approaches. Especially high costs as well as time-consuming sample treatment hinder an increased implementation of PCR systems in breweries. However running costs can be reduced substantially by employing non-commercial PCR-Assays, which might improve the overall acceptance.

Treatment protocols for all kinds of samples could be developed. All of these approaches were designed for implementation into routine operation. Moreover, the susceptibility to PCR inhibition was removed by adding BSA.

When integrating PCR into microbiological laboratories, it must be taken into consideration that the speed of the analysis and the specificity or sensitivity are competitive objec-

tives. Especially pre-enrichment and DNA isolation are affected by this matter of fact. Therefore, a differentiation must be made between time-to-result and hands-on-time necessary to prepare the sample. If it is not possible to establish automatic sample handling, a compromise between the required sensitivity and the acceptable time frame and effort must be made.

In spite of the complexity of the method, implementation and integration into laboratories were possible in all the breweries involved. Even personnel with no precognition in molecular biology was able to carry out all the necessary analysis steps single-handed and interpret the results subsequently.

11 Literaturverzeichnis

- Ammon, S., Lögtenborger, H.-J., Tretzel, J. (2004): Schnell, sicher, selektiv. *Brauwelt* **12**: 333-335.
- Back, W. (1994): Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, Teil 1. Verlag Hans Carl, Nürnberg.
- Back, W., Pöschl, P. (1998): Bypass-Membranfiltration (BM-System) – Verbesserung des Spurennachweises nach der Filtration. *Brauwelt* **46/47**: 2312-2315.
- Back, W. (2003): Biofilme in der Brauerei- und Getränkeindustrie. *Brauwelt Online* **24/25**: 1-5.
- Baleiras Couto, M.M., Eijmsa, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.J., van der Vossen, J.M.B.M. (1995): Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(1)**: 41-46.
- Barszczewski, W., Robak, M. (2004): Differentiation of contaminating yeasts in brewery by PCR-based techniques. *Food Microbiol.* **21**: 227-231.
- Bischoff, E. (2001): Schnelldiagnose von bierschädlichen Bakterien mit PCR. Dissertation. Freising-Weihenstephan.
- Bischoff, E., Bohak I., Back, W., Leibhard, S. (2001): Schnelldiagnose von bierschädlichen Bakterien mit PCR und universellen Primern. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **1/2**: 4-8.
- Blast, E. (1999): Mikrobiologische Methoden. Kap. 5.1. Nährböden. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Boulton, C., Quain, D. (2001): Brewing yeast and fermentation. Chapter 8: Microbiology. Blackwell Science, Oxford.
- Brandl, A., Geiger, E. (2004): Abfüllung und Qualitätssicherung – Mikrobiologische Sicherheit bei Getränken. *Brauwelt* **29**: 788-792.
- Burkhardt, H.-J. (2000): Standardization and Quality Control of PCR Analyses. *Clin. Chem. Lab. Med.* **38(2)**: 87-91.
- Bustin, S.A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Molecular Endocrinology* **25**: 169-193.
- Casaregola, S., Nguyen, H.V., Lapathitis, G., Kotyk, A., Gaillardin, C. (2001): Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridisation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1607-1618.
- Casey, G.D., Dobson, A.D.W. (2004): Potential of real-time PCR-based detection of spoilage yeast in fruit juice – a preliminary study. *Int. J. Food Microbiol.* **91**: 327-335.
- de Barros Lopez, M., Soden, A., Martens, A.L., Henschke, P.A., Langridge, P. (1998): Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 279-286

- Dicks, L. M. T., Du Plessis, E. M., Dellaglio, F., Lauer, E. (1996): Reclassification of *L. casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. rev., designation of ATCC 334 as the Neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46(1)**: 337-340.
- DiMichele, L.J., Lewis, M.J. (1993): Rapid, Species-Specific Detection of Lactic Acid Bacteria from Beer using the Polymerase Chain Reaction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **51(2)**: 63-66.
- Dreier, J., Kleesiek, K. (2004): Schnelldachweis von Fremdhefen und langsam wachsenden Bierschädlingen während der Bierproduktion. Abschlußbericht Projekt B75, Wissenschaftsförderung der deutschen Brauwirtschaft e.V.
- Ehrmann, M. (1994): Klassifizierung und Identifizierung von Milchsäurebakterien mit Hilfe molekularbiologischer Methoden. Dissertation. Freising-Weihenstephan.
- Eidtmann, A., Gromus, J., Bellmer H.G. (1998): Mikrobiologische Qualitätssicherung: Der spezifische Nachweis von bierschädlichen Hefen im hefefreien Bereich. *Monatschrift für Brauwissenschaft* **9/10**: 141-148.
- Elnifro, E.M., Ashshi, A.M., Cooper, R.J., Klapper, P.E. (2000): Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. *Clin. Microbiol. Rev.* **13(4)**: 559-570.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. (1999): Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacer. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 329-337
- Fandke, M., Gasch, A., Berhof, K. (2001): Verfahren und Nukleinsäuren zum Nachweis brauereirelevanter Mikroorganismen. Offenlegungsschrift DE 199 45 964 A 1. Deutsches Patent- und Markenamt.
- Felis, G. E., Dell'aglio, F., Mizzi, L., Torriani, S. (21): Comparative sequence analysis of a *recA* gene fragment brings new evidence for a change of the taxonomy of the *Lactobacillus casei* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 2113-2117.
- Feldsine, P., Abeyta, C., Andrews, W. H. (2002): AOAC International methods Committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. **85(5)**: 1187-1200.
- Fernandez-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., Barrio, E. (2000): RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* **78**: 87-97.
- Funahashi, S., Suzuki, K., Ohtake, Y., Yamashita, H. (1998): Two novel beer-spoilage *Lactobacillus* species isolated from breweries. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **56(2)**: 64-69.
- Gänzle, M.G., Vogel, R. (2004): Nachweis und Klassifizierung bierschädlicher Bakterien anhand eines Multi-Drug Resistance Mechanismus. Abschlußbericht Projekt R 381, Wissenschaftsförderung der deutschen Brauwirtschaft e.V.
- Giraffa, G., Rossetti, L., Neviani, E. (2000): An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Methods* **42**: 175-

184.

- Gruber, F., Falkner, F. G., Dorner, F., Hämmerle, T. (2001): Quantitation of viral DNA by Real-Time PCR applying duplex amplification, Internal standardisation, and two-color fluorescence detection. *Appl. Environ. Microbiol.* **67(6)**: 2837-2839.
- Guarneri, T., Rossetti, L., Giraffa, G. (2001): Rapid identification of *Lactobacillus brevis* using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**: 377-381.
- Hage, T., Wold, K. (2003): Practical experiences on the combat of a major *Pectinatus* and *Megasphaera* infection with the help of TaqMan Realtime-PCR. Proceedings of the 29th EBC Congress. 1145-1148.
- Haikara, A., Juvonen, R., Koivula, T., Schuhbeck, T., Brandl, A., Vogeser, G., Storgards, E. (2003): Microbiological quality control by PCR – the BREWPROC approach. Proceedings of the 29th EBC Congress. 1036-1045.
- Hayashi, N., Ito, M., Horiike, S., Taguchi, H. (2001): Molecular cloning of a putative divalent-cation transporter gene as a new genetic marker for the identification of *Lactobacillus brevis* strains capable of growing in beer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**: 596-603
- Herman, L. (1997): Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. *Food Microbiol.* **14**: 103-110.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology.* **11**: 1026-1030.
- Homann, F., Bremer, Z., Möller-Hergt, G. (2002): Etablierung der LightCyclerTM-PCR als Schnellnachweismethode. *Brauwelt* **23/24**: 798-804.
- Hope, C.F.A. (1987): Cinnamic acid as a basis of a medium for the detection of wild yeasts. *J. Inst. Brew.* **93**: 213-215.
- Hoorfar, J. et al. (2003): Diagnostic PCR: Making internal amplification control mandatory. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**: 79-80.
- Hutter, K.-J. (2000): Fluoreszenzoptische Schnellmethoden in der Getränkemikrobiologie – Anspruch und Wahrheit. *Brauwelt.* **5**: 177-179.
- Hutter, K.-J., Lappas, S., Kiehne, M., Kemenji, D., Nitzsche, F. (2003): Kombiniertes Schnellverfahren mit der Mikrosiebfiltration und PCR-Analyse zur direkten Detektion von bierschädigenden Mikroorganismen. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **11/12**: 198-205.
- Iijima, K., Motoyama, Y. (2001): Oligonucleotide for detecting bacteria and detection method using the same. Patent JP: 2001231564. Asahi Breweries.
- Isaac, S., Jennings, D. (1996): Kultur von Mikroorganismen. Kap. 3: Das Herstellen von Nährmedien und ihre Zusammensetzung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Jespersen, L., Jakobsen, M. (1996): Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiol.* **33**: 139-155.
- Jespersen, L., van der Aa Kühle, A., Petersen, K.M. (2000): Phenotypic and genetic di-

- iversity of *Saccharomyces* contaminants isolated from lager breweries and their phylogenetic relationship with brewing yeast. *Int. J. Food Microbiol.* **60**: 43-53.
- Johnson J.R. (2000): Development of polymerase chain reaction-based assays for bacterial gene detection. *J. Microbiol. Methods.* **41**: 201-209.
- Josefsen, M.H., Lübeck, P.S., Hansen, F., Hoorfar, J. (2004): Towards an international standard for PCR-based detection of foodborne thermotolerant *Campylobacters*: interaction of enrichment media and pre-PCR treatment on carcass rinse sample. *J. Microbiol. Methods* **58**: 39-48.
- Josepa, S., Guillamon, J.M., Cano, J. (2000): PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus/Saccharomyces pastorianus* using specific primers. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**: 255-259.
- Juvonen, R., Satokari, R., Mallison, K., Haikara, A. (1999): Detection of spoilage bacteria in beer by Polymerase Chain Reaction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **57(3)**: 99-103.
- Juvonen, R., Koivula, T., Haikara, A. (2003): PCR detection of gram-negative brewery contaminants – present state. *Proceedings of the 29th EBC Congress.* 1046-1056.
- Kiehne, M. Berghof-Jäger, K., Fandke, M., Grönewald, C. (2003): Detection of beer-spoilage organisms by real-time PCR. *Proceedings of the 29th EBC Congress.* 1072-1079.
- Klappenbach, J.A., Saxman, P.R., Cole, J.R., Schmidt, T.M. (2001): rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res.* **29**: 181-184.
- Klein, D. (2002): Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* **8(6)**: 257-260.
- Knorr, F., Kremkov, C. (1972): *Chemie und Technologie des Hopfens. Teil B, Kap. 2: Die Hopfung des Bieres.* Verlag Hans Carl, Nürnberg.
- Kreader, C.A. (1996): Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1102-1106.
- Kunze, G., Kunze, I., Barner, A., Schulz, R. (1993): Classification of *Saccharomyces cerevisiae* strains by genetical and biochemical methods. *Monatsschrift für Brauwissenschaft.* **4**: 132-136.
- Laidlaw, L., Tompkins, T.A., Savard, L., Dowhanick, T.M. (1996): Identification and differentiation of brewing yeasts using specific and RAPD Polymerase Chain Reaction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54(2)**: 97-102.
- LaGier, M., J., Joseph, L. A., Passaretti, T. V., Musser, K. A., Cirino, N. M. (2004): A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Mol. Cell. Probes.* **18(4)**: 275-282
- Lee, S.Y. (1994): SMMP – A Medium for Selective Isolation of *Megasphaera* and *Pectinatus* from Brewery. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **52(3)**: 115-119.
- Lorkowski, S., Cullen, P. (2003): *Analysing Gene Expression (Volume 1).* Chapter 3: Methods for analysing mRNA expression. WILEY-VCH Verlag, Weinheim.
- Lunge, V.R., Miller, B.J., Livak, K.J., Batt, C.A. (2002): Factors affecting the performance

- of 5'-nuclease PCR assays for *Listeria monocytogenes* detection. J. Microbiol. Methods **51**: 361-368.
- Mackay, I.M. (2004): Real-Time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiology and Infection. **10(3)**: 190-212.
- Malorny, B., Tassios, P.T., Radstrom, P., Cook, N., Wagner, M., Hoorfar, J. (2003a): Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. Int. J. Food Microbiol. **83**: 39-48.
- Malorny, B., Hoorfar, J., Hugas, M., Heuvelink, A., Fach, P. et al. (2003b): Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. Int. J. Food Microbiol. **89**: 241-249.
- Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge C., Helmuth, R. (2003c): Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 290-296.
- McCullough, M.J., Clemons, K.V., McCusker, J.H., Stevens, D.A. (1998): Intergenic transcribed spacer PCR ribotyping for differentiation of *Saccharomyces* species and interspecific hybrids. J. Clin. Microbiol. **36**: 1035-1038.
- McGregor, D.P., Forster, S., Steven, J., Adair, J., Leary, S.E.C., Leslie, D.L., Harris, W.J., Titball, R.W. (1996): Simultaneous detection of microorganisms in soil suspension based on PCR amplification of bacterial 16S rRNA fragments. Biotechniques **21**: 463-471.
- McKillip, J. L., Jaykus, L. A., Drake, M. (1999): Nucleic acid persistence in heat-killed *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated skim milk. **62(8)**: 839-844.
- Methner, F.-J., Schuster, E., Schackmann, A. (2004): Screening of beer-spoilage bacteria using the LightCycler PCR Workflow System. Biochemica **1**: 9-11.
- Missel, A. et al. (2003): Reducing PCR optimization and costs with QuantiTect SYBR Green PCR Kits on the Light Cycler System. Hygiene Report. **1**: 18-20
- Molina F.I., Jong, S.C., Huffman, J.L. (1993): PCR amplification of the 3' external transcribed and intergenic spacers of the ribosomal DNA repeat unit in the three species of *Saccharomyces*. FEMS Microbiol. Lett. **108**: 259-264.
- Montrocher, R., Verner, M.-C., Briolay, J., Gautier, C., Marmeisse, R. (1998): Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. Int. J. System. Bacteriol. **48**: 295-303.
- Morakile, G., Kock, J.L.F., van Zyl, W., Pohl, C.H., Viljoen, B.C. (2002): Differentiation of brewing and related yeasts based on PCR amplification and restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA. J. Inst. Brew. **108(2)**: 164-168.
- Müller, H. J. (2001): PCR Polymerase-Kettenreaktion. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Mühlhardt, C. (1999): Der Experimentator: Molekularbiologie. Kap. 4. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Newton, C.R., Graham, A. (1994): PCR. Kap. 2: Geräte, Reagentien und Hilfsmittel. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

- Nietzsche, F. et al. (2001): Hygiene Monitoring in Brauereien – Das mikrobiologische Labor als Dienstleister. *Brauwelt* **12/13**: 454-457.
- Nogva, H.K., (2003): Ethidium Monoazide for DNA-Based Differentiation of Viable and Dead Bacteria by 5'-Nuclease PCR. *Biotechniques* **34**: 804-813.
- Ott, M. (2000): Selektivität und Nachweisgeschwindigkeit verschiedener Nährböden zum Spurennachweis von bierverderbenden Bakterien. Diplomarbeit. Freising-Weihenstephan.
- o. V. (1992): Copper media for wild yeast detection. *Am. Soc. Brew. Chem.* **50**: 153-157
- o. V. (1999): PCR Applications Manual. Kap. 2. Firmeninformation Roche Molecular Biochemicals, Mannheim.
- o. V. (2002): HotStarTaq PCR Handbook. Firmeninformation Qiagen, Hilden.
- o. V. (2003): Creating standard curves with genomic DNA or plasmid DNA templates for use in quantitative PCR. Firmeninformation Applied Biosystems, Foster City, USA.
- o. V. (2004): Real-Time PCR Booklet. Firmeninformation Eurogentec, Belgien.
- Pawlowsky, K., Brandl, A., Walker, S., Hammond, J. (2006): A novel PCR method for the detection of live microorganisms. In: *Rapid Methods for Food and Feed Quality Determination*. Editors: van Amerongen, A., Barug, D., Lauwaars, M., Wageningen Academic Publishers, Netherlands.
- Powell, C., Smart, K. (2003): A comparison of new and traditional methods for the detection of brewery contaminants. *Proceedings of the 29th EBC Congress*. 1150-1162
- Pretorius. I.S., Lambrechts L.G. (1991): The Glucoamylase Multigene Family in *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* : An Overview. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26(1)**: 53-76.
- Priest, F.G., Campbell, I. (1996): *Brewing Microbiology*. Verlag Chapman and Hall.
- Pulvirenti, A. et al. (2000): *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**: 191-196.
- Rassmann, K., Leibhard, S. (1999): Hochauflösende Klassifizierung von Hefestämmen mit genetischen Methoden. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **9/10**: 152-156.
- Rijpens, N. P., Herman, L. M. F. (2002): Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens. *J AOAC Int.* **85(4)**: 984-995.
- Rinttila, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogus, L., Palva, A. (2004): Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* **97(6)**: 1166-1177
- Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K., Rasmussen, O.F. (1992): Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* **17**: 37-45.
- Rousselon, N., Delgenes, J.-P., Godon, J.-J. (2004): A new Real-Time PCR (TaqMan PCR) system for detection of the 16S rDNA gene associated with fecal bacteria. *J. Microbiol. Methods* **59**: 15-22.

- Rudi, K., Hoidal, H.K., Katla, T., Johansen, B.K., Nordal, J., Jakobsen, K.S. (2004): Direct Real-Time PCR quantification of *Campylobacter jejuni* in chicken fecal and cecal samples by integrated cell concentration and DNA purification. *Appl. Environ. Microbiol.* **70(2)**: 790-797.
- Rutledge, R.G., Côté, C. (2003): Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research* **31(16)**: e93
- Sakamoto, K. (2002): Beer spoilage bacteria and hop resistance in *Lactobacillus brevis*. Proefschrift. Rijksuniversiteit Groningen.
- Sakamoto, K., Konings, W.N. (2003): Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiology* **89**: 105-124.
- Salek, A. (2002): Verbessertes kultureller Nachweis von Wildhefen. *Brauwelt* **44**: 1580-1583.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sami, M., Yamashita, H., Kadokura, H., Kitamoto, K., Yoda, K., Yamasaki, M. (1997): A new and rapid method for determination of beer-spoilage ability of Lactobacilli. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **55(4)**: 137-140.
- Satokari, R., Juvonen, R., von Wright, A., Haikara, A. (1997): Detection of *Pectinatus* beer spoilage bacteria by using the Polymerase Chain Reaction. *J. Food Prot.* **60(12)**: 1571-1573.
- Scherer, A. (2002): Entwicklung von PCR-Methoden zur Klassifizierung industriell genutzter Hefen. Dissertation. Freising-Weihenstephan.
- Schlegel, H.G. (1982): *Allgemeine Mikrobiologie*. 7. Auflage. Kap. 8.2: Milchsäuregärung und *Lactobacillaceae*. Stuttgart.
- Schmidt, H.J. (1993): Moderne Keimidentifizierung im Betriebslabor. *Brauwelt* **4**: 142-145.
- Schöneborn, H., (2001): Differenzierung und Charakterisierung von Betriebshefekulturen mit genetischen und physiologischen Merkmalen. Dissertation. Freising-Weihenstephan.
- Sheridan, G.E.C., Masters C.I., Shallcross, J.A., Mackey, B.M. (1998): Detection of mRNA by Reverse Transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(4)**: 1313-1318
- Simpson, K.L., Petterson B., Priest, F.G. (2001): Characterization of lactobacilli from Scotch malt whisky distilleries and description of *Lactobacillus ferintoshensis* sp. nov., a new species isolated from malt whisky fermentations. *Microbiology* **147**: 1007-10016.
- Simpson, W.J., Fernandez, J.L. (1991): Selection of beer-spoilage lactic acid bacteria and induction of their ability to grow in beer. *Lett. Appl. Microbiol.* **14**: 13-16.
- Simpson, W.J. (1993): Studies on the sensitivity of lactic acid bacteria to hop bitter acids. *J. Inst. Brew.* **99**: 405-411.
- Simpson, W.J., Fernandez, J.L. (1994): Mechanisms of resistance of lactic acid bacteria

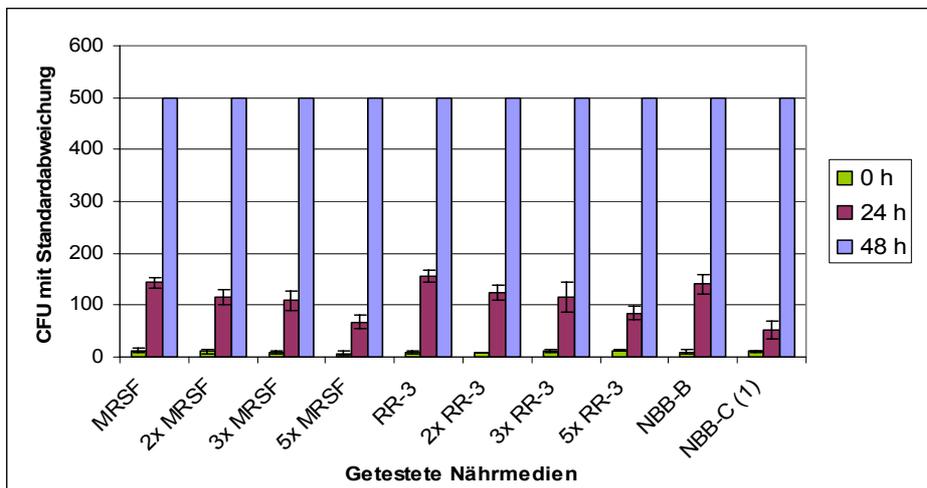
- to trans-Isohumulone. J. Am. Soc. Brew. Chem. **52(1)**: 9-11.
- Steward, R.J., Dowhanick, T.M. (1996): Rapid detection of lactic acid bacteria in fermenter samples using a nested polymerase chain reaction. J. Am. Soc. Brew. Chem. **54(2)**: 78-84.
- Strachotta, T. (2003): Mikrobiologische Qualitätssicherung im Brauereibetrieb. Brauwelt **31/32**: 1020-1022.
- Storgards, E. Juvonen, R., Vanne, L., Haikara, A. (1997): Detection methods in process and hygiene control. EBC Symposium Quality Issues and HACCP. EBC Monograph **26**: 95-107.
- Sung, K. D., Stern. N. J., Hiett, K. L. (2004): Relationship of messenger RNA Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction signal to *Campylobacter* spp. viability. Avian Diseases **48**: 254-262.
- Suzuki, K., Sami, M., Kadokura, H., Nakajima, H., Kitamoto, K. (2002): Biochemical characterization of *horA*-independent hop resistance mechanism in *Lactobacillus brevis*. Int. J. Food Microbiol. **76**: 223-230.
- Suzuki, K., Funahashi, W., Koyanagi, M., Yamashita, H. (2004a): *Lactobacillus paracollinoides* sp. nov. isolated from brewery environments. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **54**: 115-117.
- Suzuki, K., Koyanagi, M., Yamashita, H. (2004b): Genetic characterization and specific detection of beer-spoilage *Lactobacillus* sp. LA2 and related strains. J. Appl. Microbiol. **96**: 677-683.
- Suzuki, K., Ozaki, K., Yamashita, H. (2004c): Comparative analysis of conserved genetic markers and adjacent DNA regions identified in beer-spoilage lactic acid bacteria. Lett. Appl. Microbiol. **39**: 240-245.
- Suzuki, K., Koyanagi, M., Yamashita, H. (2004d): Genetic characterization of non-spoilage variant isolated from beer-spoilage *Lactobacillus brevis* ABBC45^C. J. Appl. Microbiol. **96**: 946-953.
- Suzuki, K., Ozaki, K., Yamashita, H. (2004e): Genetic marker for differentiating beer-spoilage ability of *Lactobacillus paracollinoides* strains. J. Appl. Microbiol. **97**: 712-718.
- Tamai, Y., Momma, T., Yoshimoto, H., Kaneko, Y. (1998): Co-existence of two types of chromosome in the bottom-fermenting yeast, *Saccharomyces pastorianus*. Yeast **14**: 923-933.
- Thielen, K. et al. (2001): Spezifischer Schnellnachweis von bierschädlichen Bakterien mittels fluoreszenzmarkierter Gensonden. Brauwelt: **38**: 1598-1603.
- Tholozan, J.-L., Membrie, J.-M., Grivet, J.-P. (1997): Physiology and development of *Pectinatus cerevisiiphilus* and *Pectinatus frisingensis*, two strict anaerobic beer spoilage bacteria. Int J. Food Microbiol. **34**: 29-39.
- Tilsala-Timisjärvi, A., Alatossava, T. (1997): 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 Microbiology **35**: 49-56.

- Tompkins, T.A., Stewart, R., Savard, L., Russell, I., Dowhanick, T.M. (1996): RAPD-PCR Characterization of Brewery Yeast and Beer Spoilage Bacteria. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54**: 91-96.
- Torriani, S., Felis, G.E., Dellaglio, F. (2001): Differentiation of *L. plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers.
- Torriani, S., Zapparoli, G., Malacrino, P., Suzzi, G., Dellaglio, F. (2004): Rapid identification and differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and their hybrids by multiplex PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**: 239-244.
- Tsuchiga, Y., Kaneda, H., Kano, Y., Koshino, S. (1992): Detection of beer spoilage organisms by polymerase chain reaction technology. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **50(2)**: 64-67.
- van der Aa Kühle, A., Jespersen, L. (1998): Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. *Int J. Food Microbiol.* **43**: 205-213.
- van der Vossen, J.M.B.M., Hofstra, H. (1996): DNA based typing, identification and detection systems for food spoilage microorganisms: development and implementation. *Int. J. Food Microbiol.* **33**: 35-49.
- Vaughan-Martini, A., Martini, A. (1998). In: *The Yeasts*. 4th edn. pp. 358-373. Edited by C.P.Kurtzman & J. W. Fell. Amsterdam: Elsevier.
- Walter, J., Hertel, C., Tannock, G., Lis, C.M., Munro, K., Hammes, W.P. (2001): Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67(6)**: 2578-2585.
- Ward, L.J.H., Timmins M.J. (1999): Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**: 90-92.
- Wilson, I.G. (1997): Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63(10)**: 3741-3751.
- Yamagishi, H., Otsuta, Y., Funahashi, W., Ogata, T., Sakai, K., (1999): Differentiation between brewing and non-brewing yeasts using a combination of PCR and RFLP. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 505-513.
- Yamashita, I., Maemura, T., Datano, T., Fukui, S. (1985): Polymorphic extracellular glucoamylase genes and their evolutionary origin in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. *J. Bacteriol.* **161(2)**: 574-582.
- Yamauchi, H. et al. (1998): Rapid Methods for Detecting *Saccharomyces diastaticus*, a Beer Spoilage Yeast, Using Polymerase Chain Reaction. *J. A. Soc. Brew. Chem.* **56(2)**: 58-63.
- Yasui, T., Okamoto, T., Taguchi, H. (1997): A specific oligonucleotide primer for the rapid detection of *Lactobacillus lindneri* by polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.* **43**: 157-163.
- Zimmer, D. (2004): Entwicklung von Real-Time PCR-Systemen zum Nachweis brauereire-

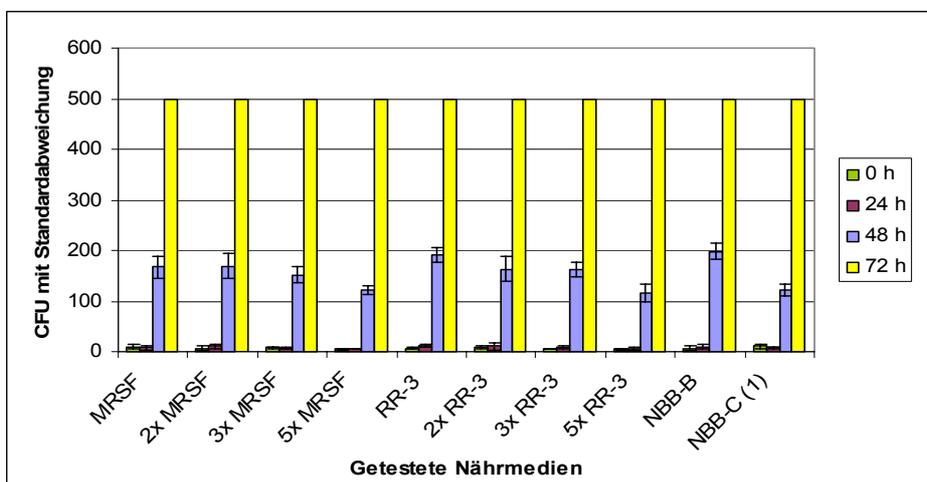
levanter Fremdhefen und Optimierung kultureller Anreicherungsverfahren. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II. Freising-Weihenstephan.

12 Anhang

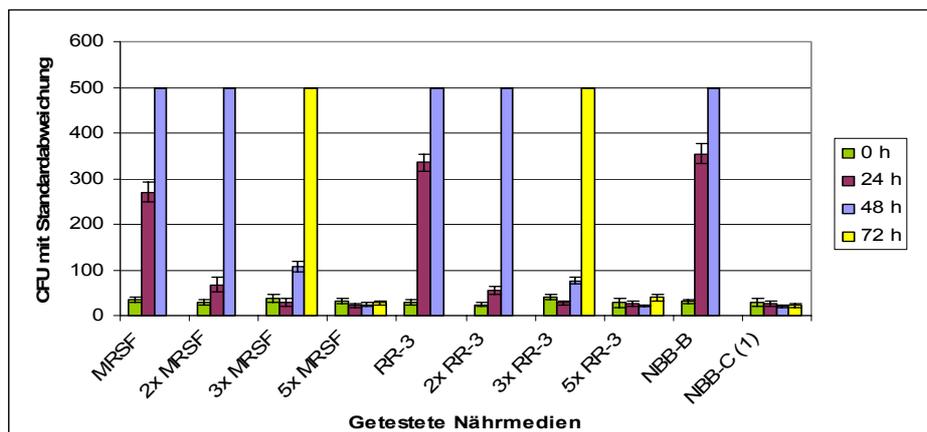
Der Anhang enthält Abbildungen und Tabellen zur weiteren Erläuterung der im Text geschilderten Ergebnisse. Zur besseren Übersicht wird am Ende jeder Abbildungsbeschriftung im Anhang auf das entsprechende Kapitel im Text verwiesen.



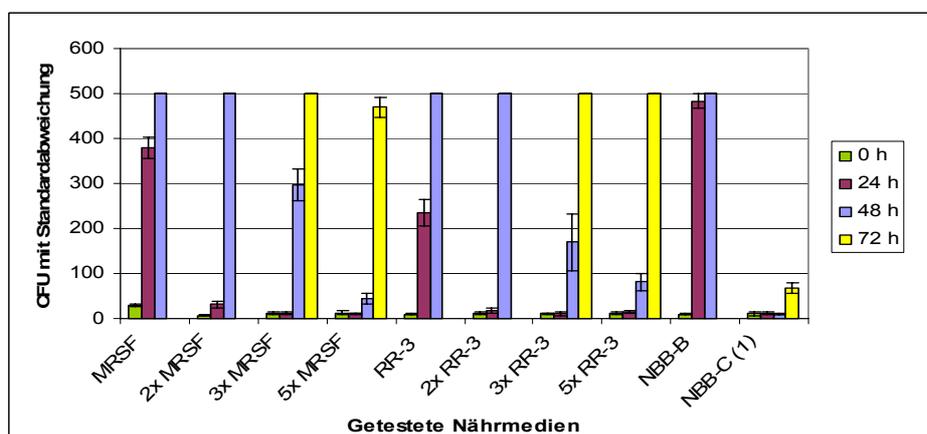
Anh. 1: Anreicherung von *L. lindneri* (BS 38) in verschiedenen konzentrierten Flüssignährmedien mit variierendem Bieranteil; CFU in 20 µl Aliquots nach definierten Zeitpunkten; (CFU ≥ 500 nicht mehr auszählbar; CFU ≥ 500 sind als Ordinatenwert 500 dargestellt); Textbezug siehe 4.1.3



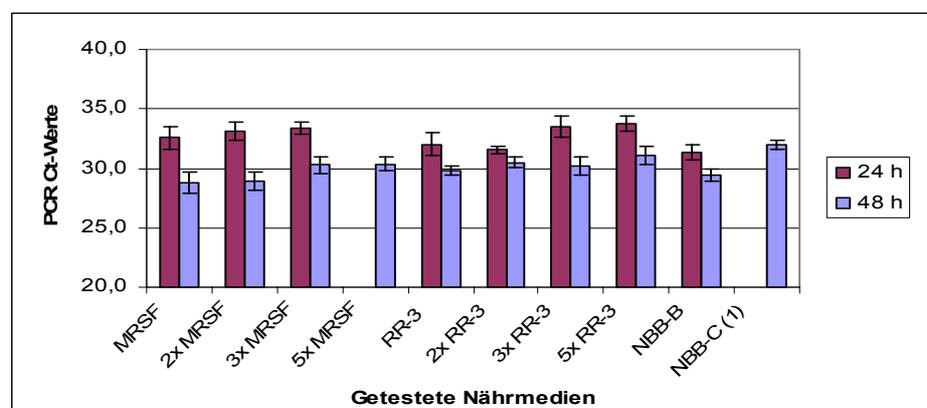
Anh. 2: Anreicherung von *P. damnosus* (BS 242) in verschiedenen konzentrierten Flüssignährmedien mit variierendem Bieranteil; CFU in 20 µl Aliquots nach definierten Zeitpunkten; (CFU ≥ 500 nicht mehr auszählbar; CFU ≥ 500 sind als Ordinatenwert 500 dargestellt); Textbezug siehe 4.1.3



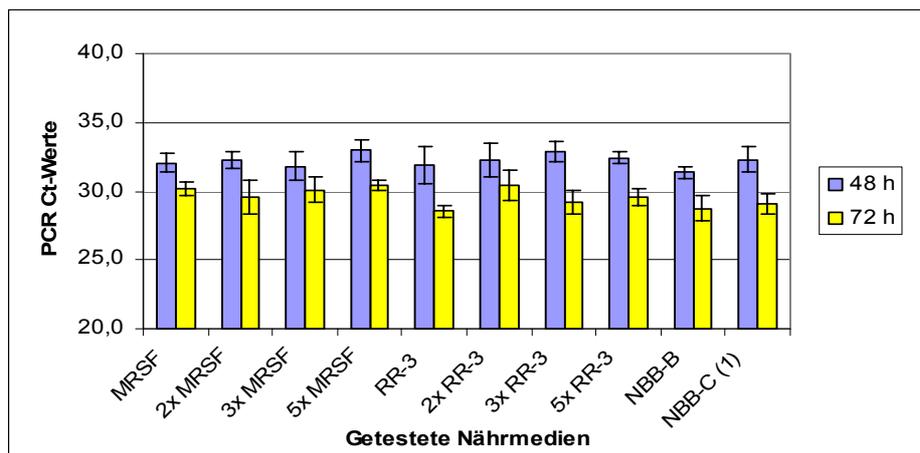
Anh. 3: Anreicherung von *L. casei* (BS 3) in verschieden konzentrierten Flüssignährmedien mit variierendem Bieranteil; CFU in 20 µl Aliquots nach definierten Zeitpunkten; (CFU ≥ 500 nicht mehr auszählbar; CFU ≥ 500 sind als Ordinatenwert 500 dargestellt); Textbezug siehe 4.1.3



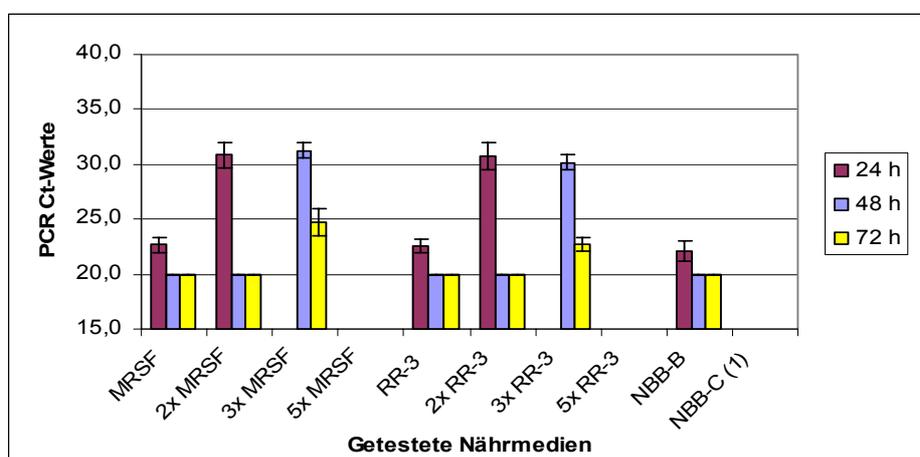
Anh. 4: Anreicherung von *L. perolens* (BS 291) in verschieden konzentrierten Flüssignährmedien mit variierendem Bieranteil; CFU in 20 µl Aliquots nach definierten Zeitpunkten; (CFU ≥ 500 nicht mehr auszählbar; CFU ≥ 500 sind als Ordinatenwert 500 dargestellt); Textbezug siehe 4.1.3



Anh. 5: Anreicherung von *L. lindneri* (BS 38) in verschieden konzentrierten Flüssignährmedien mit variierendem Bieranteil; PCR Ct-Werte von 150 µl Aliquots nach definierten Zeitpunkten; Textbezug siehe 4.1.3



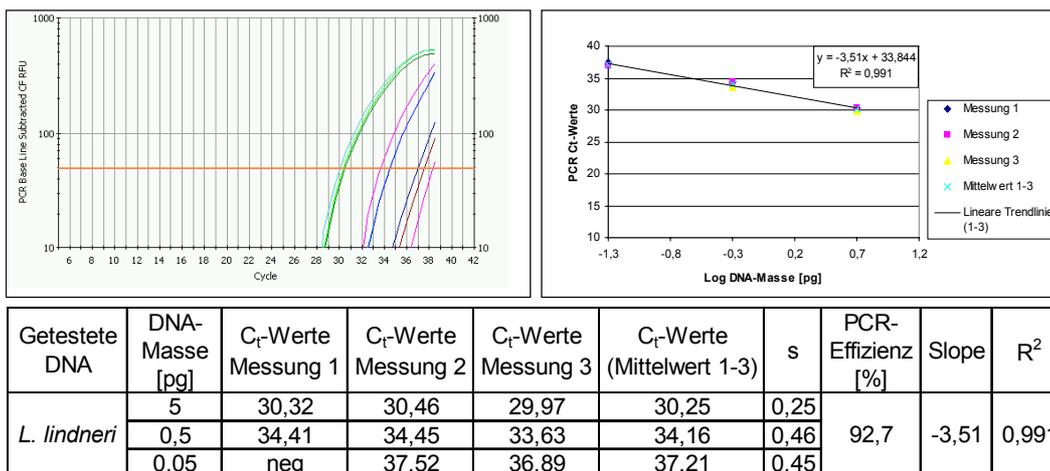
Anh. 6: Anreicherung von *P. damnosus* (BS 242) in verschiedenen konzentrierten Flüssignährmedien mit variierendem Bieranteil; PCR C_T-Werte von 150 µl Aliquots nach definierten Zeitpunkten; Textbezug siehe 4.1.3



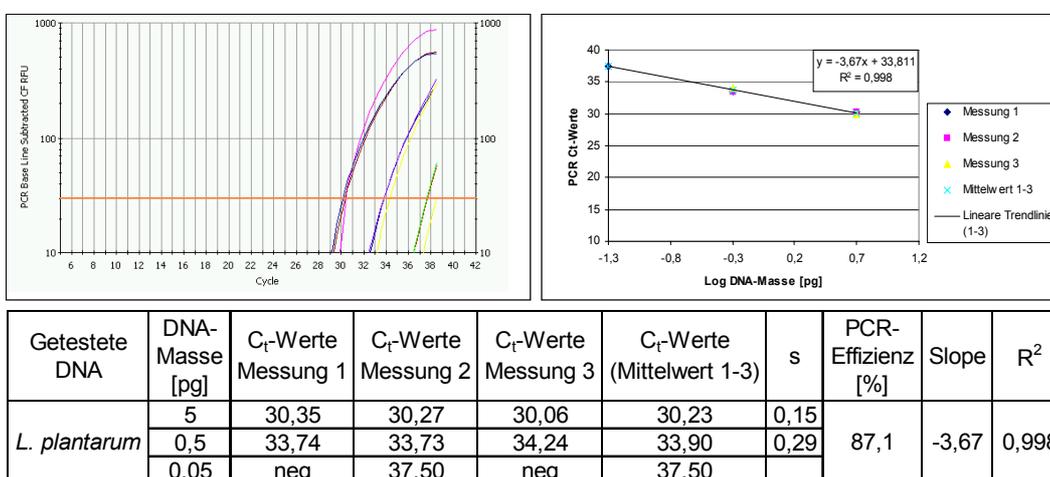
Anh. 7: Anreicherung von *L. casei* (BS 3) in verschiedenen konzentrierten Flüssignährmedien mit variierendem Bieranteil; PCR C_T-Werte von 150 µl Aliquots nach definierten Zeitpunkten; Textbezug siehe 4.1.3

Erwartetes PCR-Ergebnis	Organismen			
	Positiv	<i>L. animata</i>	<i>L. antrumi</i>	<i>L. arizonensis</i>
<i>L. ferintoshensis</i>		<i>L. frumenti</i>	<i>L. fuchuensis</i>	<i>L. hammesii</i>
<i>L. mucosae</i>		<i>L. oris</i>	<i>L. panis</i>	<i>L. pantheris</i>
<i>L. parakefiri</i>		<i>L. pentosus</i>	<i>L. pontis</i>	<i>L. sake</i>
<i>L. sharpeae</i>		<i>L. spicherii</i>	<i>L. suebicus</i>	<i>L. vaginalis</i>
<i>L. vermiforme</i>		<i>L. zeae</i>	<i>L. zymae</i>	
Negativ	<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. acidipiscis</i>	<i>L. agilis</i>	<i>L. algidus</i>
	<i>L. animalis</i>	<i>L. aviarus</i>	<i>L. coleohominis</i>	<i>L. confusus</i>
	<i>L. crispatus</i>	<i>L. cypricasei</i>	<i>L. equi</i>	<i>L. farciminis</i>
	<i>L. fornicalis</i>	<i>L. gallinarum</i>	<i>L. gastricus</i>	<i>L. hamsteri</i>
	<i>L. intestinalis</i>	<i>L. jensenii</i>	<i>L. kalixensis</i>	<i>L. kefirgranum</i>
	<i>L. kimchii</i>	<i>L. kitasatonis</i>	<i>L. kunkeei</i>	<i>L. letivazi</i>
	<i>L. mali</i>	<i>L. mindensis</i>	<i>L. murinus</i>	<i>L. nagelii</i>
	<i>L. paralimentarius</i>	<i>L. psittaci</i>	<i>L. rossii</i>	<i>L. ruminis</i>
	<i>L. saerimneri</i>	<i>L. satsumaensis</i>	<i>L. suntoryeus</i>	<i>L. thermotolerans</i>
	<i>L. ultunensis</i>	<i>L. versmoldensis</i>	<i>L. vibrioforme</i>	

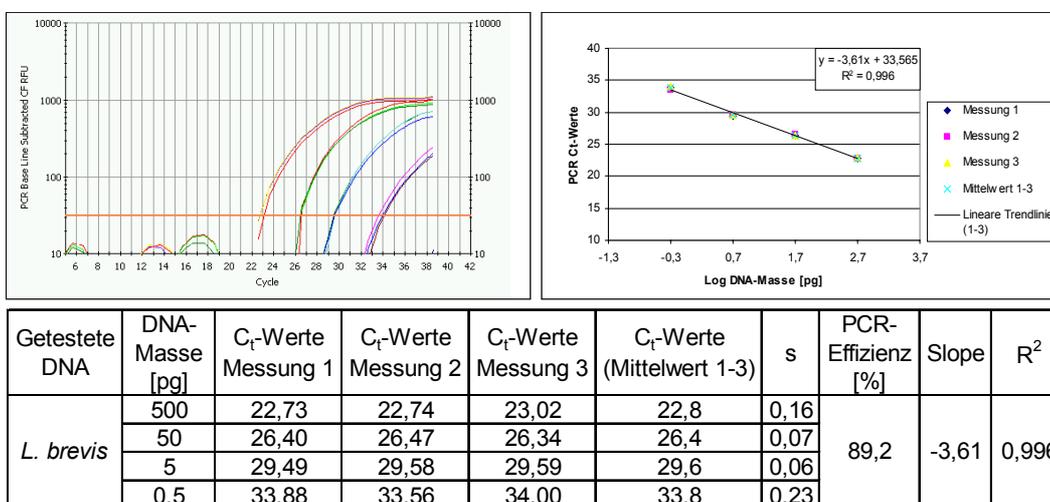
Anh. 8: Erwartete PCR-Ergebnisse nicht-getesteter Laktobazillen mit dem sLP600-Assay; Textbezug siehe 6.1.1.1



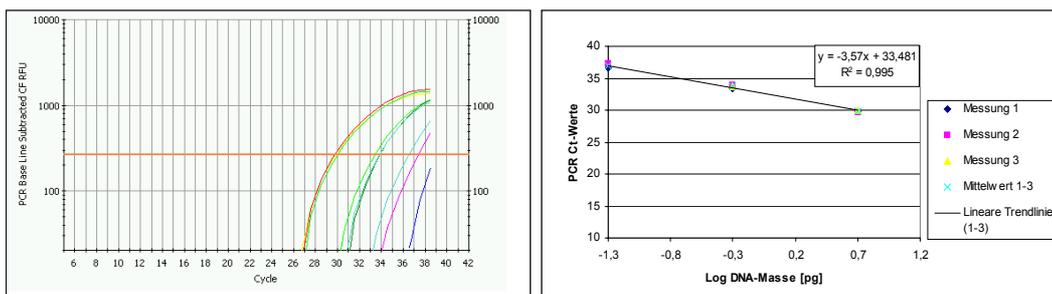
Anh. 9: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des sLP600-Assays ohne IAC mit *L. lindneri* Rein-DNA; 5 pg-50 fg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.1.2



Anh. 10: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des sLP600-Assays ohne IAC mit *L. plantarum* Rein-DNA; 5 pg-50 fg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.1.2

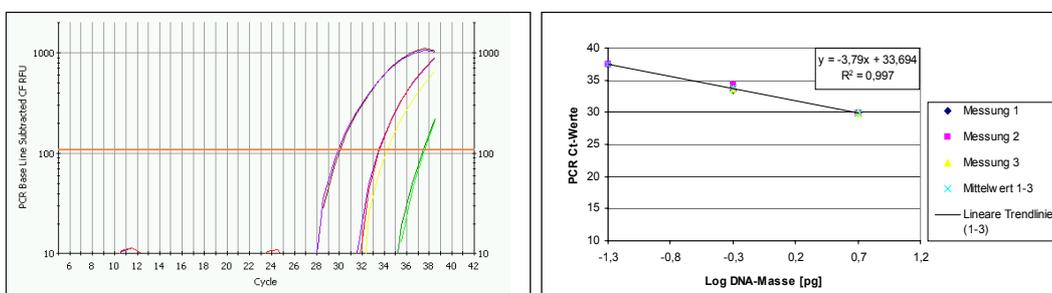


Anh. 11: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des sLP600-Assays mit IAC und *L. brevis* Rein-DNA; 500 pg-500 fg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.1.3



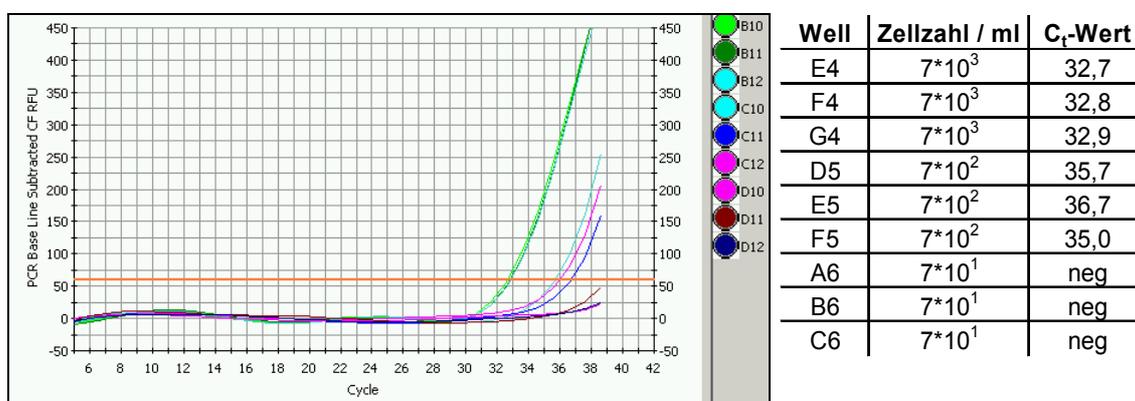
Getestete DNA	DNA-Masse [pg]	C _t -Werte Messung 1	C _t -Werte Messung 2	C _t -Werte Messung 3	C _t -Werte (Mittelwert 1-3)	s	PCR-Effizienz [%]	Slope	R ²
<i>L. lindneri</i>	5	29,80	29,73	29,97	29,83	0,12	90,5	-3,57	0,995
	0,5	33,39	33,83	33,80	33,67	0,25			
	0,05	neg	36,53	37,34	36,94	0,57			

Anh. 12: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des sLP600-Assays mit IAC und *L. lindneri* Rein-DNA; 5 pg-500 fg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.1.3

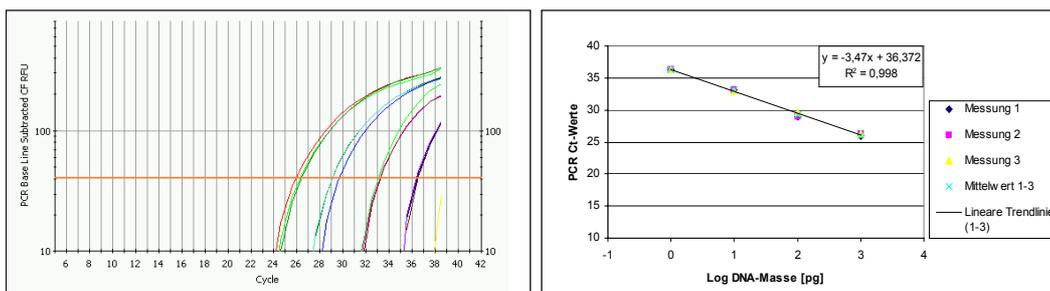


Getestete DNA	DNA-Masse [pg]	C _t -Werte Messung 1	C _t -Werte Messung 2	C _t -Werte Messung 3	C _t -Werte (Mittelwert 1-3)	s	PCR-Effizienz [%]	Slope	R ²
<i>L. plantarum</i>	5	29,95	29,82	29,94	29,90	0,07	83,7	-3,79	0,997
	0,5	33,47	34,19	33,54	33,73	0,40			
	0,05	neg	37,53	37,39	37,46	0,10			

Anh. 13: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des sLP600-Assays mit IAC und *L. plantarum* Rein-DNA; 5 pg-500 fg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.1.3

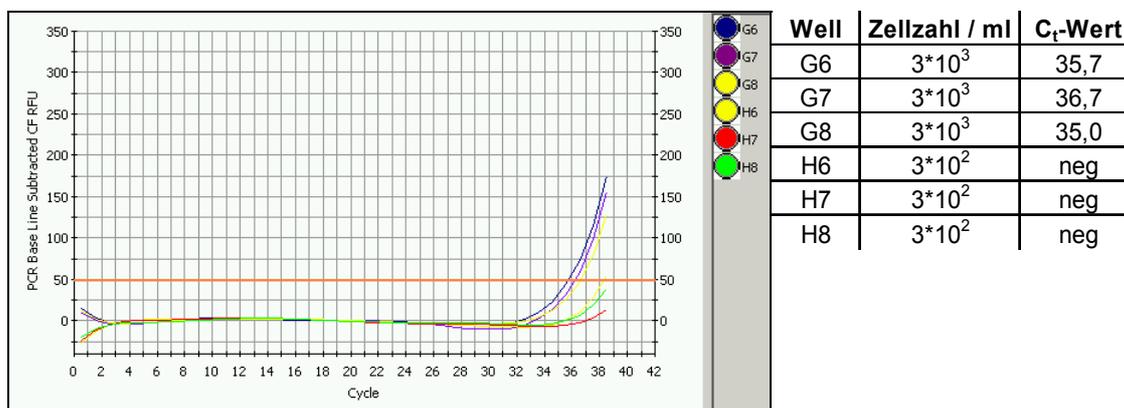


Anh. 14: Sensitivität des sLP600-Assays mit IAC anhand einer *L. brevis*-Verdünnungsreihe; 7*10³ – 7*10¹ Zellen/ml (n = 3); Textbezug siehe 6.1.1.3

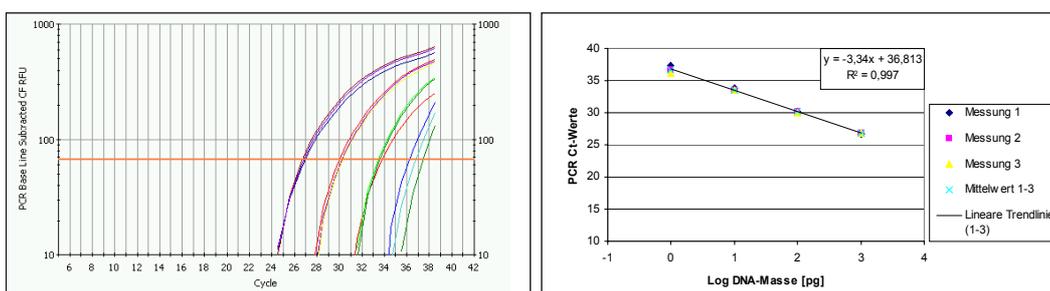


Getestete DNA	DNA-Masse [pg]	C _t -Werte Messung 1	C _t -Werte Messung 2	C _t -Werte Messung 3	C _t -Werte (Mittelwert 1-3)	s	PCR-Effizienz [%]	Slope	R ²
<i>L. brevis</i>	1000	25,86	26,20	26,33	26,13	0,24	94,3	-3,47	0,998
	100	29,01	29,02	29,65	29,23	0,37			
	10	33,15	33,20	32,98	33,11	0,12			
	1	36,49	36,39	36,30	36,39	0,10			

Anh. 15: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des iLbr-Assays ohne IAC; *L. brevis* Rein-DNA; 1000 pg-1 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.2.2

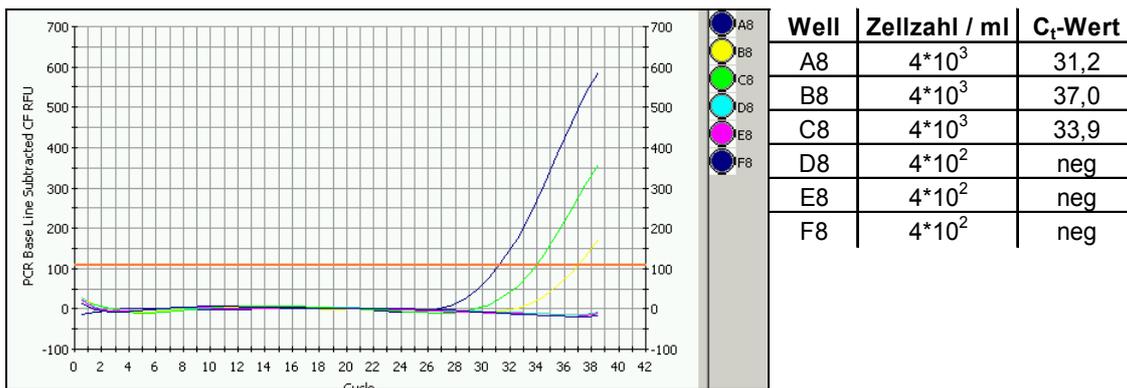


Anh. 16: Sensitivität des iLbr-Assays ohne IAC anhand einer *L. brevis*-Verdünnungsreihe; 3*10³ – 3*10² Zellen/ml (n = 3); Textbezug siehe 6.1.2.2

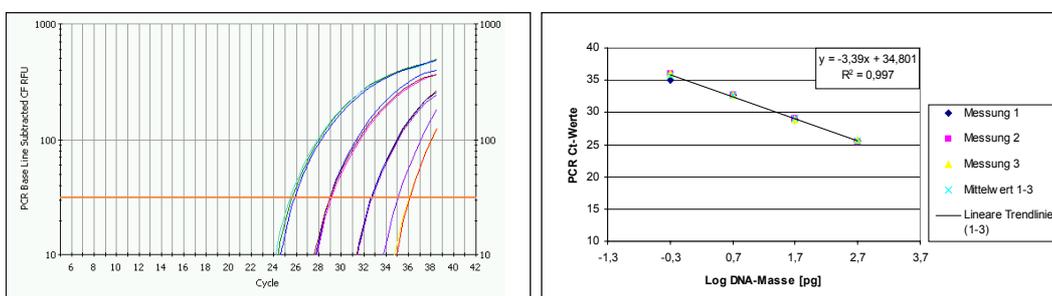


Getestete DNA	DNA-Masse [pg]	C _t -Werte Messung 1	C _t -Werte Messung 2	C _t -Werte Messung 3	C _t -Werte (Mittelwert 1-3)	s	PCR-Effizienz [%]	Slope	R ²
<i>L. buchneri</i>	1000	26,67	26,90	26,78	26,78	0,12	99,6	-3,34	0,997
	100	30,17	30,23	29,93	30,11	0,16			
	10	33,77	33,42	33,56	33,58	0,18			
	1	37,37	36,73	36,15	36,75	0,61			

Anh. 17: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des iLbu-Assays ohne IAC; *L. buchneri* Rein-DNA; 1000 pg-1 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.2.2

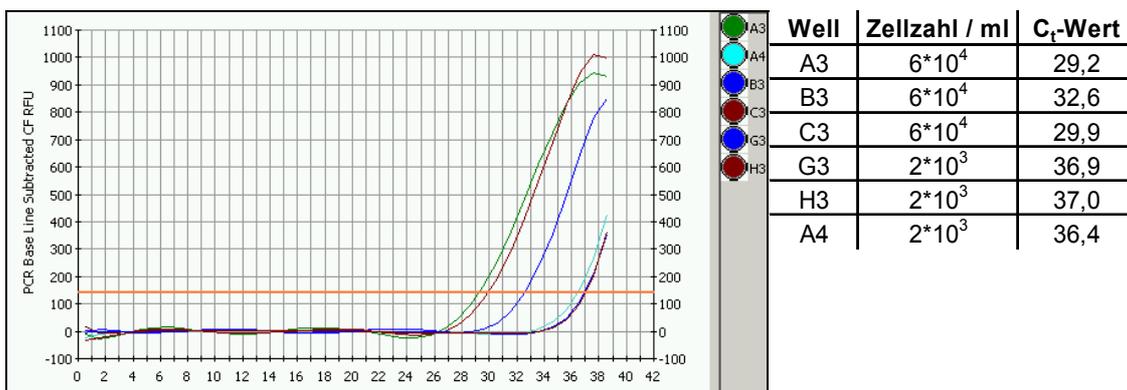


Anh. 18: Sensitivität des iLbu-Assays ohne IAC anhand einer *L. buchneri*-Verdünnungsreihe; 4*10³ – 4*10² Zellen/ml (n = 3); Textbezug siehe 6.1.2.2

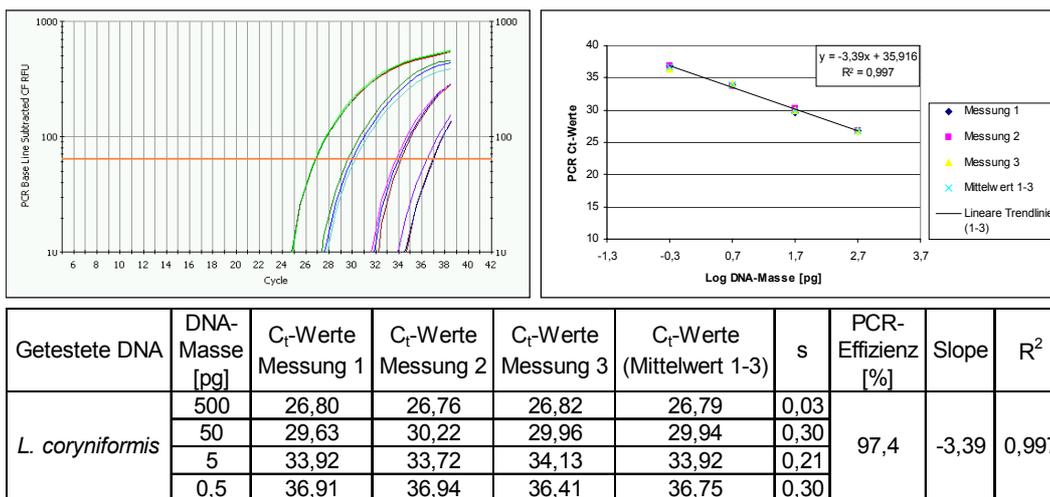


Getestete DNA	DNA-Masse [pg]	C _t -Werte Messung 1	C _t -Werte Messung 2	C _t -Werte Messung 3	C _t -Werte (Mittelwert 1-3)	s	PCR-Effizienz [%]	Slope	R ²
<i>L. casei</i>	500	25,61	25,43	25,79	25,61	0,18	97,4	-3,39	0,997
	50	28,94	29,10	28,96	29,00	0,09			
	5	32,65	32,65	32,72	32,67	0,04			
	0,5	34,99	35,98	36,04	35,67	0,59			

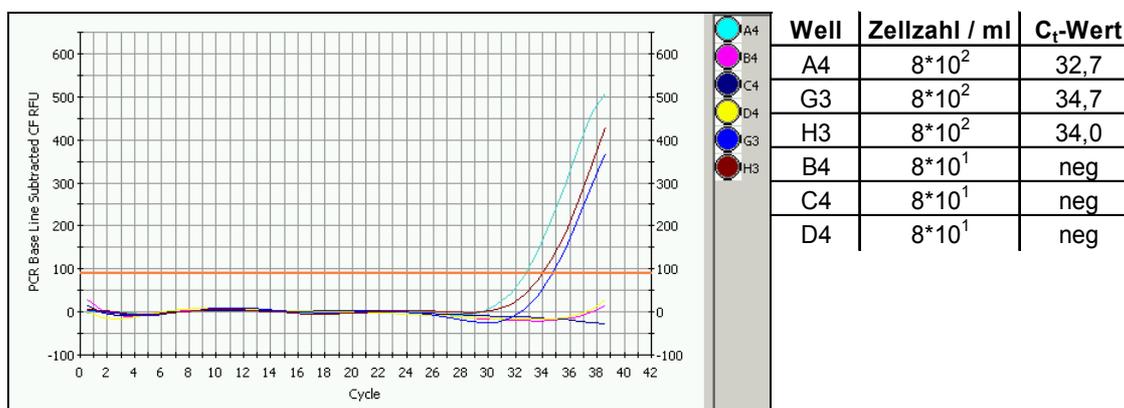
Anh. 19: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des iLca-Assays ohne IAC; *L. casei* Rein-DNA; 500 pg- 0,5 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.2.2



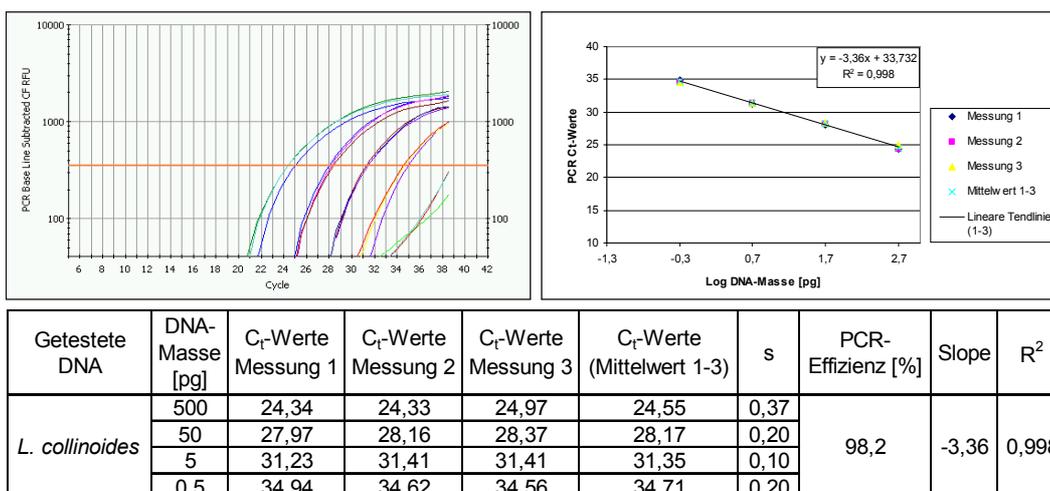
Anh. 20: Sensitivität des iLca-Assays ohne IAC anhand einer *L. casei*-Verdünnungsreihe; 6*10⁴ – 2*10³ Zellen/ml (n = 3); Textbezug siehe 6.1.2.2



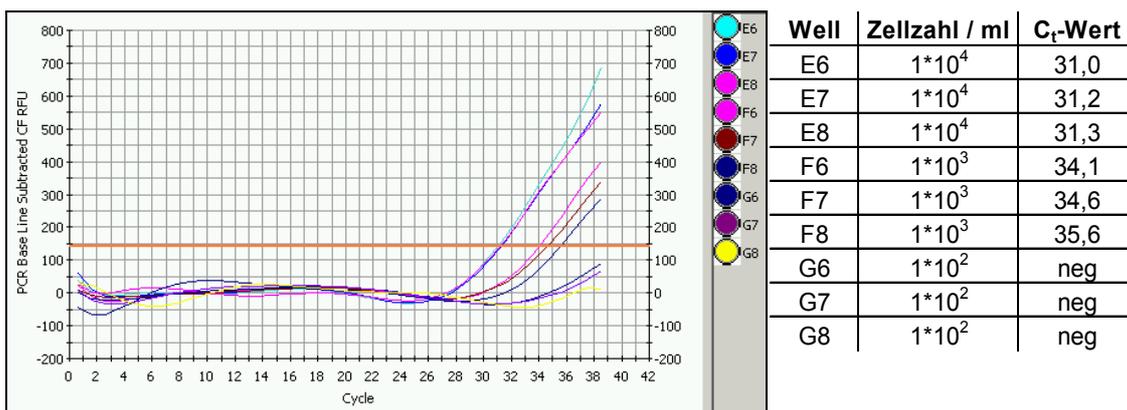
Anh. 21: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des iLcor-Assays ohne IAC; *L. coryniformis* Rein-DNA; 500 pg-0,5 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.2.2



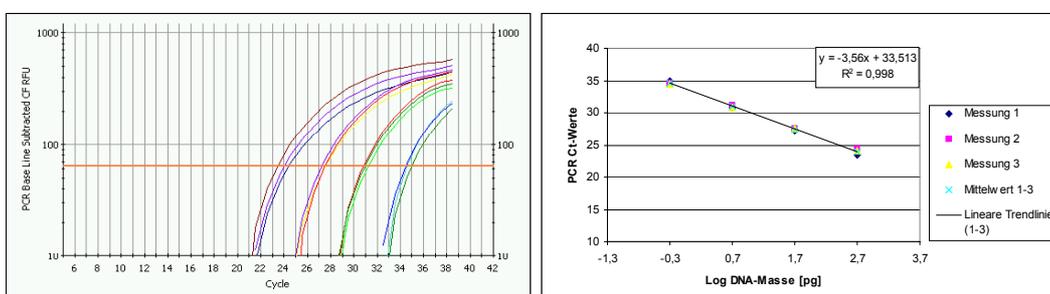
Anh. 22: Sensitivität des iLcor-Assays ohne IAC anhand einer *L. coryniformis*-Verdünnungsreihe; 8*10² – 8*10¹ Zellen/ml (n = 3); Textbezug siehe 6.1.2.2



Anh. 23: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des iLcol-Assays ohne IAC; *L. collinoides* Rein-DNA; 500 pg- 0,5 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.2.2

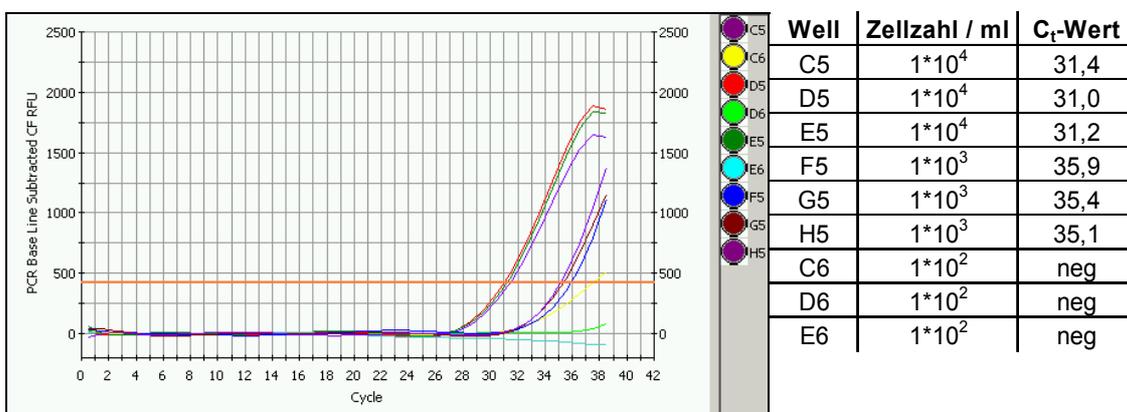


Anh. 24: Sensitivität des iCol-Assays ohne IAC anhand einer *L. collinoides*-Verdünnungsreihe; 1*10⁴ – 1*10² Zellen/ml (n = 3); Textbezug siehe 6.1.2.2

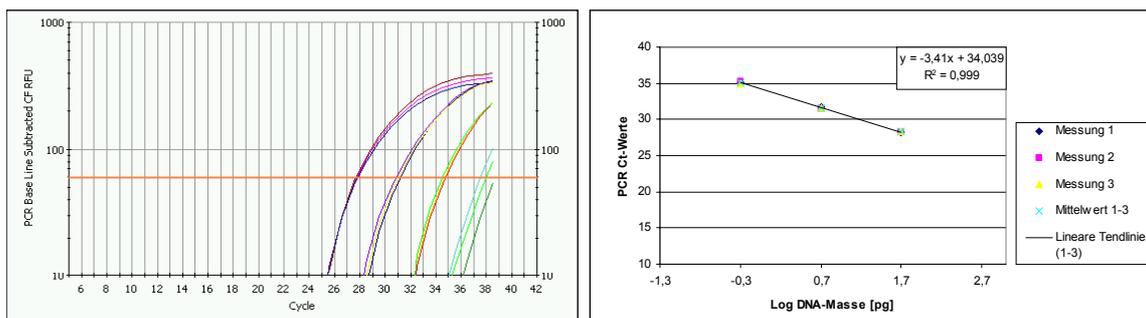


Getestete DNA	DNA-Masse [pg]	C _T -Werte Messung 1	C _T -Werte Messung 2	C _T -Werte Messung 3	C _T -Werte (Mittelwert 1-3)	s	PCR-Effizienz [%]	Slope	R ²
<i>L. lindneri</i>	500	23,41	24,42	24,02	23,95	0,51	91,0	-3,56	0,998
	50	27,21	27,56	27,50	27,42	0,19			
	5	30,79	31,18	30,90	30,96	0,20			
	0,5	34,93	34,55	34,43	34,64	0,26			

Anh. 25: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des iLi-Assays ohne IAC; *L. lindneri* Rein-DNA; 500 pg- 0,5 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.2.2

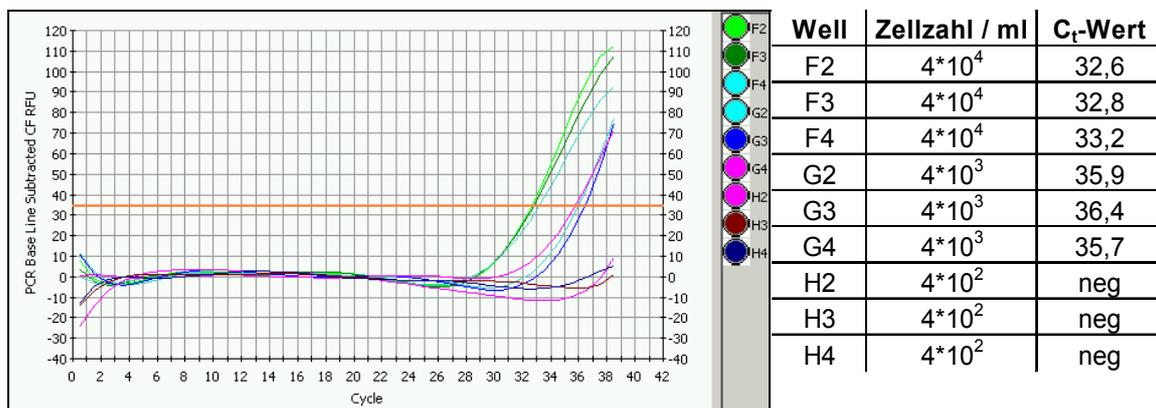


Anh. 26: Sensitivität des iLi-Assays ohne IAC anhand einer *L. lindneri*-Verdünnungsreihe; 1*10⁴ – 1*10² Zellen/ml (n = 3); Textbezug siehe 6.1.2.2

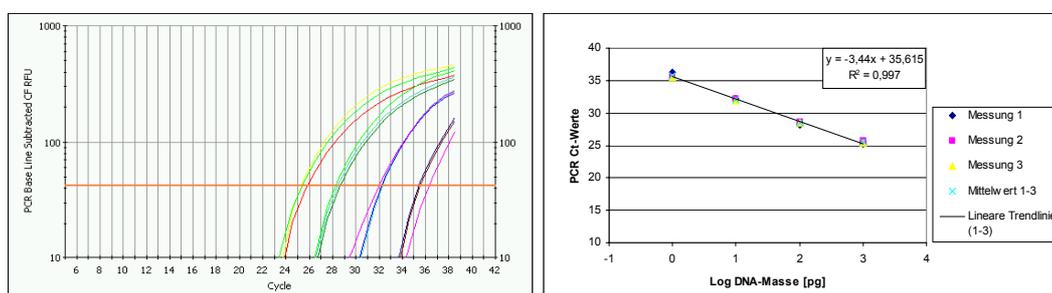


Getestete DNA	DNA-Masse [pg]	C _t -Werte Messung 1	C _t -Werte Messung 2	C _t -Werte Messung 3	C _t -Werte (Mittelwert 1-3)	s	PCR-Effizienz [%]	Slope	R ²
<i>L. perolens</i>	100	28,66	28,58	28,58	28,61	0,05	96,6	-3,41	0,999
	10	31,98	31,64	31,80	31,81	0,17			
	1	35,54	35,43	35,78	35,58	0,18			

Anh. 27: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des iLpe-Assays ohne IAC; *L. perolens* Rein-DNA; 100-1 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.2.2

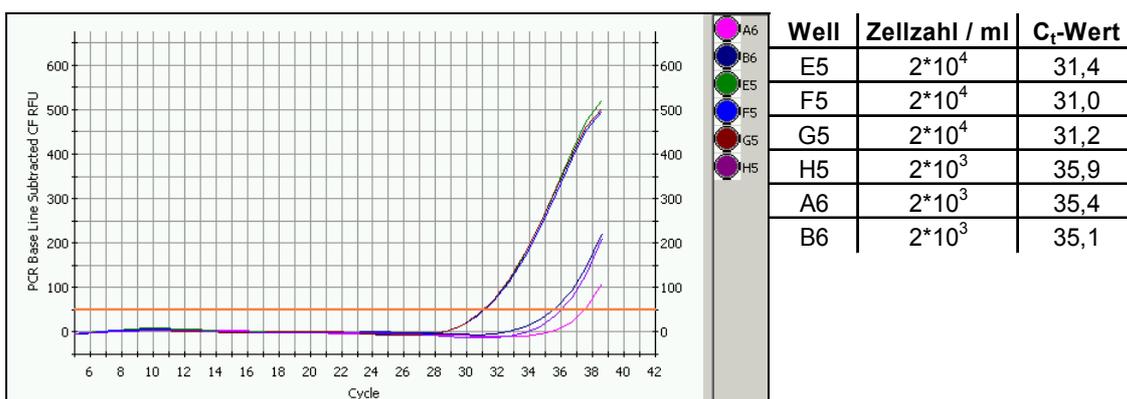


Anh. 28: Sensitivität des iLpe-Assays ohne IAC anhand einer *L. perolens*-Verdünnungsreihe; 4*10⁴ – 4*10² Zellen/ml (n = 3); Textbezug siehe 6.1.2.2

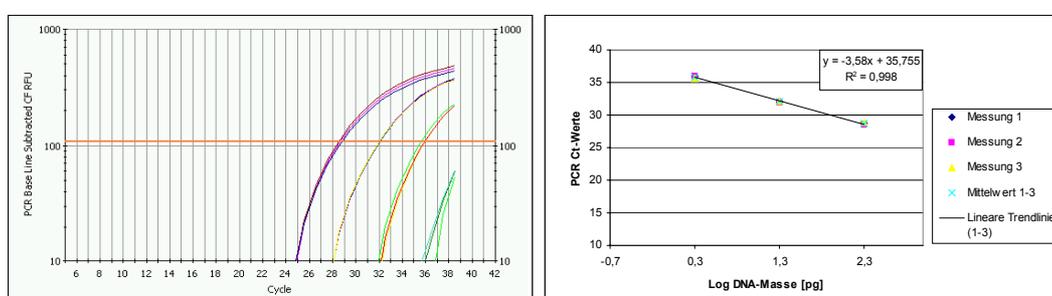


Getestete DNA	DNA-Masse [pg]	C _t -Werte Messung 1	C _t -Werte Messung 2	C _t -Werte Messung 3	C _t -Werte (Mittelwert 1-3)	s	PCR-Effizienz [%]	Slope	R ²
<i>L. plantarum</i>	1000	25,29	25,81	25,36	25,49	0,28	95,1	-3,44	0,997
	100	28,23	28,66	28,44	28,44	0,22			
	10	32,26	32,19	31,94	32,13	0,17			
	1	36,27	35,53	35,41	35,74	0,47			

Anh. 29: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des iLpl-Assays ohne IAC; *L. plantarum* Rein-DNA; 1000 pg-1 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.2.2

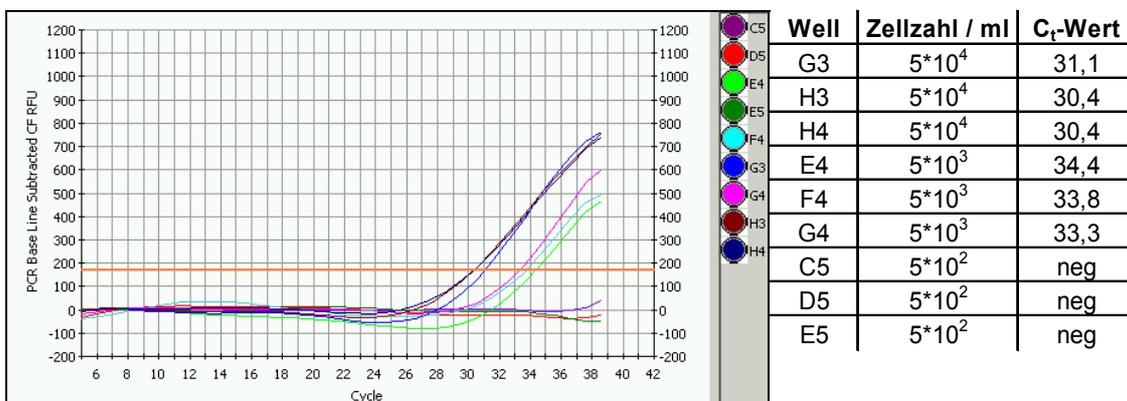


Anh. 30: Sensitivität des iLpl-Assays ohne IAC anhand einer *L. plantarum*-Verdünnungsreihe; 2*10⁴ – 2*10³ Zellen/ml (n = 3); Textbezug siehe 6.1.2.2

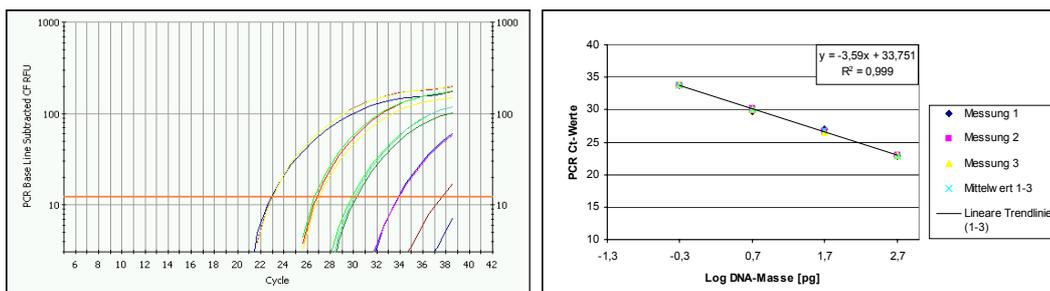


Getestete DNA	DNA-Masse [pg]	C _t -Werte Messung 1	C _t -Werte Messung 2	C _t -Werte Messung 3	C _t -Werte (Mittelwert 1-3)	s	PCR-Effizienz [%]	Slope	R ²
<i>P. damnosus</i>	200	28,69	28,55	28,82	28,69	0,14	90,4	-3,58	0,999
	20	32,06	31,99	32,02	32,02	0,04			
	2	35,96	35,91	35,63	35,83	0,18			

Anh. 31: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des iPda-Assays ohne IAC; *P. damnosus* Rein-DNA; 200 pg-2 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.2.2

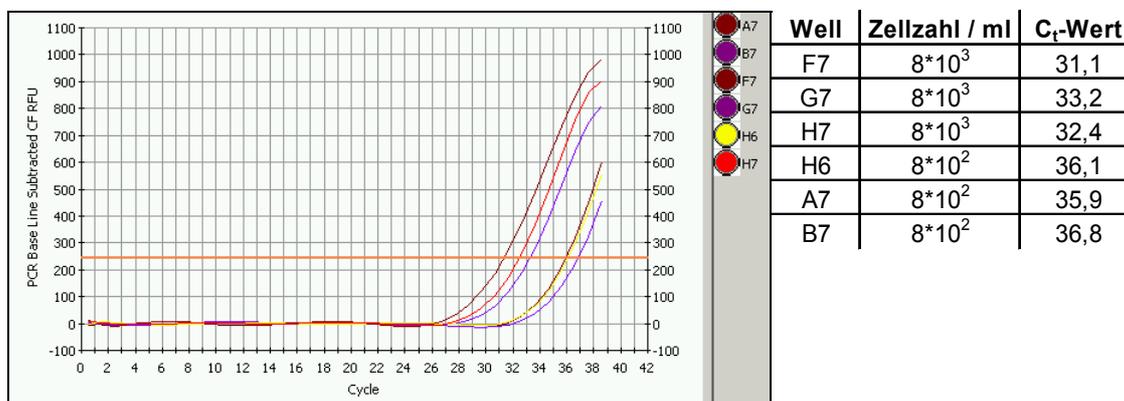


Anh. 32: Sensitivität des iPda-Assays ohne IAC anhand einer *P. damnosus*-Verdünnungsreihe; 5*10⁴ – 5*10² Zellen/ml (n = 3); Textbezug siehe 6.1.2.2



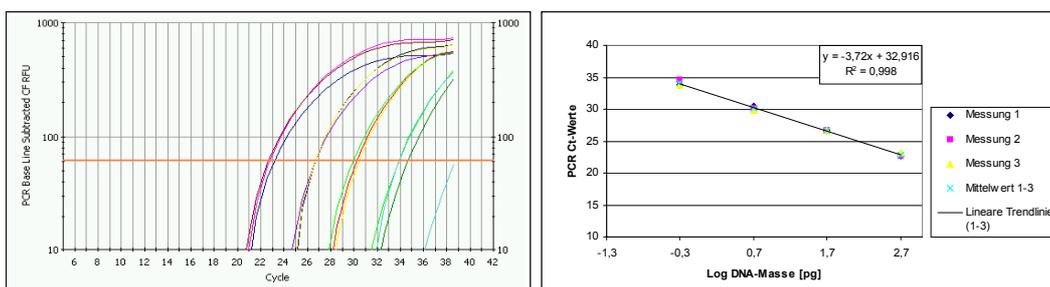
Getestete DNA	DNA-Masse [pg]	C _T -Werte Messung 1	C _T -Werte Messung 2	C _T -Werte Messung 3	C _T -Werte (Mittelwert 1-3)	s	PCR-Effizienz [%]	Slope	R ²
<i>Pectinatus frisingensis</i>	500	22,86	22,92	22,93	22,90	0,04	89,9	-3,59	0,999
	50	26,96	26,76	26,60	26,77	0,18			
	5	29,79	30,16	29,99	29,98	0,19			
	0,5	33,79	33,79	33,83	33,80	0,02			

Anh. 33: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des sPM-Assays ohne IAC; *Pectinatus frisingensis* Rein-DNA; 500 pg-5 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.3.2



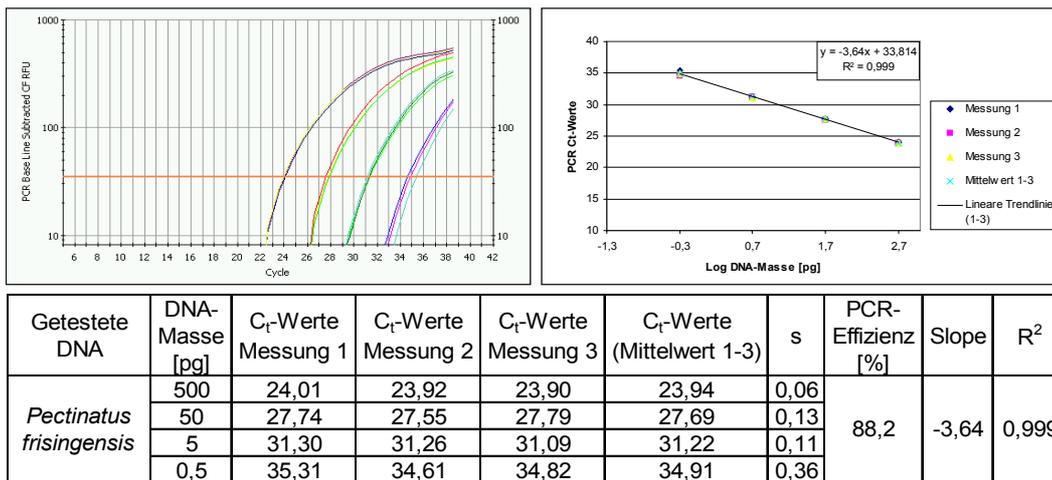
Well	Zellzahl / ml	C _T -Wert
F7	8*10 ³	31,1
G7	8*10 ³	33,2
H7	8*10 ³	32,4
H6	8*10 ²	36,1
A7	8*10 ²	35,9
B7	8*10 ²	36,8

Anh. 34: Sensitivität des sPM-Assays ohne IAC anhand einer *Pectinatus frisingensis*-Verdünnungsreihe; 8*10³ – 8*10² Zellen/ml (n = 3); Textbezug siehe 6.1.3.2

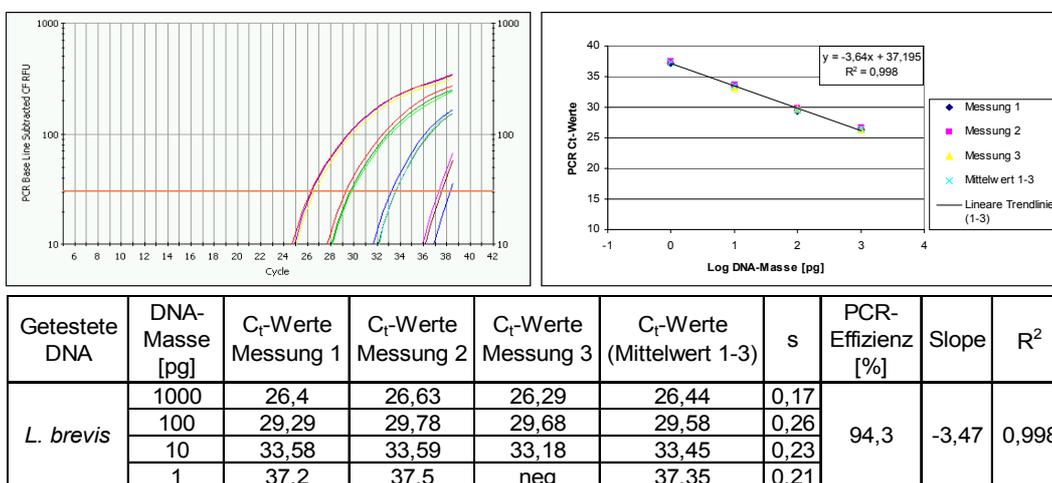


Getestete DNA	DNA-Masse [pg]	C _T -Werte Messung 1	C _T -Werte Messung 2	C _T -Werte Messung 3	C _T -Werte (Mittelwert 1-3)	s	PCR-Effizienz [%]	Slope	R ²
<i>L. brevis</i>	500	22,75	22,64	23,13	22,84	0,26	85,5	-3,72	0,998
	50	26,68	26,67	26,65	26,67	0,02			
	5	30,41	30,19	29,89	30,16	0,26			
	0,5	33,84	34,64	33,82	34,10	0,47			

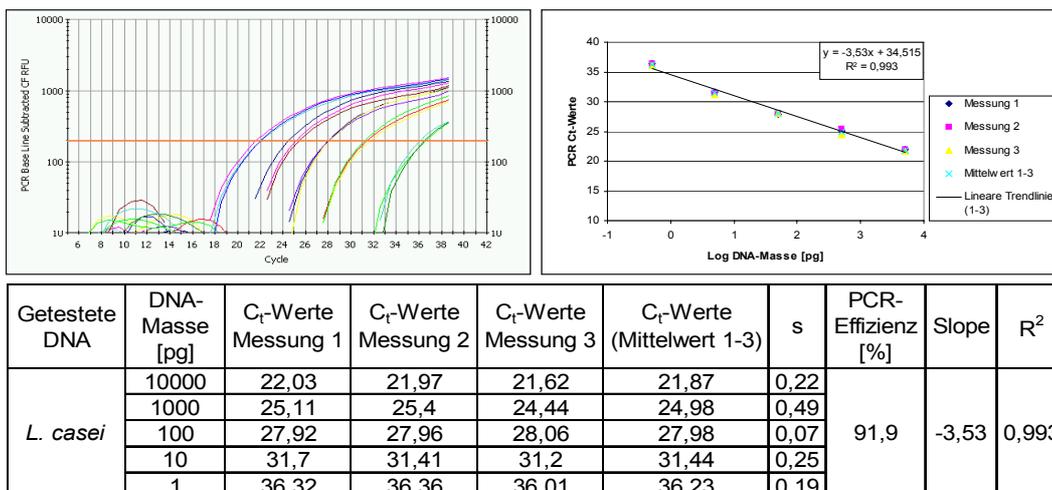
Anh. 35: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des sLPPM-Assays mit IAC; *L. brevis* Rein-DNA; 500 pg-0,5 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.4.2



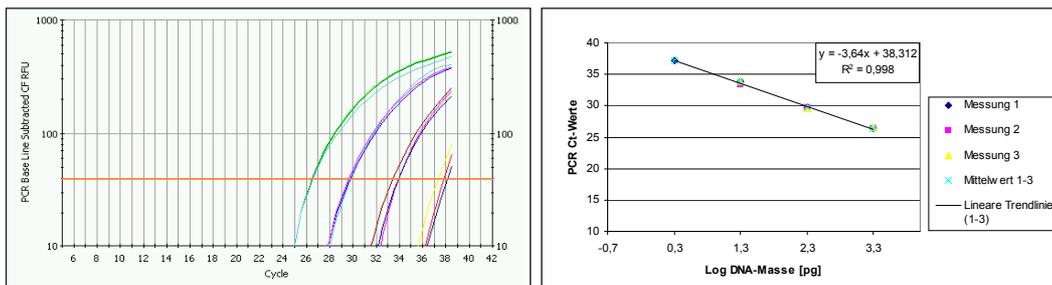
Anh. 36: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des sLPPM-Assays mit IAC; *Pectinatus frisingensis* Rein-DNA; 500 pg-0,5 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.4.2



Anh. 37: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des iLbcp-Assays mit IAC; *L. brevis* Rein-DNA; 1000 pg-1 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.5.2

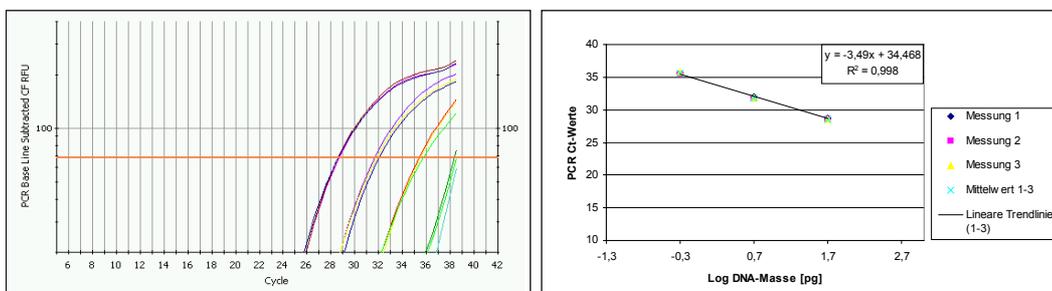


Anh. 38: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des iLbcp-Assays mit IAC; *L. casei* Rein-DNA; 10000 pg-1 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.5.2



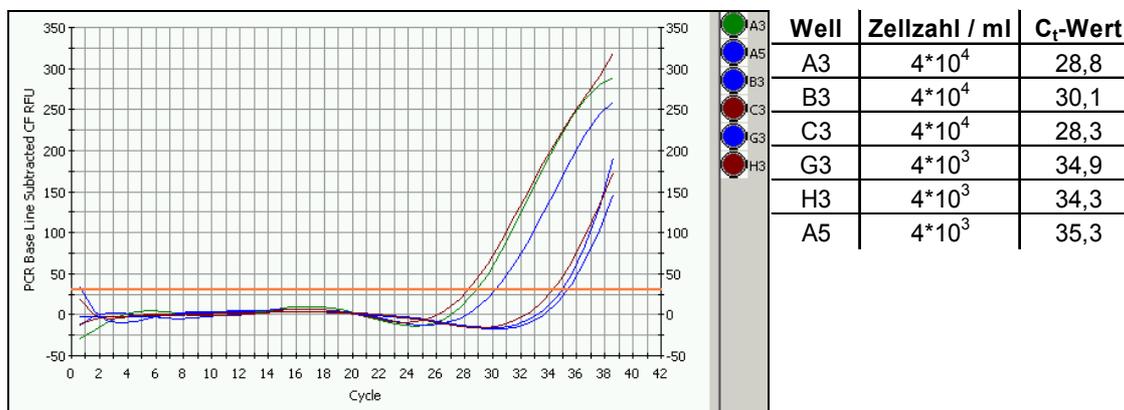
Getestete DNA	DNA-Masse [pg]	C _T -Werte Messung 1	C _T -Werte Messung 2	C _T -Werte Messung 3	C _T -Werte (Mittelwert 1-3)	s	PCR-Effizienz [%]	Slope	R ²
<i>P. damnosus</i>	2000	26,41	26,44	26,51	26,45	0,05	88,5	-3,63	0,998
	200	29,76	29,71	29,57	29,68	0,10			
	20	33,87	33,39	33,86	33,71	0,27			
	2	37,23	neg	neg	37,23				

Anh. 39: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des ilbcp-Assays mit IAC; *P. damnosus* Rein-DNA; 2000 pg-2 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.1.5.2

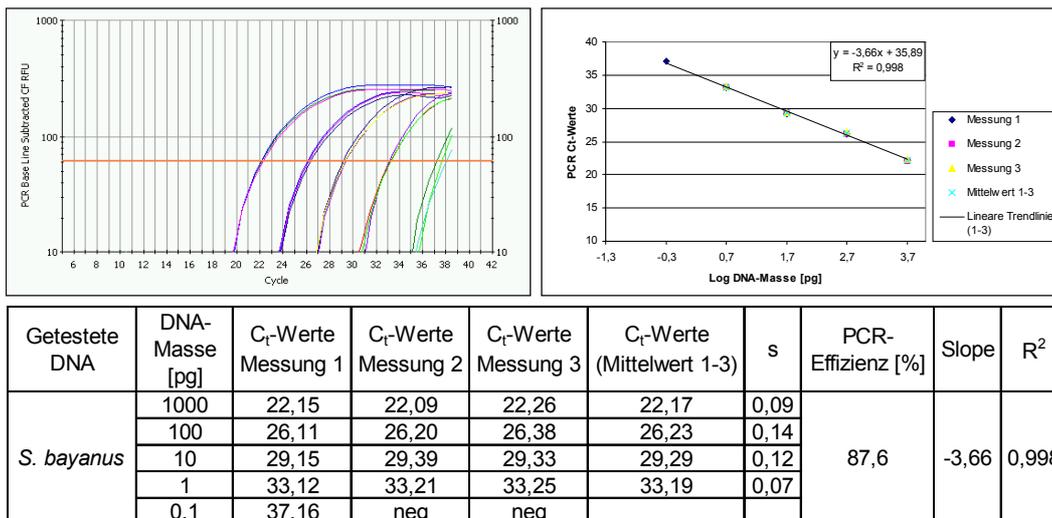


Getestete DNA	DNA-Masse [pg]	C _T -Werte Messung 1	C _T -Werte Messung 2	C _T -Werte Messung 3	C _T -Werte (Mittelwert 1-3)	s	PCR-Effizienz [%]	Slope	R ²
<i>S. cerevisiae</i> WHB 68	50	28,66	28,58	28,58	28,61	0,05	93,5	-3,49	0,998
	5	31,98	31,64	31,80	31,81	0,17			
	0,5	35,54	35,43	35,78	35,58	0,18			

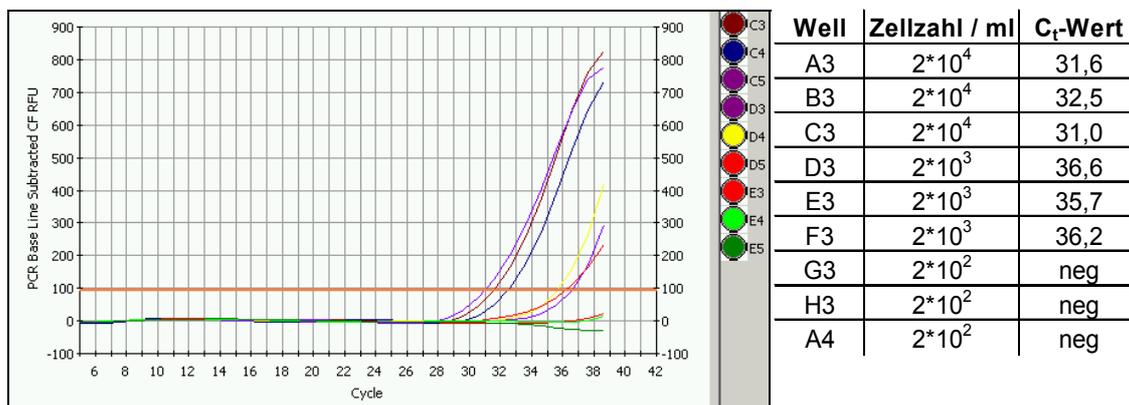
Anh. 40: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des Sce-Assays ohne IAC; *S. cerevisiae* Rein-DNA; 50 pg-0,5 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.2.1.2



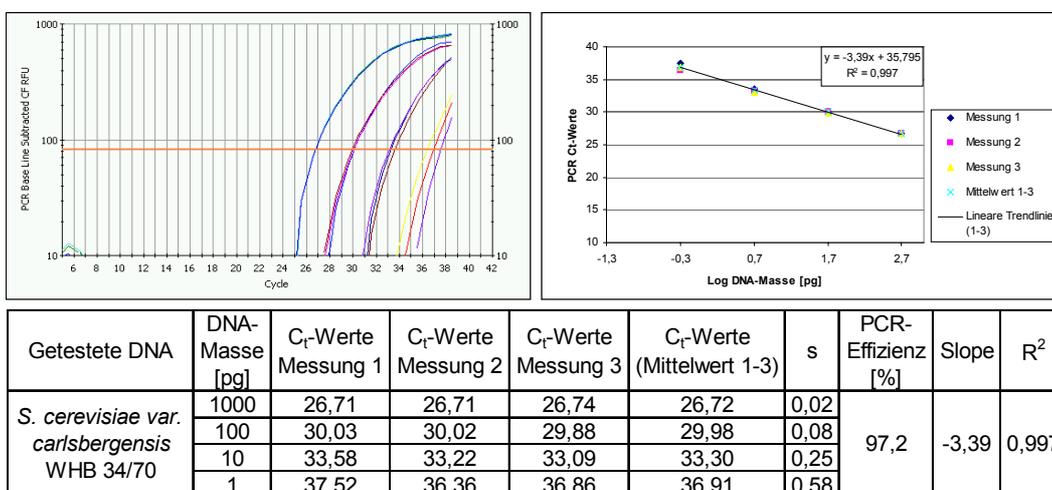
Anh. 41: Sensitivität des Sce-Assays ohne IAC anhand einer *S. cerevisiae*-Verdünnungsreihe (n = 3); 4*10⁴ – 4*10³ Zellen/ml; Textbezug siehe 6.2.1.2



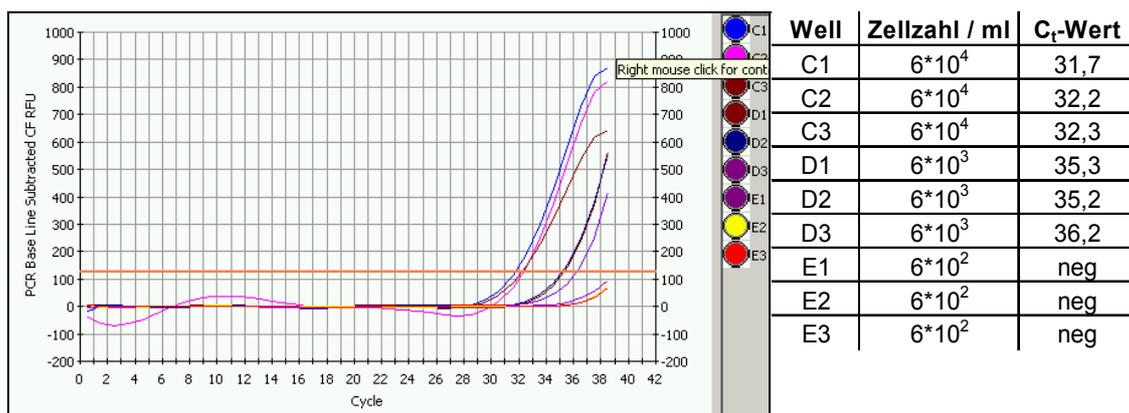
Anh. 42: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des Sbp-Assays ohne IAC; *S. bayanus* Rein-DNA; 1000 pg – 0,1 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.2.2.2



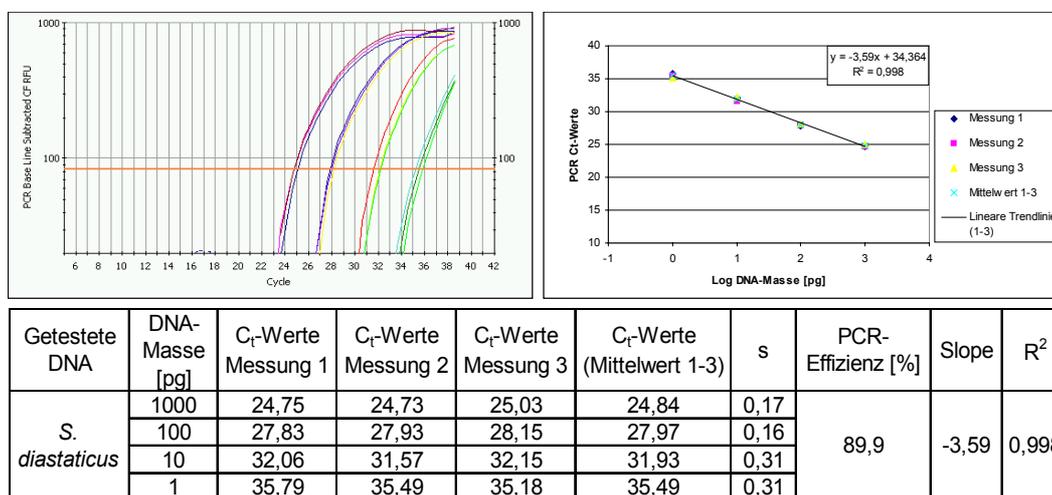
Anh. 43: Sensitivität des Sbp-Assays ohne IAC anhand einer *S. bayanus*-Verdünnungsreihe; Zellen/ml (n = 3); Textbezug siehe 6.2.2.2



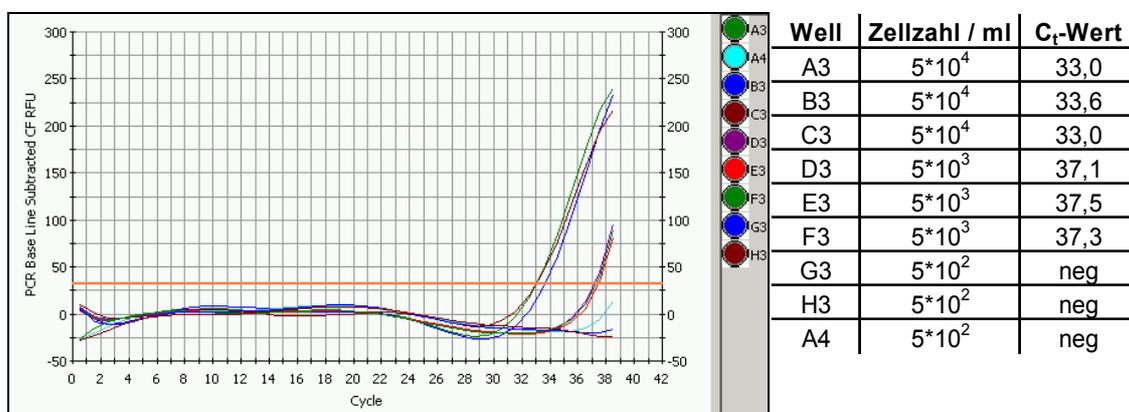
Anh. 44: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des UG-Assays ohne IAC; *S. cerevisiae* var. *carlsbergensis* Rein-DNA; 1000 pg-1 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.2.3.2



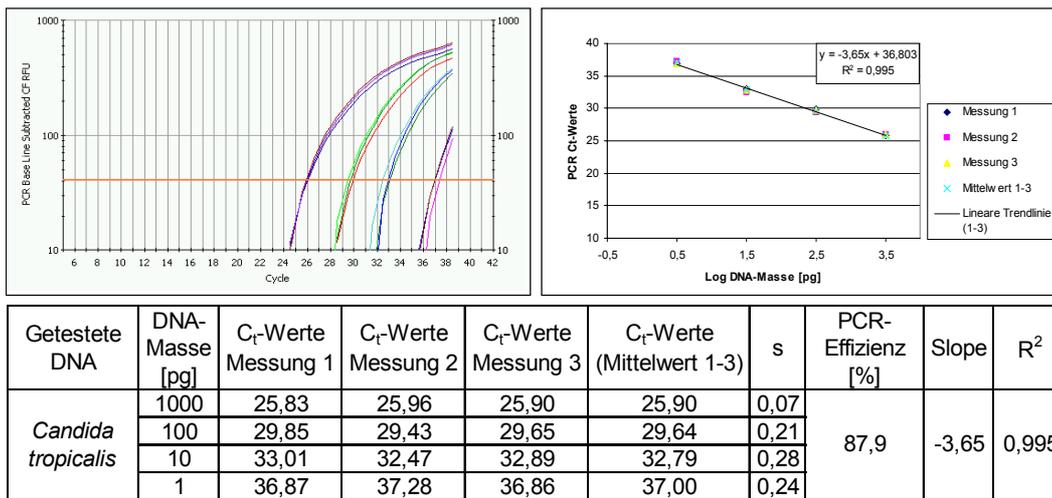
Anh. 45: Sensitivität des UG300-Assays ohne IAC anhand einer *S. cerevisiae* var. *carlsbergensis*-Verdünnungsreihe (WHB 34/70); 6*10⁴ – 6*10² Zellen/ml (n = 3); Textbezug siehe 6.2.3.2



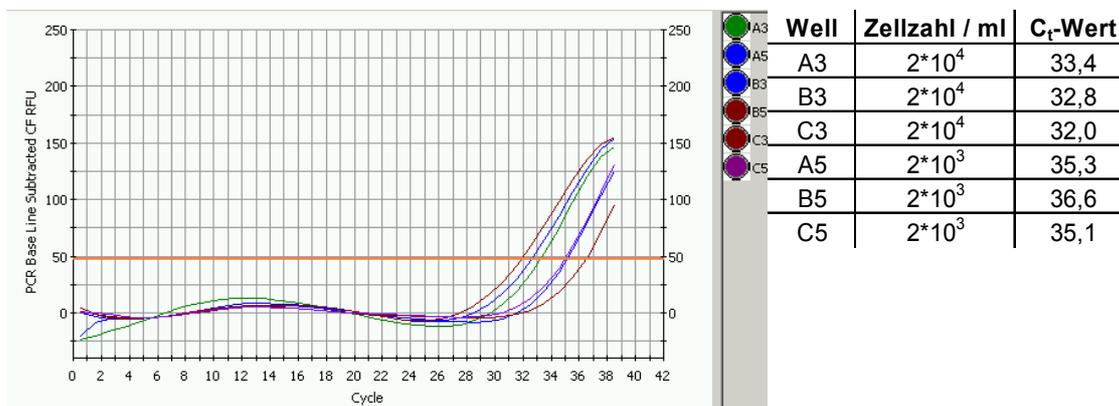
Anh. 46: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des Sdi-Assays ohne IAC; *S. diastaticus* Rein-DNA; 1000 pg-1 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.2.4.2



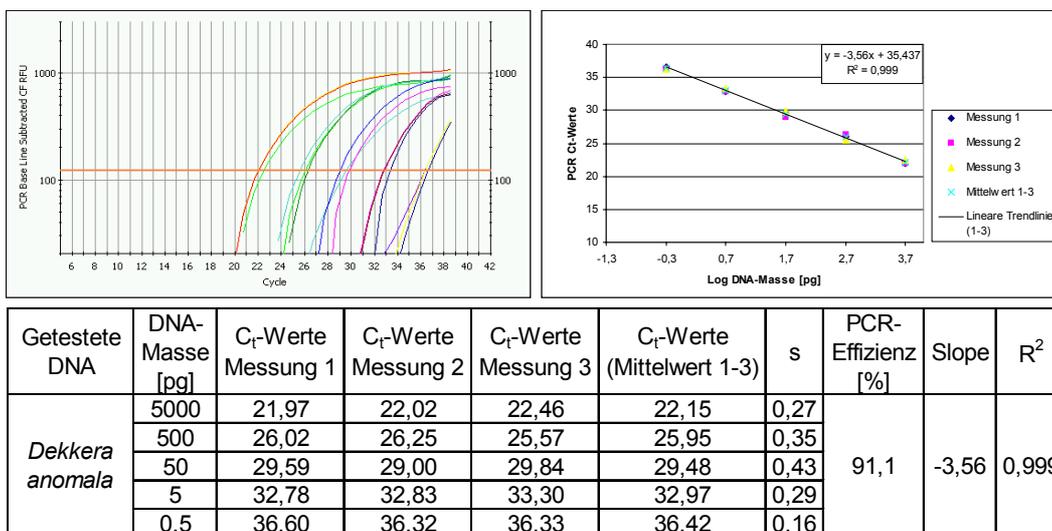
Anh. 47: Sensitivität des Sdi-Assays ohne IAC anhand einer *S. diastaticus*-Verdünnungsreihe; 5*10⁴ – 5*10² Zellen/ml; Textbezug siehe 6.2.4.2



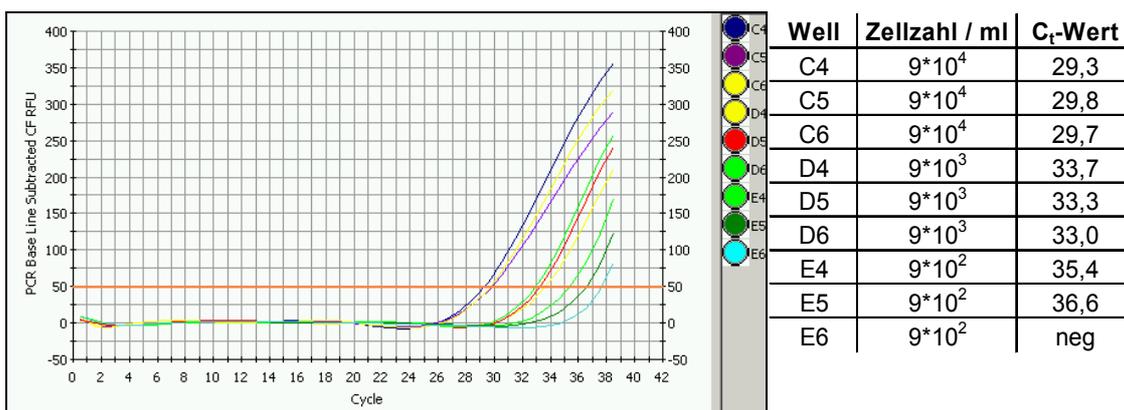
Anh. 48: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des Ctr-Assays ohne IAC; *C. tropicalis* Rein-DNA; 1000 -1 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.2.4.2



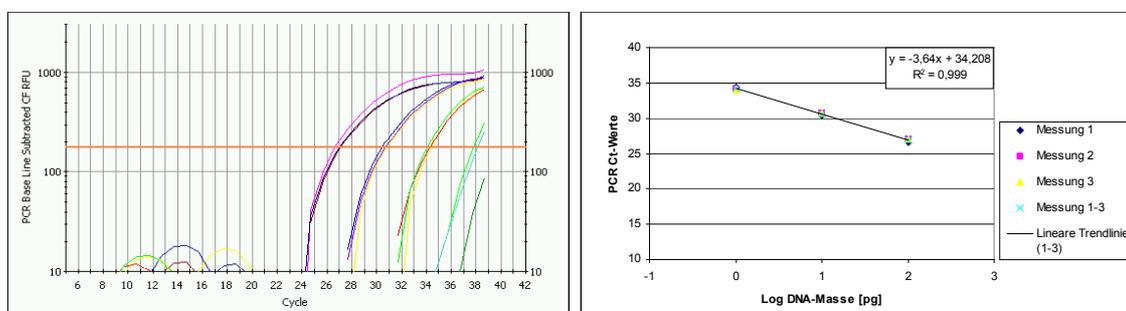
Anh. 49: Sensitivität des Ctr-Assays ohne IAC anhand einer *C. tropicalis*-Verdünnungsreihe; 2*10⁴ - 2*10³ Zellen/ml (n = 3); Textbezug siehe 6.2.4.2



Anh. 50: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des Dan-Assays ohne IAC; *Dekkera anomala* Rein-DNA; 5000 pg-0,5 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.2.5.2

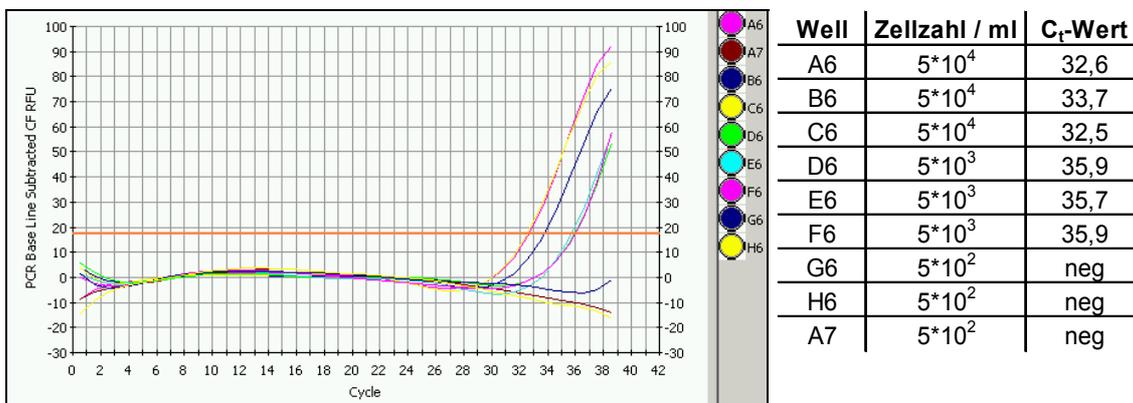


Anh. 51: Sensitivität des Dan-Assays ohne IAC anhand einer *Dekkera anomala*-Verdünnungsreihe; 9*10⁴-9*10² Zellen/ml (n = 3); Textbezug siehe 6.2.5.2

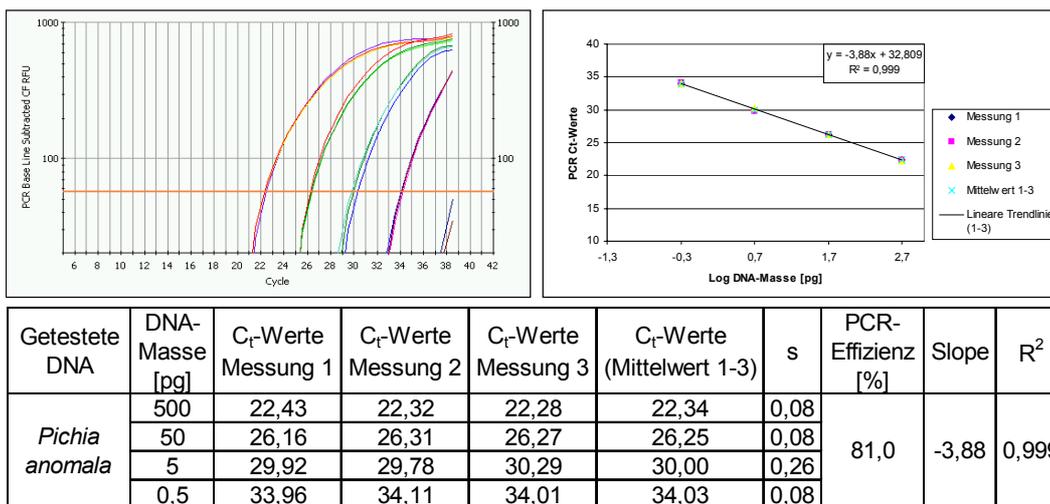


Getestete DNA	DNA-Masse [pg]	C _t -Werte Messung 1	C _t -Werte Messung 2	C _t -Werte Messung 3	C _t -Werte (Mittelwert 1-3)	s	PCR-Effizienz [%]	Slope	R ²
<i>Dekkera bruxellensis</i>	100	26,64	27,06	26,99	26,90	0,23	88,3	-3,64	0,999
	10	30,41	30,68	30,78	30,62	0,19			
	1	34,32	34,21	34,01	34,18	0,16			

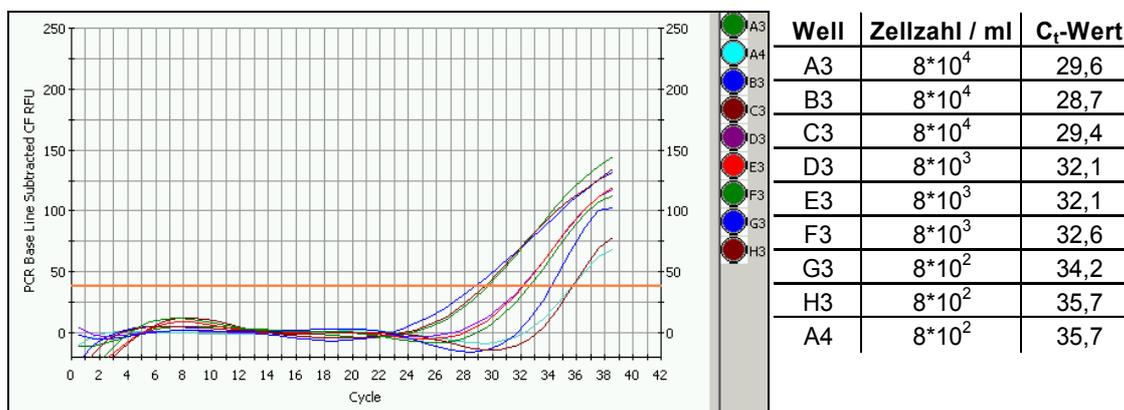
Anh. 52: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des Dbr-Assays ohne IAC; *Dekkera bruxellensis* Rein-DNA; 100 pg-1 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.2.5.2



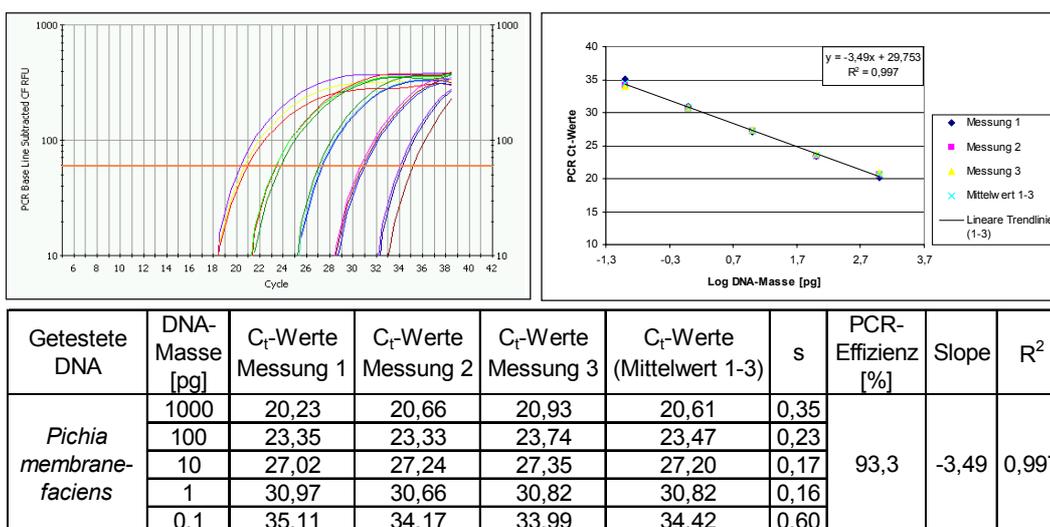
Anh. 53: Sensitivität des Dbr-Assays ohne IAC anhand einer *Dekkera bruxellensis*-Verdünnungsreihe (n = 3); 5*10⁴-5*10² Zellen/ml; Textbezug siehe 6.2.5.2



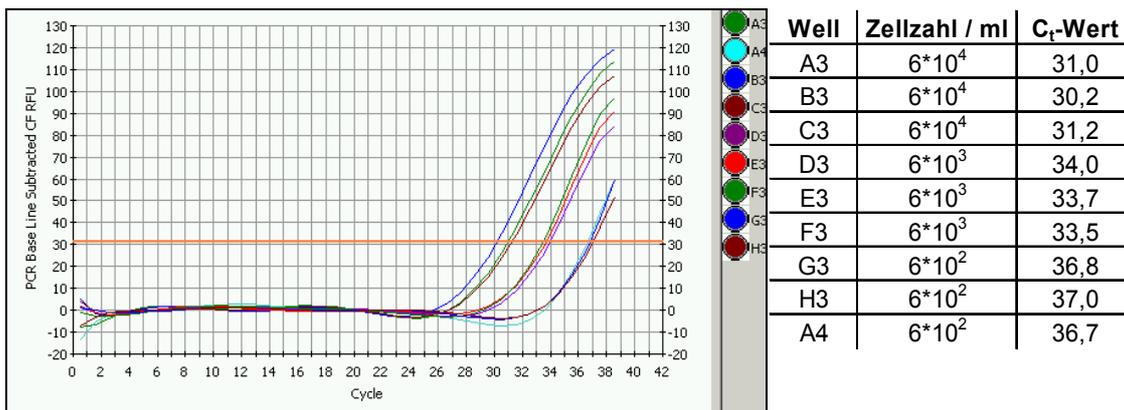
Anh. 54: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des Pan-Assays ohne IAC; *Pichia anomala* Rein-DNA; 500 pg-0,5 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.2.5.2



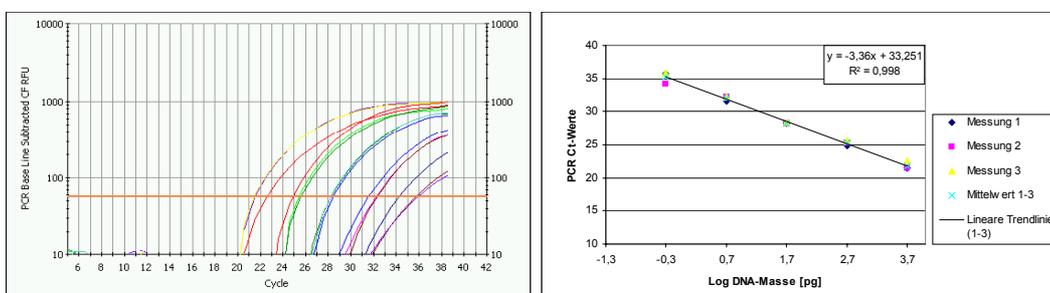
Anh. 55: Sensitivität des Pan-Assays ohne IAC anhand einer *Pichia anomala*-Verdünnungsreihe; 8*10⁴-8*10² Zellen/ml (n = 3); Textbezug siehe 6.2.5.2



Anh. 56: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des Pme-Assays ohne IAC; *Pichia membranefaciens* Rein-DNA; 1000 pg-0,1 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.2.5.2

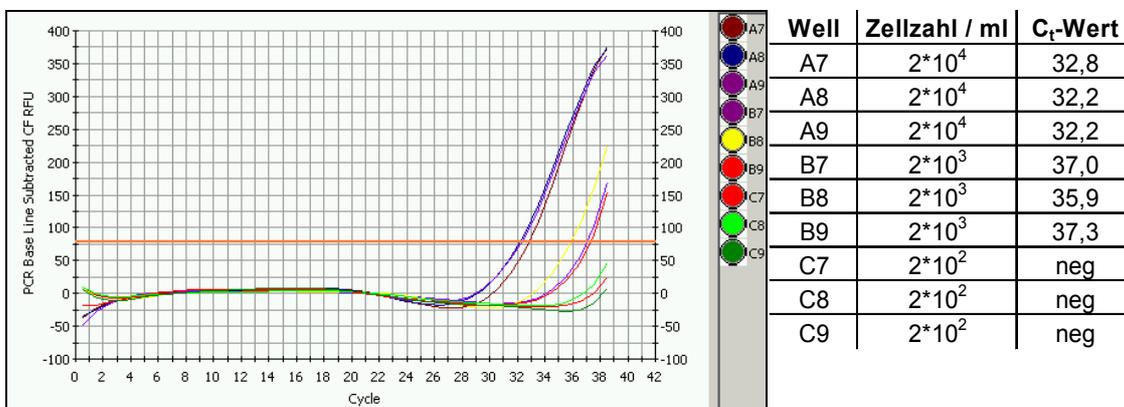


Anh. 57: Sensitivität des Pme-Assays ohne IAC anhand einer *Pichia membranefaciens*-Verdünnungsreihe; 6*10⁴-6*10² Zellen/ml (n = 3); Textbezug siehe 6.2.5.2

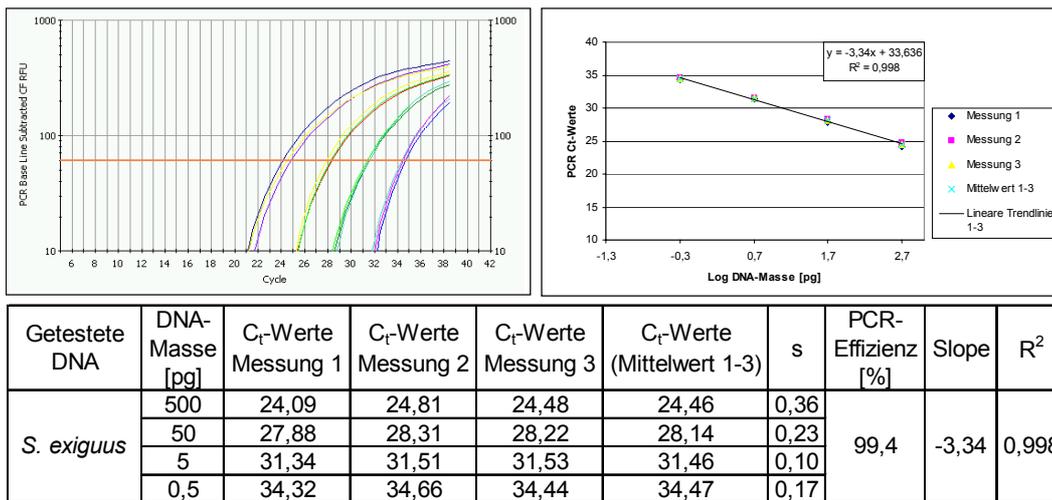


Getestete DNA	DNA-Masse [pg]	C _t -Werte Messung 1	C _t -Werte Messung 2	C _t -Werte Messung 3	C _t -Werte (Mittelwert 1-3)	s	PCR-Effizienz [%]	Slope	R ²
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	1000	21,50	21,41	22,50	21,80	0,61	98,6	-3,36	0,995
	100	24,85	25,35	25,56	25,25	0,36			
	10	28,18	28,19	28,39	28,25	0,12			
	1	31,52	32,16	32,22	31,97	0,39			
	0,1	35,67	34,17	35,83	35,22	0,92			

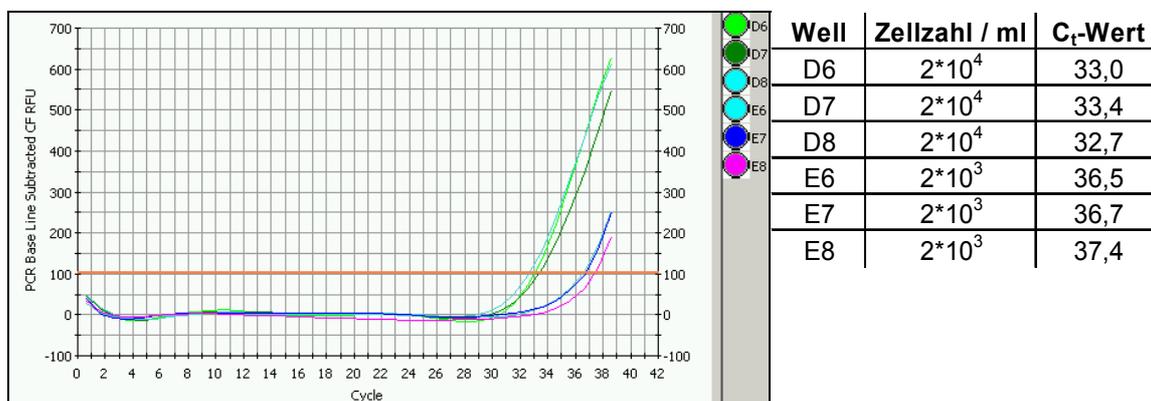
Anh. 58: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des Slu-Assays ohne IAC; *Saccharomyces ludwigii* Rein-DNA; 1000 pg-0,1 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.2.5.2



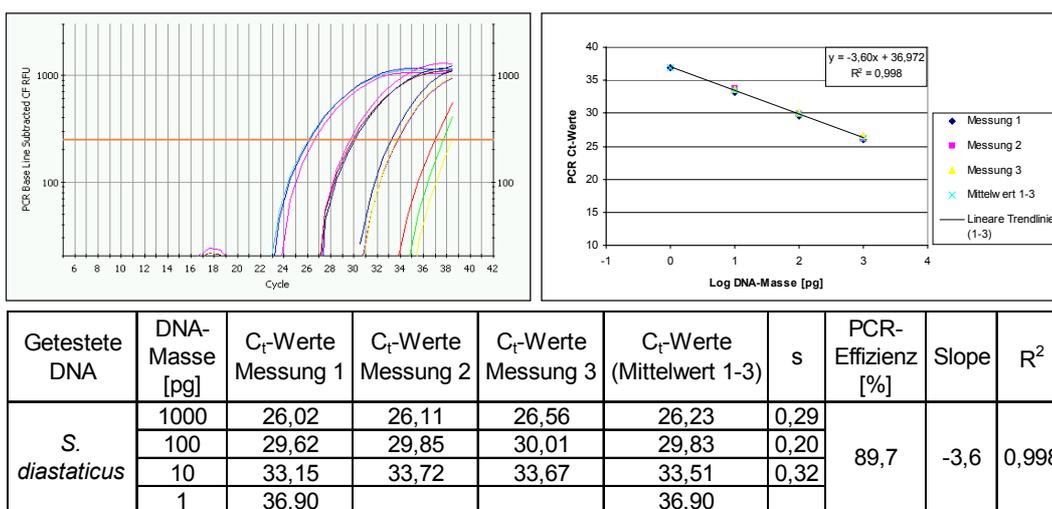
Anh. 59: Sensitivität des Slu-Assays ohne IAC anhand einer *Saccharomyces ludwigii*-Verdünnungsreihe; 2*10⁴-2*10² Zellen/ml (n = 3); Textbezug siehe 6.2.5.2



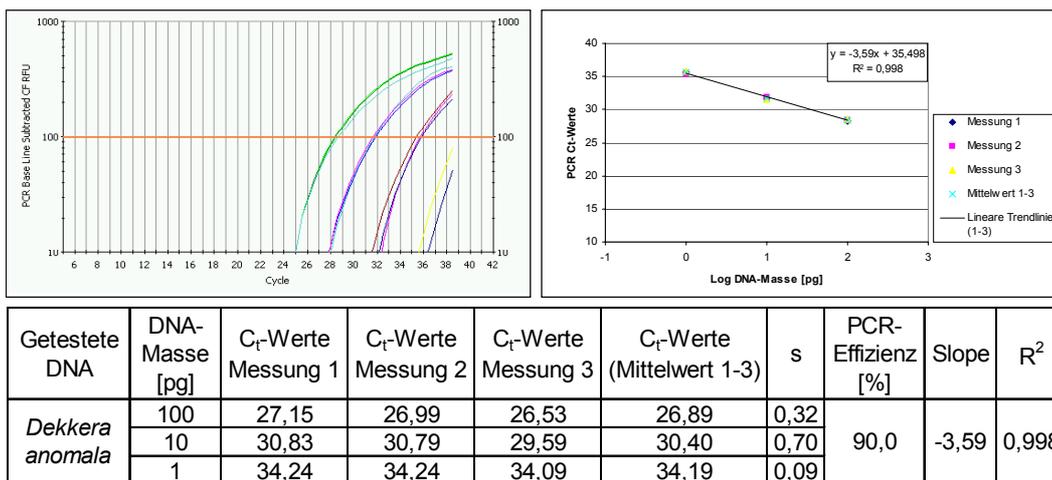
Anh. 60: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des Sx-Assays ohne IAC; *S. exiguus* Rein-DNA; 500 pg-0,5 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.2.5.2



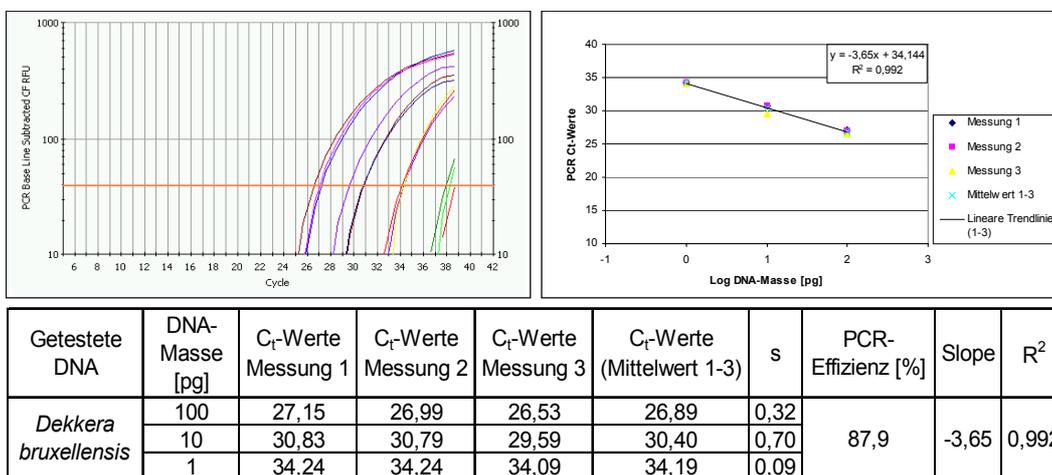
Anh. 61: Sensitivität des Sx-Assays ohne IAC anhand einer *S. exiguus*-Verdünnungsreihe; 2*10⁴-2*10³ Zellen/ml (n = 3); Textbezug siehe 6.2.5.2



Anh. 62: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des sSd-Assays ohne IAC; *S. diastaticus* Rein-DNA; 1000 pg-1 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.2.6.2



Anh. 63: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des sSdD-Assays ohne IAC; *Dekkera anomala* Rein-DNA; 100 pg-1 pg (n = 3); Textbezug siehe 6.2.6.2



Anh. 64: Sensitivität und PCR-Kennzahlen des sSdD-Assays ohne IAC; *Dekkera bruxellensis* Rein-DNA; 100 pg-1 pg (n=3); Textbezug siehe 6.2.6.2