

K.-J. Hutter, S. Lappas, M. Kiehne, D. Kemenji, F. Nitzsche

Kombiniertes Schnellverfahren mit der Mikrosiebfiltration und PCR-Analyse zur direkten Detektion von bierschädigenden Mikroorganismen

Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten, Kontaminanten im Bier nachzuweisen. Diese basieren alle auf der Voranreicherung der Keime in/auf Selektionsmedien. Mit Hilfe der Mikrosiebtechnologie wird eine Methode vorgestellt, mit der man Kontaminanten ohne Voranreicherung direkt auf einem Silikonsieb nachweisen kann. Kontaminanten, die auf das Mikrosieb filtriert werden, können sowohl fluoreszenzoptisch als auch molekularbiologisch (PCR-Analyse) detektiert werden. Damit sind Aussagen über die Funktionalität (tot-lebend Status) als auch über die Identität durchführbar.

BC 02 Mikrobiologie/40 Brauereibiologie (Allgemeines)/42 Fremdorganismen

(Deskriptoren: Fluoreszenzmikroskopie, Fluorochrome, Mikrosiebe, Schnellnachweis, Bierkontaminanten.

Descriptors: Fluorescence microscopy, fluorochromes, micro-sieves, rapid detection method, contaminants in beer).

1 Einleitung

Die CFU und die biologische Standprobe sind in der Betriebskontrolle der Brauerei über Jahrzehnte etablierte Methoden, um Keime im filtrierten Bier nachzuweisen. Der Nachweis lebender, bierschädigender Keime gelingt mit der CFU erst nach 3 bis 14 Tagen je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Keimart. Neben dieser langen Nachweisdauer ist die CFU mit einer Reihe von Fehleinschätzungen und Fehlinterpretationen behaftet.

1. Die Forderung der Brauer, mit einer sensitiven Methode einen Keim in einem Liter nachweisen zu wollen, hat nichts mit statistischer Sicherheit zu tun, wenn man dabei einen Rückschluss auf 3000 oder gar 10 000 hl ziehen muss. Bestenfalls basiert eine derartige Untersuchung auf dem Vertrauen, dass man über Jahre mit dieser Methode gesammelt hat und über einen langen Zeitraum relativ selten ein Fehlergebnis nachweisen konnte.
2. Wenn Keime in der quieszenten Wachstumsphase ihres Zellzyklusses auf ein Filter filtriert werden, dauert es entsprechend lange bis diese Zellen einen neuen Zellzyklus initiieren. Solche Keime bilden aber keine Kolonien in der kurzen Zeit von der Kultivierung bis zur Auswertung der Platten. Daher werden sie nicht erfasst.
3. Keime, die eine lange lag-Phase durchlaufen müssen, wie etwa *Brettanomyces*, seneszente Zellen, pseudoseneszente und/oder membrangeschädigte bzw. stoffwechselgeschädigte

Keime werden mit der CFU nicht erkannt, weil die Überwachung der Kolonienbildung in der Laborroutine maximal 3 Tage dauert. Diese Zeit ist zu kurz.

4. Zur Zeit gibt es keine verlässlichen Nährsubstratmedien für den kulturellen Nachweis von *Pectinatus* und *Megasphaera*.
5. Der entscheidende Nachteil der Membranfiltermethode ist die indirekte Analyse von Mikroorganismen und der Zeitaufwand, der betrieben werden muss, bis ein Ergebnis vorliegt.

Beim heutigen Stand der Technik, mit immer kürzerer, automatisierter Produktion und entsprechend schneller Distribution, benötigt die Braubranche entsprechend schnelle und direkte Kontrollmechanismen – möglichst automatisiert bzw. semiautomatisiert – um Kontaminationen zu detektieren. Dies gilt für alle Bereiche der Produktion vom Unfiltrat-Bereich, dem Filtrat-Bereich, d.h. Drucktank Flaschenkeller bzw. Kegabfüllung, bis hin zur hygienischen Überwachung der CIP-Lösungen und CIP-Anlagen und des Brau- und Reinigungswassers. Eine Vielzahl von indirekten und direkten Schnellverfahren sind in den letzten Jahren entwickelt worden. Einige dieser Methoden sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Bisher hat keine Methode den Durchbruch geschafft, in die biologische Brauereiroutine übernommen zu werden, da nach wie vor Kurzanreicherungen auch bei der PCR-Analyse erforderlich sind (Back et al., 1994) u.a., um den Nachweis der Vermehrungsfähigkeit zu führen oder wie bei der Biolumineszenzanalyse eine bestimmte Keimkonzentration erforderlich ist, damit ein Signal gemessen bzw. eine Analyse erfolgreich durchgeführt werden kann. Die vor Jahren aufgestellte Forderung einiger Brauer, ein effizientes Kontrollverfahren müsse einen Keim in einem Liter Bier nachweisen, war für viele Bemühungen auf dem Gebiet der Schnellnachweise eine zusätzliche, unüberwindliche Hürde. Da diese Forderung in erster Linie ein statistisches Problem darstellt, ist es sinnvoller, ein schnelles, direktes, zeitnahes und automatisierbares Verfahren anzustreben, um möglichst viele Proben untersuchen zu können. Das ideale Verfahren wäre eine direkte Keimdetektion ohne Voranreicherung. Beim derzeitigen Kenntnisstand in der Brauereitechnologie fehlt es an einer direkten Methode den tot-lebend Status von Kontaminanten und gleichzeitig eine Identifikation nachzuweisen und zwar ohne Voranreicherung.

Ziel unserer Untersuchungen war es, mit Hilfe einer neuen Filtertrügerschicht, den Mikrosieben und der PCR-Analyse eine Kombination aus Filtration, die in der Brauerei bekannt ist, und der

Direkte Schnellnachweisverfahren			Indirekte Schnellnachweisverfahren			Tabelle 1 Direkte und indirekte Schnellnachweisverfahren im Vergleich
Methode	Vor-/Nachteile	Literatur	Methode	Vor-/Nachteile	Literatur	
<u>Immunologischer Nachweis</u>	– keine mAK und pAK für Bierschädlinge	Hutter (1991) Becker (1997)	<u>Biolumineszenz</u>	– bestimmte Keimzahl erforderlich (10 ³ – 10 ⁴)	Avis & Smith (1989) Annemüller et al. (2001)	
<u>DEFT</u>	– Acridinorange ist kein Vitalfluorochrom	Pettipher et al. (1981)	<u>Impedanzanalyse</u> (Messung des elektrischen Widerstandes in der Nährlösung)	– bestimmte Keimzahl erforderlich (10 ⁵ – 10 ⁶)	Baumgart (1993) Unkel(1993)	
<u>Fluözytometer</u>	+ Spezies können genauer charakterisiert werden.	Hutter et al. (1991, 2001)	<u>PCR-Technik</u> (Amplifizierung von geringsten DNA-Mengen)	– 24 Stunden Voranreicherung Hohe Spezifität, Sensitivität u. Identifikation d. Kontaminanten	Schleifer (1997) Kiehne (2000) Bergdorf (2003)	
<u>Fluoreszenz-Bildanalyse</u> (Bestimmung der Esteraseaktivität)	+ Ergebnis ist sofort bekannt.	Hutter et al. (1993) Rotman & Papermaster (1963)	<u>Membranfiltration und Bebrütung auf Selektionsnährböden</u>	– zeitintensiv + sicher und zuverlässig	Brauerei-handbücher	
<u>Mikrosieb-Filtration plus nachgeschaltete PCR-Analyse</u>	+ Ergebnis ist sofort bekannt. – Methode ist noch in der Entwicklung	Hutter et al. (2003) in Vorbereitung	<u>MMCF Methode</u> (CFU-Technik mit Einsatz eines Farbstoffes)	– Farbstoffe toxisch, wachstums hemmend, Auswertung nach 3–5 Tagen	Rusch & Krämer (1990)	
			<u>Biofilm</u>	– zeitintensiv, Nachweis unspezifischer Keimgruppen	Storgard et al. (2000)	

neuen molekularbiologischen Analyse anzuwenden, um eine direkte Identifikation funktioneller Keime durchzuführen.

2 Material und Methoden

2.1 Mikrosiebe

Die Mikrosiebtechnologie ist eine neue Filtrationsträgerschicht zum direkten Nachweis von Kontaminanten auf dem Filter.

Das Mikrosieb wird mit der Mikro System Technologie hergestellt (Van Rijn, C. et al, 2001). Das Ausgangsmaterial ist ein 100-mm-Silikonwaver, welcher als Träger für den Membranlayer dient. Anschließend wird ein dünner Layer aus Silikonitrid durch Aufdämpfen bei Niederdruck aufgebracht. Aus diesem Layer entsteht der Filter. Durch lithographische und Dünnschichttechniken, abgeleitet aus der Halbleiterindustrie, werden nun die Poren aus dem Silikonitrid herausgeätzt. An der Unterseite des Silikonwavers wird der Silikonitridlayer mit dem oben genannten Verfahren von Silikonwaver unterhalb der geätzten Pore herausgelöst. Dadurch entsteht eine freihängende Membran aus Silikonitrid, welche durch Silikon gestützt wird (Abb. 1).

2.2 PCR-Analyse:

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wird mit dem **foodproof®** Beer Screening der Fa. BIOTECON Diagnostics auf dem Light

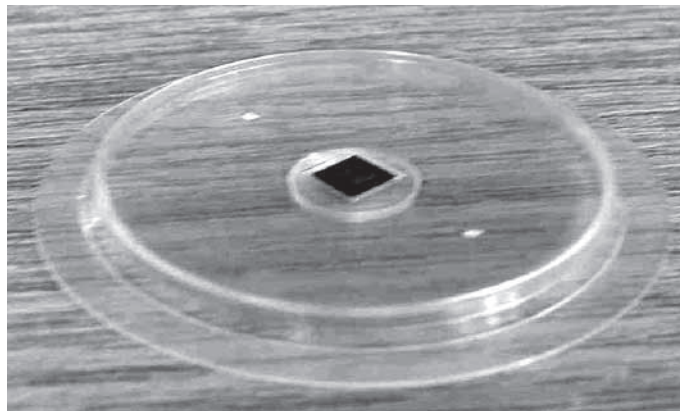


Abb. 1 Makroskopische Aufnahme des Mikrosiebes

Cycler™ der Fa. Roche Diagnostics durchgeführt. Dieses System ist in der Lage, 14 obligat bierschädliche Bakterien in einem Test nachzuweisen und zu identifizieren. Dazu wird DNA der gesuchten Bakterien innerhalb einer Stunde gezielt vervielfacht (PCR) und mittels Fluoreszenzsonden detektiert. Im Anschluss wird mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse eine Identifikation der Keime vorgenommen (20 Min.). Die Gesamtdauer der Analyse inklusive der Probenvorbereitung beläuft sich auf zwei Stunden für ca. 30 Proben. Daher ist dieses System für den Nachweis von Bakterien in Kombination mit einem Mikrosieb besonders geeignet.

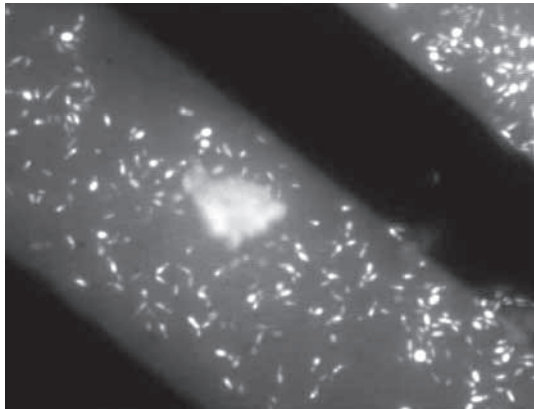


Abb. 2a
Lebende Hefezellen mit Fluoresceindiacetat inkubiert (Grünfluoreszenz)

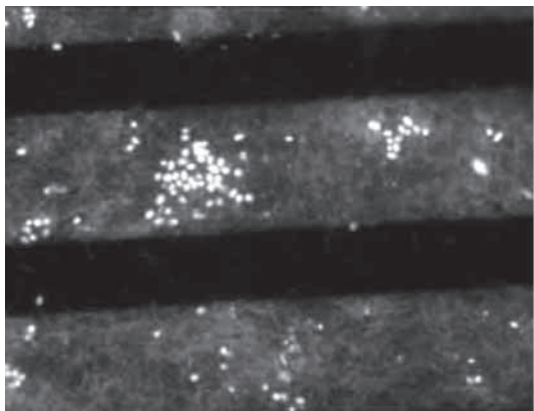


Abb. 2b
Tote Hefezellen mit Propidiumjodid gefärbt (Rotfluoreszenz)

2.3 Probenaufbereitung für die PCR Analyse

Die Filter wurden mit 1 ml PBS durch mehrmaliges Pipettieren abgespült. PBS wurde in einer Petrischale aufgefangen und anschließend in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lösung wurde zentrifugiert (5 Min. bei 15.000 g) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 100 ml überschichtet, resuspendiert (Vortex) und für 10 Minuten bei 95° C inkubiert, um die Zellen aufzubrechen und die DNA zu extrahieren. Im Anschluss wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation aus der Lösung entfernt und der Überstand für die PCR eingesetzt (2.5 ml) (Kiehne et al., 2002).

2.4 Viability-Check

Es gibt verschiedene kommerziell erhältliche Fluoreszenzfarbstoffe und fluorogene Substrate zur Viability-Analyse. In dieser Untersuchung wurde die Kombination FDA/PI zum Nachweis von Hefen durchgeführt (Hutter, 1992). Die Abb. 2a zeigt lebende (viable) Hefezellen mit FDA und tote Hefezellen Abb. 2b mit Propidiumjodid behandelt.

3 Ergebnisse

3.1 Vorbehandlung neuer Siebe:

Neue Mikrosiebe sollten keinesfalls trocken eingesetzt werden, da die Filtrationsgeschwindigkeit sofort gegen null geht. Die Oberfläche der Mikrosiebe ist nicht hydrophil, so dass keine Benetzung mit Flüssigkeit stattfindet. Daher muss eine hydrophile Oberfläche geschaffen werden. Dazu eignet sich Ethanol (70% p.a.). Der positive Nebeneffekt der Ethanolspülung ist eine Sterilisation des Filtersiebes.

3.2 Temperatureinfluss auf das Filtrationsverhalten von Mikrosieben

Da die Filtermatrix der Mikrosiebe aus Silikonitrid besteht, musste zunächst geklärt werden, ob unterschiedliche Temperaturen einen Einfluss auf das Material haben. Diese Untersuchung zeigte zum einen, dass diese Matrix Temperaturen standhält, die für die Filtration von Bier und für die anschließende Reinigung in Frage kommen. Zum anderen wurde für die Routinefiltration die optimale Arbeitstemperatur gefunden. Dies war wichtig, um ein möglichst großes Biervolumen in kürzester Zeit zu filtrieren.

Die Silikonitrid-Siebe halten Temperaturen bis zu 50° C aus. Es empfiehlt sich Bier zu erwärmen (37° C) ohne eine Entkohlensäuerung durchzuführen.

3.3 Reinigung der Siebe zur Mehrfachverwendung

Die Mikrosiebe haben den Vorteil, dass man sie nach einer Reinigung und anschließender Sterilisation mehrfach wiederverwenden kann. Eine Wiederverwendung des Siebes ist aus ökonomischen Gründen zu bevorzugen.

Tabelle 2 Wirkung von Reinigungslösungen auf Mikrosiebe im Vergleich

Reinigungslösung	Auswirkungen auf den Siebträger	Auswirkungen auf die Sieboberfläche	Auswirkungen auf die Siebunterseite	Reinigungswirkung	Verwendbarkeit*)
NaOH 1% + H ₂ O ₂ 2% (40°C)	Keine	Keine	Keine	Sehr gut (Einwirkzeit 30 min); Zellen lassen sich alle abspülen, Sieb wird befreit von Schmutzpartikeln.	+++
H ₂ O + H ₂ CO ₃	Keine	Keine	Keine	Zellen und Aggregatbildungen lassen sich sehr gut ablösen. Auf 60°C erwärmt kann man die Reinigungszeit verkürzen.	+++
HCl 1 N	Keine	Keine	Keine	Gut; entfernt Schmutzpartikel vom Filter, Zellen weniger	++
Enzymlösungen (Cipzym- und Finzymlösung)	Keine	Keine	Keine	Gut. Entfernt zu 90% Proteine vom Sieb, dauert aber ca. 2 Stunden.	++
Mechanisch Ultraschall	Keine	Komplette Zerstörung der Filtermatrix	Komplette Zerstörung der Filtermatrix	-	---

*) +++ Optimal; ++ Gut; - Schlecht; --- Sehr schlecht - davon ist abzuraten

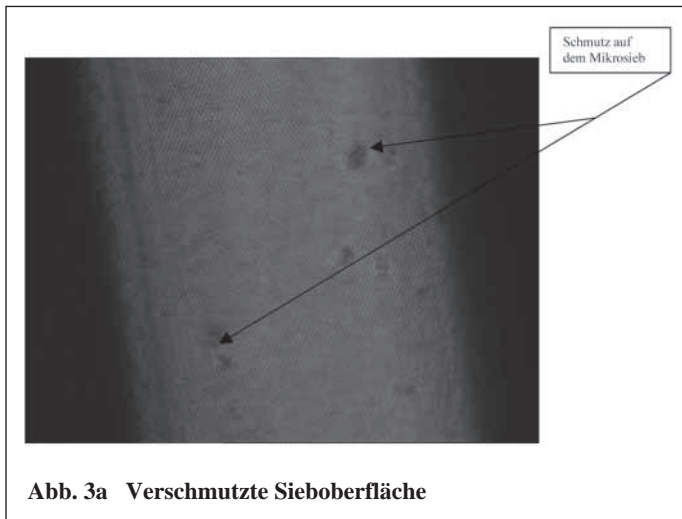


Abb. 3a Verschmutzte Sieboberfläche

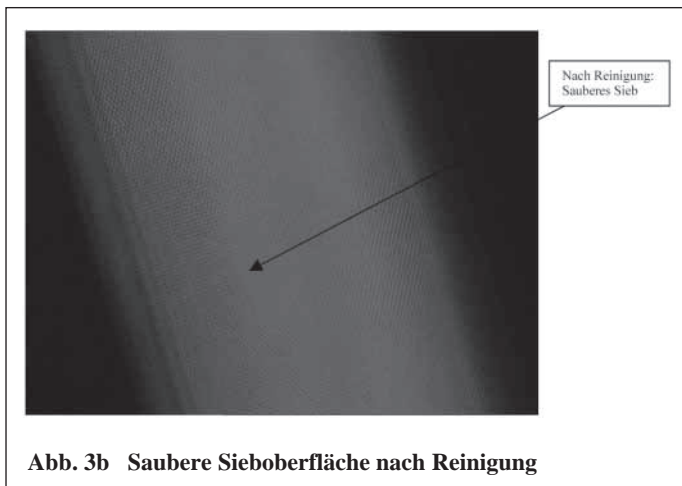


Abb. 3b Saubere Sieboberfläche nach Reinigung

mischen Gesichtspunkten zu empfehlen. Bei der Reinigung der Siebe muss jedoch darauf geachtet werden, dass keine Chemikalien eingesetzt werden, die nachteilig oder zerstörend mit dem Filtermaterial oder toxisch auf die Keime reagieren. Grundsätzlich dürfen keine spitzen Gegenstände zur Reinigung eingesetzt werden, da eine mechanische Berührung die Siebe beschädigt (vgl. Tabelle 2).

3.4 PCR-Nachweis von Bierkontaminanten mit foodproof® Beer Screening der Fa. Bioteccon Diagnostics

Bierschädliche Bakterien bzw. rückgespülte Kontaminanten sollten ohne Voranreicherung mit Hilfe des foodproof® Beer Screening Systems auf den Mikrosieben nachgewiesen werden. Hierzu wurde Bier mit einer geringen Anzahl von Keimen angeimpft und ein Volumen von ca. 20 ml über die Mikrosiebe filtriert (10^5 Keime). Die auf diesem Filterträger isolierten Keime wurden anschließend **nicht** für die PCR Analytik fixiert.

Die rückgespülten Zellen vom Mikrosieb wurden in einem Falcon-Röhrchen gesammelt und ebenfalls unfixiert mit den wie oben behandelten Mikrosieben an das Labor der Firma Bioteccon Diagnostics zur PCR Analyse versandt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 3 dargestellt. Bei allen Proben konnten Bierschädlinge nachgewiesen werden.

Die Abbildungen 4a und 4b zeigen die Detektion von *L.brevis* bzw. *P. damnosus*. Als cp-Wert (Crossing Point) wird der Zellzyklus angegeben, bei dem das Signal aus dem Hintergrund

Tabelle 3 Untersuchungsbefund von Filtermaterial bzw. Zellen in Suspension

Filtermaterial bzw. Zellen in Suspension	Eingesandte Keimart	Befund der Fa. Bioteccon
Mikrosieb	<i>Pediococcus damnosus</i> + Hefen	<i>Pediococcus damnosus</i>
Rückgespülte Zellen von einem Mikrosieb (0,5 µm)	<i>Pediococcus damnosus</i> + Hefen	<i>Pediococcus damnosus</i>
Rückgespülte Zellen von einem Mikrosieb (0,5 µm)	<i>L.brevis</i> + Hefen	<i>L.brevis</i> oder <i>L.lindneri</i>

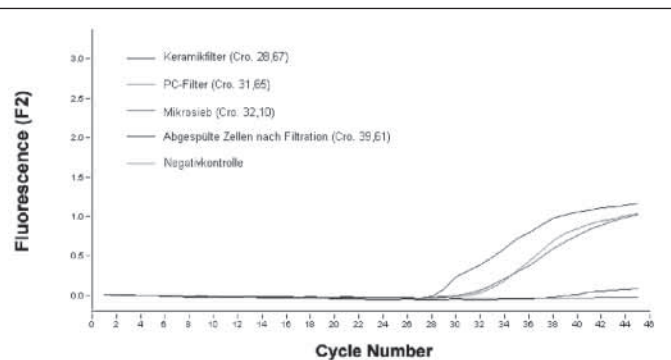


Abb. 4a PCR-Analyse bierschädigender Kontaminanten (*L. brevis*) auf verschiedenen Filterträgerschichten (siehe Mikrosiebe)

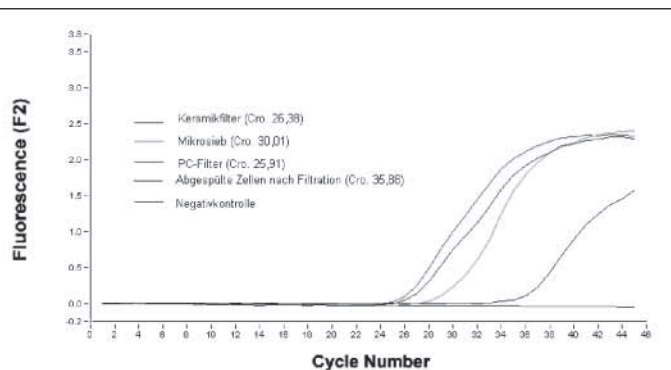


Abb. 4b PCR-Analyse bierschädigender Kontaminanten (*P. damnosus*) auf verschiedenen Filterträgerschichten (siehe Mikrosiebe)

herauskommt und der abhängig ist von der eingesetzten DNA-Menge. Je höher dieser Wert ist, desto niedriger war die initiale DNA-Konzentration in der Probe. In beiden Fällen ist der cp-Wert für die rückgespülten Zellen deutlich höher als bei den Proben, die direkt vom Filter im Labor der Bioteccon Diagnostics analysiert wurden. Die rückgewonnene Menge an Zellen ist in diesen Fällen um mehr als eine Zehnerpotenz niedriger.

In den Abbildungen 4c und 4d sind die Schmelzkurven der Bierschädlinge dargestellt. Anhand dieser typischen Kurven lassen sich die Keime identifizieren. Im Fall von *L. brevis* liegt der Peak bei 55° C. Im zweiten Fall liegt der Peak bei 65° C, der typischen Schmelztemperatur für *P. damnosus*. Die Proben konnten sowohl von den Filtern direkt als auch nach Rückspülen mit dem foodproof® Beer Screening detektiert und identifiziert werden.

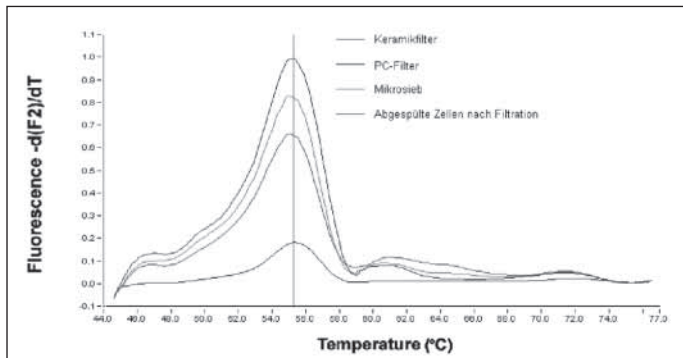


Abb. 4c Schmelzkurven bierschädigender Kontaminanten (*L. brevis*) auf verschiedenen Filterträgerschichten (siehe Mikrosiebe)

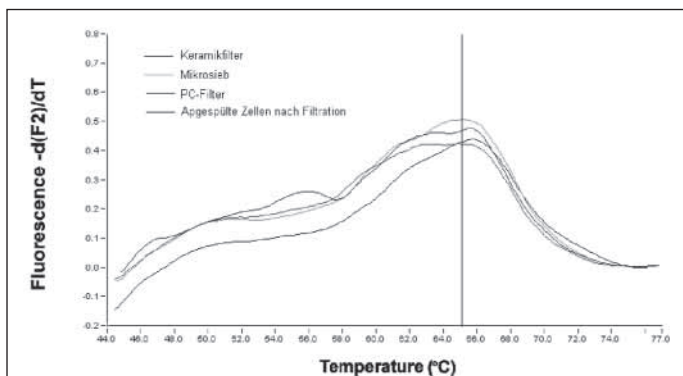


Abb. 4d Schmelzkurven bierschädigender Kontaminanten (*P. damnosus*) auf verschiedenen Filterträgerschichten (siehe Mikrosiebe)

4 Diskussion

Die wirtschaftliche Bedeutung einer neuen Methode zum direkten Nachweis von Bierkontaminanten ohne Voranreicherung sollte unter folgenden Gesichtspunkten betrachtet werden:

1. Der Probenumfang nimmt ständig zu.
2. Engpässe treten auf, da zunehmend Personal in der Produktion und in der Qualitätskontrolle abgebaut werden, so dass keine effiziente Qualitätssicherung durchgeführt werden kann, bzw. dieser eminent wichtige Bereich hoffnungslos überlastet ist.
3. Der Druck der Produktion auf eine schnelle Freigabe des Bieres bzw. auf eine spontane Kontrolle mit direkter Entscheidungshilfe über eine Sekundärinfektion nimmt zu.

Direkte und schnelle Verfahren zum Kontaminationsnachweis ohne Voranreicherung würde die deutsche Brauwirtschaft international in die Lage versetzen, dass neben hochtechnisierten Produktionsanlagen eine adäquate semiautomatisierte Kontaminationskontrolle zur Verfügung stünde, die mit den Anforderungen einer schnellen Produktion und Distribution des Bieres Schritt halten könnte. Das Verfahren der kombinierten Filtersieb-, Fluoreszenz- und PCR-Methode entspricht diesen Anforderungen. Diese Methode hat den Vorteil, dass Entscheidungen direkt getroffen werden können und nicht erst Tage später. Das Verfahren ist für folgende Problemkreise nutzbar:

1. Drucktankfreigabe
2. Endproduktkontrolle, Stichprobenüberprüfung, spontane

Überprüfung von sekundären Infektionen

3. Überprüfung von Rückbierproben und Reklamationen
4. Entscheidung über den wiederholten Einsatz der CIP-Lösung in der Routine
5. Überprüfung des Reinigungswassers

Mit der Mikrosiebtechnologie ist ein Verfahren entwickelt worden, um Mikrosiebe mit genau definierten und regelmäßig geformten Porengrößen zur Verfügung zu stellen (van Rijn, 2001). Das Mikrosieb ist optisch flach (1µm) und chemisch inert, so dass lästiges Hintergrundrauschen und eine Wechselwirkung der Filtersiebmatrix mit den Farbstoffen bei der Anwendung von Fluorochromen keine Probleme darstellt. Die Anwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe erzeugte in der Tat kein störendes Hintergrundrauschen, so dass die auf dem Sieb isolierten Keime gut identifizierbar waren (Abb. 2a – b).

Durch die kleine Fläche des Mikrosiebes hat man die Möglichkeit zunächst manuell einzelne Zellen zählen zu können. Darüber hinaus kann die Filteroberfläche des Mikrosiebes mit den Abmessungen von 4,5 mm x 4,5 mm abgescannt werden so dass eine nachgeschaltete automatisierte Image Analyse durchgeführt werden kann, die in vertretbarer Zeit (ca. 45 Minuten) ein Ergebnis bringt.

Vergleicht man die Mikrosiebtechnik mit der herkömmlichen CFU-Technik, stellt man fest, dass mit der Mikrosiebmethode eine höhere Zahl an Zellen ausgezählt wird als mit der herkömmlichen CFU. Der Grund dafür liegt darin, dass auf der Oberfläche der Mikrosiebe einzelne Zellen ausgezählt werden. Beim CFU-Verfahren werden nur vermehrungsfähige Zellen, die Kolonien gebildet haben makroskopisch erfasst. Mit der Mikrosiebtechnik werden sowohl vermehrungsfähige als auch vitale und tote Keime mit Hilfe von Viability-Farbstoffen detektiert.

Ein weiterer Vorteil gegenüber herkömmlichen Methoden, bei denen die Filtermittel nur einmalig verwendet werden, ist die Option, dass Mikrosiebe mehrfach verwendet werden können. Die Reinigung gebrauchter Siebe ist einfach durchzuführen und erfordert nicht den Einsatz gefährlicher oder stark toxischer Substanzen.

Als weitere Applikation können die auf Mikrosieben isolierten Kontaminanten durch Aufnahme in einem kleinen Volumen H₂O+CO₂ oder PBS rückgespült werden und nachgeschaltet mit Hilfe von PCR-Techniken und flusszytometrischen Untersuchungen analysiert werden. Dies hat den Vorteil, noch präzisere physiologische Aussagen über die jeweilige Keimart zu machen. Des Weiteren kann die PCR mit ihrer hohen Sensitivität die geringen Keimmengen gut und sicher detektieren (Homann et al., 2002). Im Prinzip bietet die Mikrosiebtechnologie nur Vorteile.

Der einzige Nachteil, der den Einsatz in die Brauereiroutine versperrte, ist das geringe Volumen, das durchgezogen werden kann. Die im Bier enthaltenen Proteine setzen die Filteroberfläche schnell zu. Das bedeutet, dass die Filtration relativ langsam verläuft (5 bis 10 Minuten) und das Filtrationsvolumen mit ca. 20 bis 30 ml gering ausfällt.

Ein Schnelldetektionsverfahren von Bierkontaminanten – so die Forderung einiger konservativer Qualitätssicherer in den Brauereien – muss einen Keim in 1.000 ml Bier nachweisen. Mit der Mikrosiebtechnik ist das Volumen auf 20 bis 30 ml pro Probe limitiert. Dies führte bisher zur Ablehnung des Verfahrens. Da bei dieser Problematik fälschlicherweise die Statistik bemüht wird, muss generell festgestellt werden, dass sowohl mit einem Volumen von einem Liter – auch wenn getaktet beprobt wird – als

auch von 20 bis 30 ml keine statistische Aussage über einen Tank von 1000 hl und mehr gemacht werden kann! Es ist nicht einzu-sehen, warum eine 1 Liter-Beprobung, die erst nach 3 Tagen ein Ergebnis bringt, aussagekräftiger sein soll als eine Schnellmethode, die nach 20 Minuten (Filtration einschließlich Färbung) ein Ergebnis vorweist. Daher ist nicht das größere Volumen entscheidend, sondern die Zeit, in der der Produktionsleiter ein Ergebnis über die Funktionalität und Identifikation gefundener Keime in der Probe in Händen hält.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Kontaminanten im Bier ohne Voranreicherung direkt nachzuweisen. Es ist bei den beschriebenen Verfahren (PC-Filtration, Mikrosiebfiltration und Keramikfiltration) im Gegensatz zu der herkömmlichen Membranfiltrationstechnik möglich geworden, Keime auf verschiedenen Filterträgerschichten anzufärben, diese mikroskopisch zu analysieren oder molekularbiologisch zu detektieren und zu identifizieren. Die Mikrosiebertechnologie, die in diesem Beitrag vorgestellt wird, ist von allen Verfahren die zukunftsträchtigste Variante, weil der wichtigste Punkt, die Nachweissicherheit, für dieses Verfahren bewiesen werden konnte. In der nahen Zukunft muss dieses neue, kombinierte Schnellverfahren weiter optimiert werden.

Danksagung

Der WifÖ des Deutschen Brauerbundes sei herzlich für die finanzielle Unterstützung der Forschungsvorhaben R 382 und B22b gedankt.

5 Summary / Résumé

Hutter, K.-J., Lappas, S., Otto, W., Kiehne, M., Kemenji, D., Nitzsche, F.: Combined rapid detection method using micro-sieve filtration and PCR-analysis for direct determination of contaminant micro-organisms in beer — Brauwissenschaft 56, No. 11/12, 198–205, 2003.

BC 02 Microbiology / 40 Brewery biology (General) / 42 Foreign organisms

There are many different possibilities to detect contaminants in beer. They are all based on a pre-accumulation of germs in/on selection media. Via micro-sieve technology a technique is presented where contaminants can be determined without pre-accumulation directly on a silicone sieve. Contaminants filtrated onto the micro sieve can be detected by both fluorescence optic and molecular biology (PCR-analysis). Thus, statements regarding functionality (viability) and identity are feasible.

Hutter, K.-J., Lappas, S., Otto, W., Kiehne, M., Kemenji, D., et Nitzsche, F.: Procédé rapide combiné avec la filtration sur micro-tamis et analyse PCR pour la détection des micro-organismes nuisibles en brasserie — Brauwissenschaft 56, No. 11/12, 198–205, 2003.

BC 02 Microbiology / 40 Technologie brassicole (Généralités) / 42 Organismes étrangers

Il y a de multiples possibilités de mettre en évidence les contaminants dans la bière. Celles-ci sont basées sur un pré-enrichissement des germes dans/ sur des milieux sélectifs. A l'aide de la technologie du micro-tamis, on présente une méthode qui permet de mettre en évidence des contaminants sans pré-enrichissement directement sur un tamis de silicone. Les contaminants qui sont directement filtrés sur le micro-tamis peuvent être décelés, soit par optique de fluorescence soit par biologie moléculaire (analyse PCR). On obtient ainsi un résultat sur la fonctionnalité (état mort/vivant) des contaminants ainsi que sur leur identité.

6 Literatur

- Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K. H.: Phylogenetic identification and in situ detection of individual cells. *Microbiol. Reviews* 18, 147-153 (1995).
- Back, W.: Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, Verlag Hans Carl, Nürnberg (1994).
- Berghof, K., Fandke, M., Pardigol, A., Tauschmann, A., Kiehne, M.: Fast Detection of Beer Spoilage Microorganisms by Consensus Polymerase Chain Reaction with foodproof Beer Screening, *Brewing Yeast Fermentation Performance*, K. Smart, ed. (2003).
- Bischoff, E., Bohak, I., Back, W., Leibhard, S.: Brauwiss. 54, 1-2, 4-8; Einsatz der PCR-Technik zur Identifizierung bierschädigender Keime (2001).
- Einte Karst Dijk: Direct detection of micro-organisms with use of micro-sieves and microscopy, *Research report 2*, (1998).
- Homann, F., Bremer, Z., Müller-Hergt, G.: Etablierung der Light Cycler™-PCR als Schnellnachweismethode, *Brauwelt* Nr. 23/24 (2002).
- Hutter, K.-J., Eipel, H., E.: DNA determination of yeast by flow cytometry, *FEMS Microbiology Lett.* 3, 35-38 (1978).
- Hutter, K., J.: Anwendungsmöglichkeiten der Durchflußzytometrie für brauereibiologische Fragestellungen III: Vitalitätstest, *Brauwiss.* 32, 13-16 (1979).
- Hutter, K., J.: Einsatz der Fluoreszenzserologie und der Durchflußzytometrie zum Nachweis von Infektionskeimen bei biotechnologischen Prozessen, *Brauwiss.*: 44, 216-220 (1991).
- Hutter, K., J.: Fluoreszenzserologischer Schnelltest zur Identifizierung von Mikroorganismen auf Membranfiltern. *Brauwelt* 131, 726-730 (1991).
- Hutter, K., J.: Simultane Identifizierung von *L.brevis* und *P.damosus* im filtrierten Bier, *Brauwelt* 131, 1797-1802 (1991).
- Hutter, K., J.: Schnellbestimmungen zur tot-lebend Analyse von Hefezellen, *Brauwelt* 132, 7/8, 252-259 (1992).
- Hutter, K., J.: Flußzytometrische Mehrfarbenanalyse. Schnelle Erkennung verschiedenster Kontaminanten im Bier, *Brauwelt* 133, No. 10, 425-431 (1993).
- Hutter, K., J., Bissinger, C., Neidlinger, S., Lindemann, B., Klinkler, H.: Biomonitoring der Betriebshefen in praxi mit fluoreszenzoptischen Verfahren. V.Mitt.: Nachweis von Kontaminationen, *Brauwiss.* 49, 11/12, 320-324 (1996).
- Kiehne, M.: VLB-Frühjahrstagung, Nachweis einiger bierschädigender Keime mit der PCR-Technik, Leipzig (2000)
- Kiehne, M., Fandke, M., Berghof, K.: Foodproof Beer Screening – Real Time PCR im Routinelabor einer Brauerei, *Getränke Technologie & Marketing* 4, (2002).
- Nuding, S.: Über die Bestimmung der Antibiotikaresistenz bei Bakterien mit Hilfe der Durchflußzytometrie, Diplomarbeit Universität Hohenheim (1998).
- Pettipher, G. L., Rodrigues, U. M.: Rapid enumeration of bacteria in heat-treated milk and milk-products using a membrane filtration-epifluorescence microscopy technique, *J. Appl. Bacteriol.* 50, 157-166 (1981).
- Pettipher, G. L., Rodrigues, U. M.: Semi-automated counting of bacteria and somatic cells in milk using epifluorescence microscopy and television image analysis, *J. Appl. Bacteriol.* 53, 323-329 (1982).
- Pettipher, G. L., Kroll, R. G., Farr, L. J., Betts, R. P.: DEFT. Recent developments for foods and beverages, In: *Rapid microbiological methods for foods, beverages and pharmaceuticals* (eds: Stannard, C. J., Pettitt, S. B., Skinner, F. A.), Blackwell Scientific Publications Ltd, Oxford (1991).
- Raspe, O.: Vortrag über Mikrosiebe beim Schleicher&Schuell Seminar, Analytica, München. (2002).
- Remor, M.: Hefemangement- Zellphysiologische Kontrolle der Betriebshefe mit flußzytometrischen Analysen, Diplomarbeit FH-Mannheim, Hochschule für Technik und Gestaltung (1999).
- Remor, Th.: Nachweis von Kontaminanten im Bier mit Hilfe der automatisierten Bildanalyse. Entwicklung einer Software zur Erkennung von Fremdkeimen anhand morphologischer und spektraler Kriterien und der automatisierten Steuerung der Probenanalyse. Diplomarbeit Fachhochschule Darmstadt (2000).
- Rusch, A., Back, W., Krämer, J.: Anfärbung bierschädlicher Mikroorganismen mit Fluoreszenzfarbstoffen, *Brauwiss.* 43, 192-197 (1989).
- Scherer, S., Kosse, D.: Identifizierung von lebensmittelrelevanten Hefen durch Gensonden. In: *Schnellmethoden und Automatisierung in der Lebensmittel-Mikrobiologie*, Symposium FH-Lippe, Lemgo 2.7.-4.7. (1997).
- Storgard, E., Sweins, H., Närli, M., Wirtanen, G.: Desinfectant testing against brewery-related biofilm, third Technical Meeting, Pilsen, CZ, EBC, Brewing Group, Bulletin, 8-16 (2000).
- Thelen, K., Beimfohr, C. et al.: Spezifischer Schnellnachweis von bierschädlichen Bakterien mittels fluoreszenzmarkierter Gensonden, *Brauwelt* Nr.38 (2001).
- Van Rijn, C.: Microsieves, a new tool for rapid microbiological detection, *Holland Aquamarijn* (2001). *Manuskripteingang 08.08.2003*