

E. Bischoff, I. Bohak, W. Back und S. Leibhard

Schnellnachweis von bierschädlichen Bakterien mit PCR und universellen Primern

Eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) Methode für den Nachweis von bierschädlichen Bakterien wurde entwickelt. Die Voranreicherung geschah mit NBB-C. Für die PCR wurden universelle Primer benutzt, die die „Internal transcribed spacer region“ (ITS) amplifizieren, die die 16S rDNA und die 23S rDNA trennt. Für eine weitere Identifizierung wurde das PCR-Produkt mit Restriktionsenzymen verdaut. Diese Methode stellt einen Nachweis von bierschädlichen Bakterien im filtrierten Bier innerhalb von 48 Stunden sicher.

BC 02 Mikrobiologie

(Deskriptoren: Polymerase-Ketten-Reaktion, Universelle Primer, Internal Transcribed Spacer Region, Bierschädliche Bakterien, NBB-C).

Descriptors: Polymerase chain reaction (PCR), universal primers, internal transcribed spacer region (ITS), beer spoilage bacteria, NBB-C).

1 Einleitung

Mikrobiologische Kontaminationen sind nach wie vor ein häufiger Grund für Reklamationen der Kundschaft. Bei den üblichen konventionellen Nachweisverfahren werden die Proben auf Kolonienbildung bzw. auf Wachstum hin überprüft. Erfahrungsgemäß wird eine hohe Nachweissicherheit erzielt, wenn NBB-A und NBB-B nach 5 Tagen und NBB-C nach 7–10 Tagen endgültig ausgewertet wird.

Dies ist besonders für Proben aus dem Filtratbereich häufig zu lang, um bei Befunden noch Gegenmaßnahmen ergreifen zu können, da das abgefüllte Bier normalerweise nicht sehr lange in der Brauerei zurückgehalten wird. Hier verlässt man sich deshalb auf die Befunde im Unfiltrat und in der Hefe. Um bei mikrobiologischen Befunden nach dem Filter, speziell bei Spurenkontaminationen, noch geeignete Schritte einleiten zu können, wären schnelle Ergebnisse wünschenswert.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein Verfahren, mit dem in sehr kurzer Zeit Mikroorganismen nachgewiesen werden können (10). Bei der PCR werden bestimmte Abschnitte der DNA in einem zyklischen Verfahren vervielfältigt. Diese DNA kann dann elektrophoretisch aufgetrennt und dargestellt werden.

Im Brauereibereich spielt die PCR vor allem eine Rolle bei der Identifizierung von Kultur- und Fremdhefen (12). Hier liegt jedoch eine große Menge an amplifizierbarer DNA vor, so dass sich in diesem Fall eine andere Fragestellung ergibt. Für den

Spurennachweis mittels PCR ist eine Mindestkeimzahl von ca. 1000 Keimen pro Probe notwendig. Da bereits ein lebensfähiger bierschädlicher Keim genügt, um unter ungünstigen Voraussetzungen ein Bier zu verderben, ist eine Voranreicherung notwendig. Diese Voranreicherung muß so beschaffen sein, daß sich alle bierschädlichen Bakterien gut vermehren können und gleichzeitig harmlose Begleitorganismen gehemmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Keime und Kultivierungsmethoden

Bei den Untersuchungen wurden als Testkeime *Lactobacillus brevis*, *L. lindneri* und *Pediococcus damnosus* benutzt. Diese Keime stammen aus der lehrstuhleigenen Kulturensammlung. Die drei Arten verursachen über 85% der mikrobiologischen Probleme in Brauereien (1). Alle Keime wurden mit NBB-C aus kontaminiertem Bier gewonnen und bei -20 °C in Glycerin aufbewahrt.

2.2 Voranreicherungsmedium

Die Voranreicherung wurde mit NBB-C durchgeführt. 150 ml Bier und 9 ml NBB-C (5%) wurden in einer 180 ml Bügelverschlussflasche mit H₂O randvoll aufgefüllt. Diese Methode garantiert, dass nur obligate und potentielle Bierschädlinge wachsen können, während harmlose Begleitorganismen das Ergebnis nicht beeinträchtigen (1).

2.3 Bestimmung der Voranreicherungszeit

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

2.4 Zellaufschluss

50 ml der vorangereicherten Probe wurden mit 3300 g 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in der anhaftenden Flüssigkeit des

Autoren: Dipl.-Ing. Erik Bischoff, Dipl.-Ing. Ingrid Bohak, Univ.-Prof. Dr.-Ing. Werner Back, Technische Universität München – Weihenstephan, Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Weihenstephaner Steig 20, 85350 Freising und Dr. rer. nat. Stefan Leibhard, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Ingolstädter Landstraße 1, 85746 Neuherberg

Tabelle 1 Sequenzen der benutzten Primer

Primer	Sequenz (5'→3')	Position	Orientierung	Reference
16SL	TGYAGGCTGCAACTCGCCT	16S	vorwärts	self constructed
16-1A(T)	GTCGGAATCGCTAGTAATCG	16S	vorwärts	(13)
R16-1(N)	CTTGACACACCGCCCGTCA	16S	vorwärts	(11)
23-1B(T)	GGGTTCCCCATTCGGA	23S	rückwärts	(13)
R23-2R(N)	TCCGGGTACTIONTAGA TGTTTC	23S	rückwärts	(11)

Zentrifugenglases resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 23 000 g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl Chelex-100 (Bio-Rad) (6% w/v) und 1 µl Proteinase K (10 mg/ml) (Boehringer Mannheim) resuspendiert und 10 min bei 56 °C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl 1% (w/v) Triton-X-100 (Merck) wurde der Ansatz 10 min gekocht. Nachdem der Ansatz 10 min in Eis gekühlt wurde, wurden die Reaktionsgefäße 4 min mit 23 000 g zentrifugiert. 2,5 µl des Überstandes wurden in die PCR eingesetzt.

2.5 PCR-Amplifikation und DNA-Produkt

2.5.1 Primer

Verschiedene universelle Primer, die an der 16S rDNA und der 23S rDNA binden, wurden eingesetzt (Tab. 1). Primer 16SL ist ein selbst konstruierter Primer, der an einem konservierten Teil der 16S rDNA bindet. Die amplifizierte DNA zwischen der 16S rDNA und der 23S rDNA ist hochvariabel, aufgrund der „Internal transcribed spacer region“ (ITS), die die 16S rDNA und die 23S rDNA trennt (3, 6, 13).

2.5.2 PCR-Bedingungen und DNA-Analyse

Die PCR wurden mit dem GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer) durchgeführt. Die optimierte PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt. Der Ansatz enthielt 1x Puffer (10x Puffer enthält 200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl) (Life Technologies), 1,5 mM MgCl₂ (Gibco BRL), 0,2 mM NTP (Peqlab), 0,1 µmol jeden Primers, 1,5 units Taq Polymerase. Die Ansätze wurden bei 94 °C 7 min denaturiert, dann folgten 30 Amplifikationszyklen, die 1 min bei 94 °C, 1 min bei 52 °C und 1 min bei 72 °C durchliefen. Die Reaktion wurde vervollständigt mit einer 10 min Extension bei 72 °C (Abb. 1).

2.5.3 Detektion der amplifizierten DNA

Die PCR-Produkte wurden mit Gelelektrophorese detektiert. Die DNA wurde in einem 2%igen Agarose Gel getrennt. Das Gel wurde dann mit Ethidium Bromid gefärbt und die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Für die Dokumentation wurde ein Foto gemacht.

2.5.4 Identifikation der amplifizierten DNA

20 µl des PCR-Produktes wurden mit 1 µl (10³ Units / ml) Restriktionsendonuclease (Boehringer Mannheim) *Dde I* bei 37 °C 90 min verdaut.

2.6 Messung der Sensitivität der PCR

Für die Messung der Sensitivität des Zellaufschlusses und der PCR wurden die Zellen in einer Thoma-Zählkammer (Assistent, Tiefe 0,02 mm) gezählt. Diese Methode stellt sicher, dass sowohl lebende als auch tote Zellen gezählt werden. Die Zellen wurden mit dem Voranreicherungsmedium auf die gewünschte Zellzahl verdünnt. Der Zellaufschluss und die PCR wurden mit 50 ml durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Voranreicherung

Das Voranreicherungsmedium NBB-C bietet gute Wachstumsbedingungen für alle bierschädlichen Bakterien und ist auch für die PCR-Anreicherung geeignet. Inzwischen wurde aber noch ein spezielles Anreicherungsmedium (NBB-Am) entwickelt (Back, Manuskript in Vorbereitung). *Lactobacillus brevis* ist ein sehr schnell wachsendes Bakterium. Die lag-Phase beträgt nur 4 Stunden und die Generationszeit ist sehr kurz (Abb. 2). Aus einer Zelle entstehen innerhalb von 30 Stunden 1000 Zellen, die für eine Detektion mit der PCR notwendig sind. Sowohl *L. lindneri* als auch *Pediococcus damnosus* benötigen zwischen 18 und 22 Stunden, um die lag-Phase zu überwinden. Danach ist die Generationszeit so gering, dass für eine 1000fache Vermehrung mindestens 40 Stunden benötigt werden (Abb. 3, 4).

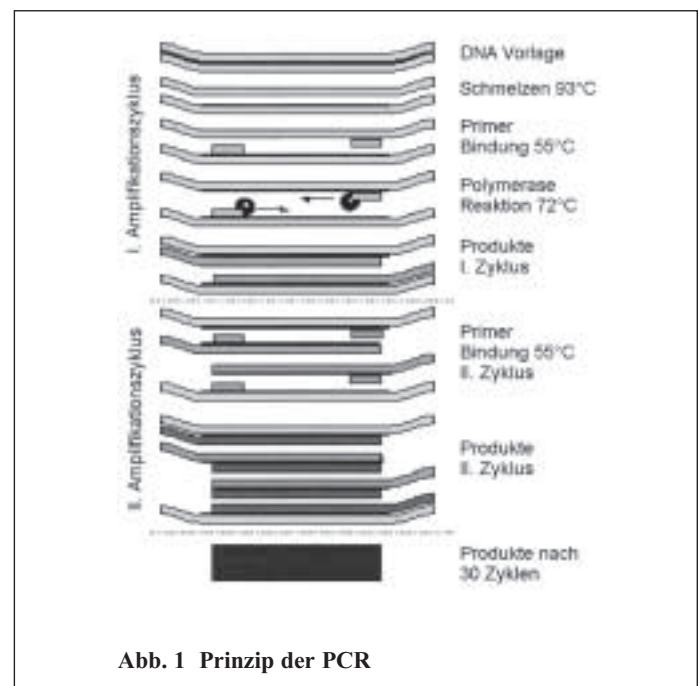
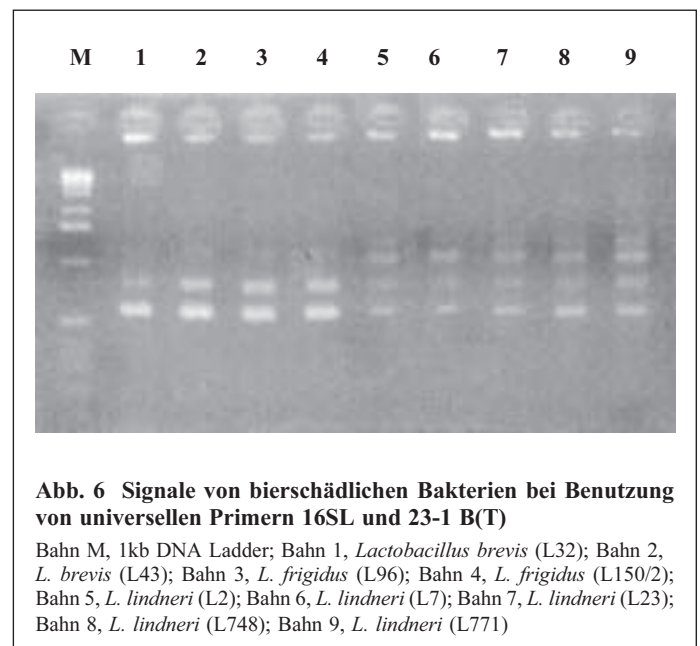
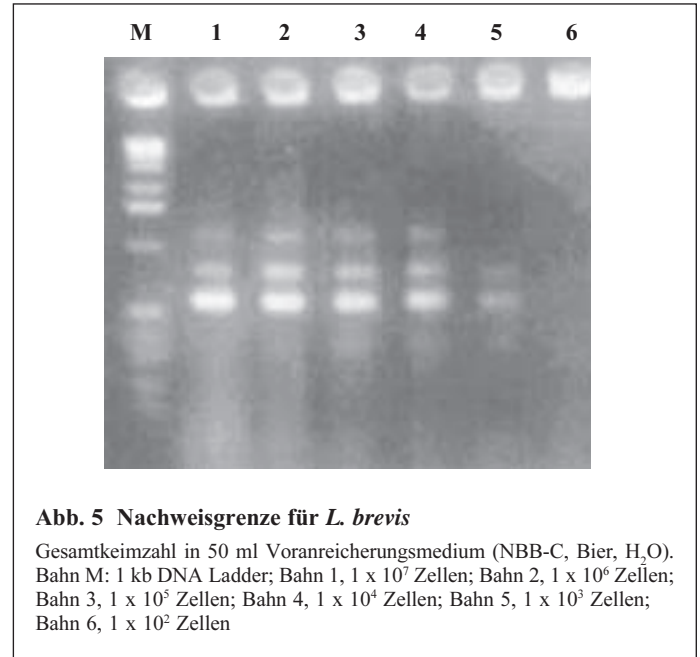
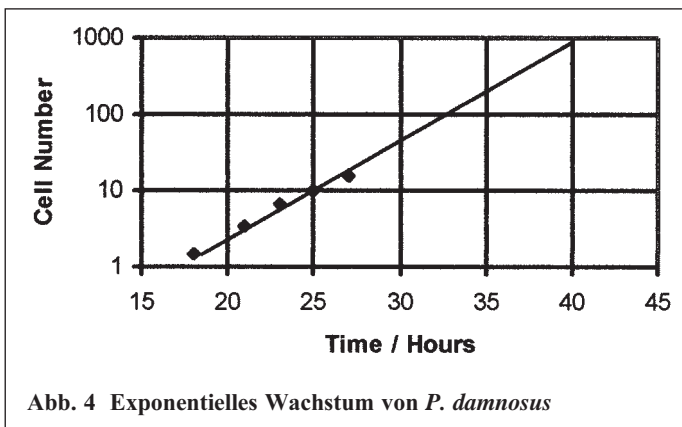
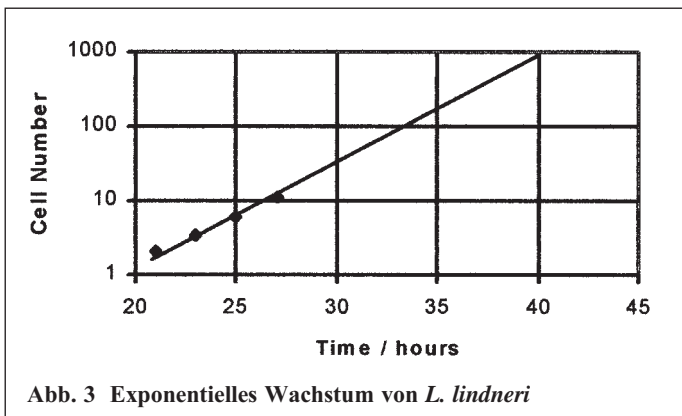
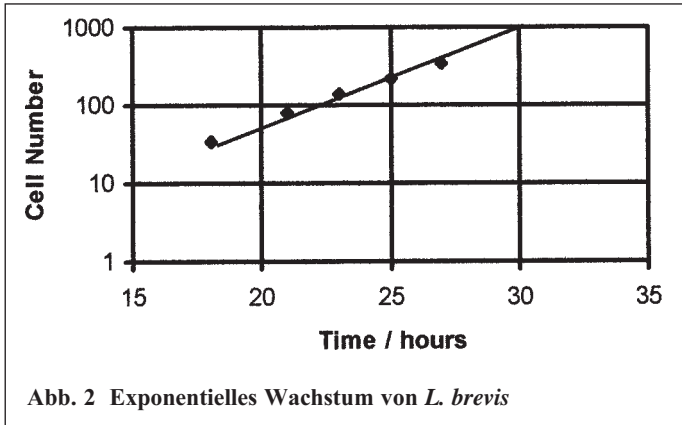


Abb. 1 Prinzip der PCR



3.2 Zellaufschluss

Der Zellaufschluss ist sehr einfach, sensitiv, sicher und kostengünstig. Die ganze Prozedur dauert 3 Stunden, um 24 Proben aufzubereiten. Dies erlaubt einen Zellaufschluss, die PCR und den DNA-Nachweis innerhalb eines Arbeitstages. Der Zellaufschluss benötigt lediglich zwei verschiedene Reaktionsgefäße und zwei Inkubationsschritte. Es werden keine giftigen Chemikalien verwendet. Daher ist es möglich, diese Methode ohne irgendwelche Sicherheitsvorkehrungen in Brauereien einzuführen.

3.3 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze beträgt für *Lactobacillus brevis*, *L. lindneri* und *Pediococcus damnosus* 1000 Keime pro 50 ml eingesetzter Voranreicherung (Abb. 5).

3.4 Primer und amplifizierte DNA

Es wurden die universellen Primer 16 SL und 23 1-B(T) verwendet. Diese Primer binden an alle getesteten bierschädlichen Bakterien (Abb. 6). Die Zellen der biologischen Säuerung, Hefen und andere latent vorliegende Begleitorganismen lieferten keine falsch-negativen Befunde. Zusätzlich ist es möglich, die DNA von verschiedenen bierschädlichen Keimen durch einen Restriktionsenzymverdau zu unterscheiden (Abb. 7).

4 Diskussion

4.1 PCR

Universelle Primer wurden deshalb eingesetzt, da es zum Zeitpunkt der Probenahme unbekannt ist, welcher Keim eventuell in

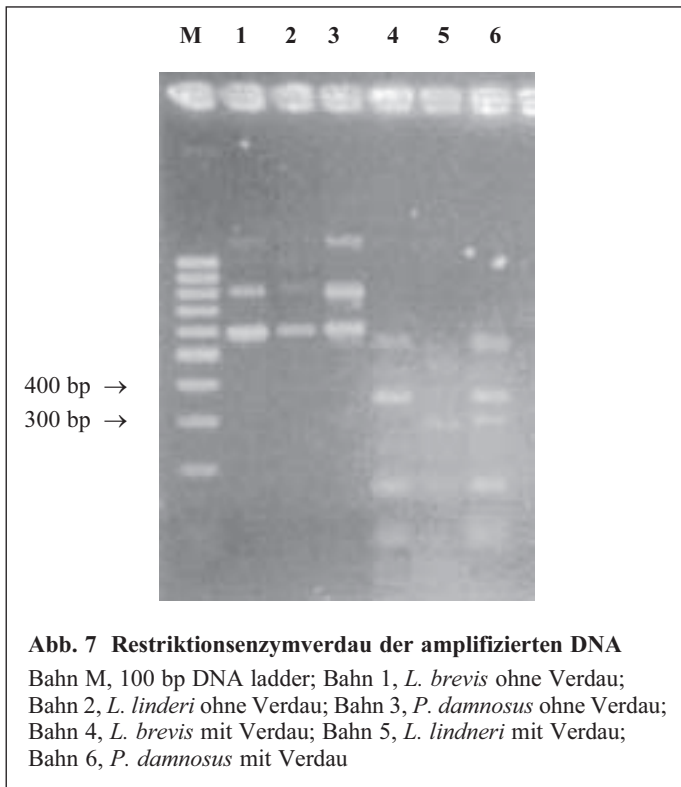


Abb. 7 Restriktionsenzymverdau der amplifizierten DNA

Bahn M, 100 bp DNA ladder; Bahn 1, *L. brevis* ohne Verdau; Bahn 2, *L. lindneri* ohne Verdau; Bahn 3, *P. damnosus* ohne Verdau; Bahn 4, *L. brevis* mit Verdau; Bahn 5, *L. lindneri* mit Verdau; Bahn 6, *P. damnosus* mit Verdau

der Probe vorliegt. Außerdem gibt es ca. 20 verschiedene Mikroorganismen-Arten, die das Bier schädigen können (1). Bei einer Multiplex-PCR sinkt die Sensitivität, womit eine längere Voranreicherungszeit notwendig wird. Wenn für jeden spezifischen Primer ein Reaktionsgefäß benutzt werden muß, so ist dies für den meist hohen Probenanfall in einer Brauerei sehr aufwendig und teuer. Aus diesen Gründen ist ein Nachweis von bierschädlichen Bakterien mit spezifischen Primern nicht praktikabel. Weiterhin besteht bei spezifischen Primern aufgrund von genetisch falschen Klassifizierungen die Gefahr von falsch-negativen Ergebnissen.

Mit universellen Primern können die Proben innerhalb von 48 Stunden auf Keimfreiheit überprüft werden. Aufgrund der bierselektiven Voranreicherung bedeutet jedes Signal eine Kontamination durch ein bierrelevantes Bakterium. Die amplifizierte DNA ist hochvariabel, so dass eine weitere Identifizierung möglich ist, sofern dies gewünscht wird (3). Eine biologische Säuerung führt zu keinen falsch-positiven Ergebnissen, obwohl in der Würze hohe Zellzahlen (tote) an Milchsäurebakterien vorliegen. Durch die Würzekochung im sauren pH-Bereich und die Filtrationsschritte bei der Bierbereitung liegt jedoch im fertigen Bier keine DNA dieser Milchsäurebakterien mehr vor.

4.2 Zellaufschluss

Mehrere Zellaufschlussverfahren wurden getestet (4, 5, 7, 9). Um die Methoden zu vergleichen, wurde besonderer Wert auf Sensitivität, Zeit, Kosten und Bedienung gelegt. Die Sensitivität des Verfahrens muss so hoch wie möglich sein, da sie entscheidend für die Dauer der Voranreicherung ist. Der Zellaufschluss selbst sollte für einen Schnellaufweis möglichst rasch erfolgen. Es wird angestrebt, den Zellaufschluß, die PCR und den Nachweis der DNA innerhalb eines Arbeitstages durchzuführen. Wenn die Methode in Brauereien eingeführt werden soll, so sollten die Kosten gering und die Handhabung einfach sein. Es sollten möglichst auch keine toxischen Materialien verwendet werden.

4.3 Voranreicherung

Bereits ein lebender bierschädlicher Keim kann unter ungünstigen Bedingungen zu einer Schädigung des Bieres führen. Die Aufgabe eines Nachweisverfahrens in der Brauerei ist somit die Detektion von 1 Keim / Probe. Mit einem Keim ist es allerdings nicht möglich, einen Nachweis mit PCR zu führen, da es beim Zellaufschluss immer zu einem Verlust an DNA kommt und auch für die PCR eine Mindestmenge an DNA vorhanden sein muss. Daher muss die Probe einer selektiven Voranreicherung unterzogen werden.

Als Voranreicherungsmedium hat sich NBB-C aus verschiedenen Gründen als geeignet herausgestellt. Dieses Medium fördert das Wachstum von bierschädlichen Bakterien und inhibiert harmlose Begleitorganismen, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen würden, wenn universelle Primer benutzt werden. Da unter anaeroben Bedingungen inkubiert wird, besteht eine zusätzliche Selektivität bei der Voranreicherung. Hierzu ist es notwendig, die richtigen Konzentrationen an NBB-C und Bier einzuhalten. Um eine gute statistische Aussage zu erlangen, ist es auch wichtig, ein möglichst großes Probevolumen zu untersuchen. Dies ist z.B. mittels des BM-Systems möglich (2).

Wichtig ist auch, daß NBB-C keine Substanzen enthält, die den Zellaufschluss oder die PCR stören.

4.4 Probenvorbereitung

Die untersuchten Keime in diesem Projekt waren *Lactobacillus brevis*, *L. lindneri* und *Pediococcus damnosus*. *L. brevis* ist der häufigste bierschädliche Keim. *L. lindneri* und *P. damnosus* sind ihres teilweise langsamen Wachstums wegen schwierig nachzuweisen. Das Ziel eines Nachweises in der Brauerei ist es, einen beliebigen lebenden bierschädlichen Keim zu entdecken. Somit ist bei der Voranreicherung der Stamm mit dem schlechtesten Wachstumspotential zugrunde zu legen. Die Keime liegen im abgefüllten Bier und in den Proben meist in der lag-Phase vor. Um diesen Zustand zu simulieren, wurden die Proben mit den Teststämmen mehrere Tage bei kühlen Temperaturen gehalten. Sowohl die Zeit, die zur Überwindung der lag-Phase benötigt wird, als auch die Generationszeit bestimmen die Wachstumszeit und damit die Zeit der Vorinkubation bis zum Erreichen von ca. 1000 Zellen in der Probe.

Obwohl 2 Tage zum Nachweis benötigt werden, ist dieses Verfahren unter der Voraussetzung des notwendigen Spurennachweises die schnellste bisher bekannte Methode. Bei der kürzlich beschriebenen PCR-Technik von *Juvonen* et al. (8) dauerte die Voranreicherung deutlich länger, da eine Nachweisgrenze bis zu 20 000 Keimen erforderlich war. In dieser Arbeit wurde u.a. auch mit NBB-C gearbeitet, dieses jedoch mehrfach überkonzentriert und damit falsch angewendet. Eine schnelle Voranreicherung war somit nicht möglich.

4.5 Nachweisgrenze

Um die Sensitivität des Zellaufschlusses und der PCR zu bestimmen, wurden die Zellzahlen in einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Die PCR unterscheidet nicht zwischen lebenden und toten Zellen. Daher muss die Gesamtkeimzahl bestimmt werden. Je nach Lagerbedingungen bestehen hier deutliche Unterschiede.

5 Zusammenfassung

Das beschriebene Verfahren erlaubt den bislang schnellsten umfassendsten Test auf bierschädliche Bakterien im Spurenbereich.

Mit der hier vorgestellten Methode ist es möglich, innerhalb von 48 Stunden einen Spurennachweis von bierschädlichen Bakterien zu führen. Um von einem Keim / Probe auf eine Mindestkeimzahl von 1000 Keimen / Probe zu kommen, ist ein Voranreicherungsschritt notwendig. Für diese Voranreicherung eignet sich NBB-C in einer Konzentration von 5 bis 7% (bezogen auf das Proben-Endvolumen) sehr gut. NBB-C enthält keine Substanzen, die den Zellaufschluß oder die PCR stören. Für den Nachweis der Keime wurden universelle Primer benutzt, die in einem ersten Schritt alle vorkommenden Bakterien nachweisen. Durch die selektive Voranreicherung ist bei einem vorliegenden Signal davon auszugehen, dass mindestens ein bierschädlicher Keim in der Probe vorhanden war. Durch einen Restriktionsenzymverdau ist eine weitere Identifizierung möglich.

6 Summary

Bischoff, E., Bohak, I., Back, W., and Leibhard, S.: Rapid detection method of beer spoilage bacteria by PCR and universal primers — Monatsschrift für Brauwissenschaft 54, No. 1/2, 4 – 8, 2001

BC 02 Microbiology

A polymerase chain reaction (PCR) for the detection of beer spoilage bacteria was developed. A pre-enrichment step was done with NBB-C. The PCR was performed with universal primers which amplified the internal transcribed spacer region between the 16S rDNA and the 23S rDNA. For further identification the PCR-product was digested with restriction endonuclease. This method assures a detection of beer spoilage bacteria in the filtrated beer within 48 hours.

Bischoff, E., Bohak, I., Back, W., et Leibhard, S.: Détection rapide de bactéries nuisibles en brasserie par PCR et de milieux universels — Monatsschrift für Brauwissenschaft 54, No. 1/2, 4 – 8, 2001

BC 02 Microbiologie

La méthode PCR (réaction en chaîne de polymérase) a été développée pour la recherche de bactéries nuisibles en brasserie. Le pré-enrichissement était obtenu avec le NBB-C. Pour le PCR on a utilisé des milieux universels qui amplifiaient la «internal transcribed spacer region» (ITS) qui sépare le 16S rADN et le 23S rADN. Pour une identification supplémentaire le produit-PCR a été digéré par des enzymes de restriction. Cette méthode permet d'identifier en 48 heures dans la bière filtrée les bactéries nuisibles en brasserie.

7 Literatur

1. Back, W.: Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie, Band I, Verlag Hans Carl, Nürnberg, 1994.
2. Back, W., und Pöschl, P.: Bypass-Membranfiltration (BM-System) – Verbesserung des Spurennachweises nach der Filtration, Brauwelt **138**, 2312 – 2315, 1998.
3. Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., L.K., und Gannon, F.: The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria, PCR Methods Appl. **1**, 51-56, 1991.
4. Bej, A.K., Steffan, R.J., DiCesare, J., Haff, L., und Atlas, R.: Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. Appl. Environ. Microbiol. **56**, 307 – 314, 1990.
5. Gouws, P.A., Visser, M., und Brözel, V.S.: A polymerase chain reaction procedure for the detection of Salmonella spp. within 24 hours. J. Food Prot. **61**, 1039 – 1042, 1998.
6. Graham, T., Golsteyn-Thomas, E.J., Gannon, V. P.-J., und Thomas J.E.: Genus- and species-specific detection of Listeria monocytogenes using polymerase chain reaction essays targeting the 16S/23S intergenetic spacer region of the rRNA operon. Can. J. Microbiol. **42**, 1155 – 1162, 1996.
7. Herman, L.M.F., Vaerewijck, M.J.M., Moermans, R.J.B., und Waes, G. Ma. A.V. J.: Identification and detection of Bacillus sporothermodurans spores in 1, 10, and 100 milliliters of raw milk by PCR. Appl. Environ. Microbiol. Aug.: 3139 – 3143, 1997.
8. Juvonen, R., Satokari, R., Mallison, K., und Haikara, A.: Detection of spoilage bacteria in beer by polymerase chain reaction. J. Am. Soc. Brew. Chem. **57**, 99 – 103, 1999.
9. Lewington, J., Greenaway, S.D., und Spillane, B.J.: Rapid small scale preparation of bacterial genomic DNA, suitable for cloning and hybridization analysis. Letters in Applied Microbiology. **5**, 51 – 53, 1987.
10. Mullis, K.B., und Faloona, F.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. **155**, 335 – 350, 1987.
11. Nakagawa, T., Shimada, M., Mukai, H., Azada, K., Kato, I., Fujino, K., und Sato, T.: Detection of alcohol-tolerant hiochi bacteria by PCR. Appl. Environ. Microbiol. Feb.: 637 – 640, 1994.
12. Rassmann, K., und Leibhard, S.: Hochauflösende Klassifizierung von Hefestämmen mit genetischen Methoden. Monatsschrift für Brauwissenschaft **51**, 152 – 156, 1999.
13. Tilsala-Timisjarvi, A., und Alatosava, T.: Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. Int. J. Food Microbiol. Mar. **18**, 35(1):49 – 56, 1997.

(Manuskripteingang: 4. 9. 2000)