



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Department Ökotoxikologie
Studiengang Ökotoxikologie

Validierung des mikrobiologischen Nachweises von Alicyclobacillus spp.

IFU-Methode Nr. 12 versus Real time PCR

- Diplomarbeit -

vorgelegt am: 2. Juli 2009

von

Annette Ellenberger



Betreuender Professor: Prof. Dr. Michael Häusler, HAW Hamburg

Koreferent: Dr. rer. nat. Burkhard Schütze, LADR GmbH
Medizinisches Versorgungszentrum
Dr. Kramer und Kollegen, Geesthacht

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Diplomarbeit unterstützt haben.

Ein herzliches Dankeschön gilt vor allem Herrn Dr. Burkhard Schütze, dem Laborleiter der Lebensmittelanalytik der LADR GmbH MVZ Dr. Kramer & Kollegen, für die kompetente und freundliche Betreuung sowie die fachliche Unterstützung während der Bearbeitung meiner Diplomarbeit. Die hilfreichen Diskussionen haben mir bei der Versuchsdurchführung und Auswertung der Ergebnisse entscheidend weitergeholfen.

Danke auch dem gesamten Team der Lebensmittelanalytik. Das angenehme Arbeitsklima und die freundliche Hilfe haben mir bei der Durchführung der Untersuchungen sehr geholfen.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Armin Pahl, Frau Henriette Tewes sowie dem Team der PCR-Abteilung für die Einarbeitung und die fachlichen Hilfestellungen herzlich bedanken.

An der Hochschule für Angewandte Wissenschaften bedanke ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Michael Häusler für die Betreuung und Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit.

Herzlichen Dank auch an Doreen, die mir bei der Überarbeitung und Korrektur der Arbeit sehr geholfen hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt vor allem meiner Familie und meinem Freund Markus für die Geduld und die Unterstützung während meiner gesamten Studienzzeit.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
2 Theoretische Grundlagen	9
2.1 Mikrobiologie von Fruchtsäften	9
2.1.1 Chemische Zusammensetzung von Fruchtsäften	9
2.1.2 Fruchtsäfte verderbende Mikroorganismen	11
2.1.3 Verderbnisfördernde und verderbnishemmende Faktoren	15
2.1.4 Die Infektion der Säfte	21
2.2 <i>Alicyclobacillus spp.</i>	23
2.2.1 Eigenschaften	23
2.2.2 Vorkommen und Bedeutung	25
2.2.3 Untersuchungsmethoden	28
2.3 Polymerase-Kettenreaktion	32
2.3.1 Die Struktur der DNA	32
2.3.2 Das Reaktionsprinzip der PCR	33
2.3.3 Die Teilschritte der PCR	34
3 Praktischer Teil	37
3.1 Begriffsbestimmung	37
3.2 Arbeitsvorschrift für die Validierung qualitativer Verfahren	38
3.3 Material	39
3.3.1 Probenmaterial	39
3.3.2 Bakterienstämme	39
3.3.3 Nährmedien und Reagenzien	40
3.3.4 Geräte, Hilfsmittel und Chemikalien	44
3.4 Methoden	47
3.4.1 Bestimmung der Animpfkonzentration von <i>Alicyclobacillus spp.</i>	47
3.4.2 Qualitativer Nachweis von <i>Alicyclobacillus spp.</i> – IFU-Nr. 12	49

3.4.3 Nachweis von <i>Alicyclobacillus spp.</i> – real-time PCR.....	52
3.4.3.1 Isolierung und Reinigung der DNA	52
3.4.3.2 Amplifikation der DNA.....	55
3.4.4 Ermittlung der Keimgehalte nach jeweils 24 Stunden	60
3.4.5 Nachweisgrenze der real-time PCR für <i>Alicyclobacillus spp.</i>	61
3.4.5.1 Ermittlung der Nachweisgrenze anhand einer Verdünnungsreihe des Stammes <i>A. acidoterrestris</i>	61
3.4.5.2 Ermittlung der Nachweisgrenze anhand der untersuchten Saft-..... konzentrat-Proben	64
4 Ergebnisse.....	65
4.1 Animpfkonzentration von <i>Alicyclobacillus spp.</i>	65
4.2 Qualitativer Nachweis von <i>Alicyclobacillus spp.</i> – IFU-Nr. 12	66
4.3 Nachweis von <i>Alicyclobacillus spp.</i> – real-time PCR	68
4.4 Verfahrensvergleich IFU-Nr. 12 – real-time PCR.....	71
4.5 Wachstumskurven und Generationszeiten	73
4.6 Nachweisgrenze der real-time PCR für <i>Alicyclobacillus spp.</i>	78
4.6.1 Ermittlung der Nachweisgrenze anhand einer Verdünnungsreihe des..... Stammes <i>A. acidoterrestris</i>	78
4.6.2 Ermittlung der Nachweisgrenze anhand der untersuchten Saft-	80
konzentrat-Proben.....	80
5 Diskussion	82
5.1 Ergebnisse des Referenzverfahrens IFU-Methode Nr. 12	83
5.2 Ergebnisse des Alternativverfahrens real-time PCR.....	84
5.3 Verfahrensvergleich IFU-Nr. 12 – real-time PCR.....	86
5.4 Wachstumsverhalten und Generationszeiten	87
5.5 Nachweisgrenze der real-time PCR für <i>Alicyclobacillus spp.</i>	88
6 Zusammenfassung.....	90
7 Abstract.....	92
Abbildungsverzeichnis	94
Tabellenverzeichnis	95
Literaturverzeichnis	96
Anhang	

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A-	Negativergebnisse des Alternativverfahrens
A. dest.	Aqua dest
A.I.J.N.	Association of the Industries of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Union
A+	Positivergebnisse des Alternativverfahrens
AC	Relative Genauigkeit
A.	Alicyclobacillus
ATCC	American Type Culture Collection
B.	Bacillus
BAT	Bacillus-adicoterrestis-Nährmedium
C	Cytosin
dATP	Desoxyadenosin-5´-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5´-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5´-triphosphat
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidin-5´-triphosphat
EN	Europäische Norm
g	Generationszeit
G	Guanin
GfL	Gesellschaft für Lebensmittelforschung
HCl	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
IFU	Internationale Fruchtsaft Union
ISO	Internationale Organisation für Normung
KbE	Kolonie bildende Einheiten
KCl	Kaliumchlorid
LC	Light Cyclor
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

N	Gesamtanzahl der Proben
N-	Gesamtanzahl negativer Ergebnisse des Referenzverfahrens
N+	Gesamtanzahl positiver Ergebnisse des Referenzverfahrens
NA	negative Übereinstimmungen
ND	Negativabweichung
PA	positive Übereinstimmungen
PC	Plate-Count-Nährmedium
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PD	Positivabweichung
R-	Negativergebnisse des Referenzverfahrens
R+	Positivergebnisse des Referenzverfahrens
SE	Relative Empfindlichkeit
SP	Relative Spezifität
spp.	Mehrzahl
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
v	Teilungsrate

Anmerkung:

Ab Kapitel 3 wird häufig die Methode real-time PCR erwähnt. Hier handelt es sich um eine real-time PCR zum Nachweis von *Alicyclobacillus spp.*, da hier spezifische *Alicyclobacillus*-Primer eingesetzt wurden.

1 Einleitung

Fruchtsäfte und Fruchtsaftkonzentrate zählen im Allgemeinen zu den mikrobiologisch unproblematischen Lebensmitteln. Aufgrund der thermischen Behandlung durch Pasteurisation und ihres niedrigen pH-Wertes sind sie relativ selten mikrobiologischem Verderb ausgesetzt.

Immer wieder treten jedoch Fälle auf, in denen Fruchtsäfte trotz des niedrigen pH-Wertes durch Mikroorganismen verdorben werden. Als Verderbniserreger wurde hier unter anderem die Gattung *Alicyclobacillus spp.* identifiziert.

Die Gattung *Alicyclobacillus spp.* gehört zu den apathogenen, strikt aeroben, acidophilen und thermophilen Sporenbildnern. Ihr Wachstumsoptimum liegt zwischen 40°C – 60°C und das pH-Optimum bei 3,5 – 4,5. Die Sporen von Alicyclobazillen sind hitzeresistent und überleben den normalen Pasteurisationsprozess der Saftherstellung. Aus diesem Grund ist auch in pasteurisierten Getränken mit dem Vorkommen zu rechnen. Einige Arten der Gattung *Alicyclobacillus spp.*, wie beispielsweise *A. acidoterrestris*, bilden die Stoffwechselprodukte Guajakol, 2,6-Dibromphenol und 2,6-Dichlorphenol. Diese Stoffwechselprodukte rufen einen fremdartig chemisch-phenolischen Geruch und Geschmack hervor (Yokota, A. et al., 2007, S. 14ff).

Dieser „Off-Flavour“ wird vom Verbraucher nicht akzeptiert und führt zu großen wirtschaftlichen Verlusten für die Safthersteller.

Eine Untersuchung von Fruchtsäften und Fruchtsaftkonzentraten auf das Vorhandensein von *Alicyclobacillus spp.* wird daher von vielen Herstellern routinemäßig im mikrobiologischen Labor in Auftrag gegeben.

Derartige Untersuchungen werden von der LADR GmbH MVZ Dr. Kramer und Kollegen in Geesthacht durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgen nach den Vorgaben der IFU-Methode Nr. 12. Diese Untersuchungen sind zeitintensiv - bis zum Ergebnis vergehen bis zu zwölf Tage. Häufig sind jedoch schneller Ergebnisse von den Saftherstellern gewünscht.

Zielsetzung

Ziel dieser Diplomarbeit ist es, zu klären, ob durch den molekularbiologischen Nachweis mittels real-time PCR die Ergebnisse schneller zur Verfügung stehen. Aufgrund bisheriger Erfahrungen mit molekularbiologischen Nachweisverfahren wird ein sicheres PCR-Ergebnis nach zwei bis drei Tagen erwartet.

Anhand der Validierungsvorschrift DIN EN ISO 16140:2003 galt es, die Alternativmethode real-time PCR mit der Referenzmethode IFU- Nr. 12 zu vergleichen und die Eignung der real-time PCR zum Nachweis von *Alicyclobacillus spp.* anhand statistischer Berechnungen zu überprüfen. Weiterhin sollte die Nachweisgrenze der real-time PCR ermittelt werden.

Dazu wurden umfangreiche Untersuchungen mit 60 „natürlich“ kontaminierten Fruchtsaftkonzentraten sowie mit dem Bakterienstamm *A. acidoterrestris* ATCC 49025 durchgeführt.

Anschließend erfolgte ein Verfahrensvergleich gemäß DIN EN ISO 16140:2003.

Aufbau der Arbeit

Die vorliegende Arbeit umfasst einen theoretischen und einen praktischen Teil.

Der theoretische Abschnitt (Kapitel 2) beinhaltet die Grundlagen zur Mikrobiologie von Fruchtsäften und Fruchtsaftkonzentraten. Des Weiteren werden hier die Eigenschaften und Charakteristika des Bakteriums *Alicyclobacillus spp.* aufgeführt sowie die Grundlagen der Polymerasekettenreaktion dargelegt.

Im praktischen Teil (Kapitel 3) dieser Diplomarbeit wird die Vorgehensweise im Labor beschrieben und die angewandten Materialien und Untersuchungsmethoden werden genauer erläutert.

Im Anschluss an den praktischen Teil erfolgt eine Auflistung aller Untersuchungsergebnisse (Kapitel 4) sowie eine Diskussion dieser Ergebnisse (Kapitel 5).

In Kapitel 6 und 7 sind die wichtigsten Ergebnisse dieser Diplomarbeit zusammengefasst.

2 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden grundlegende Eigenschaften der Mikrobiologie von Fruchtsäften sowie verderbnisfördernde und verderbnishemmende Faktoren aufgezeigt. Weiterhin werden die wichtigsten Eigenschaften der Gattung *Alicyclo-bacillus spp.* beschrieben und die Methoden zum Nachweis dieser Bakterien werden dargelegt. Zudem werden die Grundlagen der Polymerase-Kettenreaktion erläutert.

2.1 Mikrobiologie von Fruchtsäften

2.1.1 Chemische Zusammensetzung von Fruchtsäften

Die Produktgruppe der Fruchtsäfte und Nektare gehört im Allgemeinen aufgrund der niedrigen pH-Werte zu den mikrobiologisch unproblematischen Lebensmitteln. Für verschiedene Mikroorganismen stellen sie jedoch einen geeigneten Nährboden dar, da es nährstoffreiche, natürliche Substrate sind (Back, W., 2000, S. 2). Die nachfolgende Tabelle zeigt die chemische Zusammensetzung verschiedener Fruchtsäfte.

Tab. 1: Chemische Zusammensetzung von Fruchtsäften

	Apfelsaft/ -mark	Birnenmark/ -saft	Sauerkirsch- saft/-mark	Aprikosen- mark/-saft	Pfirsich- mark/-saft	Erdbeer- saft/-mark
Relative Dichte 20°/20°						
Direktsaft	min. 1,040	1,044	min. 1,050	min. 1,041	min. 1,036	min. 1,025
Saft aus Konzentrat	min. 1,045	1,048	min. 1,055	min. 1,045	min. 1,040	min. 1,028
Glucose	g/l 15–35	10–35	35–70	15–50	7,5–25	15–35
Fructose	g/l 45–85	50–90	32–60	10–45	10–32	18–40
Glucose: Fructose	0,3–0,5	max. 0,4	1,0–1,35	1,0–2,5	0,80–1,0	0,75–1,0
Saccharose	g/l 5–30	Spuren-15	prakt. 0	Spuren-55	12–60	max. 10
Zuckerfreier Extrakt	g/l 18–29	24–80	45–100	35–70	35–70	15–35
Sorbit	g/l 2,5–7	10–25	10–35	1,5–10	1,0–5	max. 0,25
Titrierbare Säure pH 8,1	mval 52–117	30–110	200–350	100–300	50–125	80–180
Citronensäure	g/l 0,05–0,20	max. 4,0	max. 0,40	1,5–16	1,5–5,0	5–11
D-Isocitronensäure		max. 40		75–200	30–160	30–90
Citronensäure: Isocitronensäure				15–130	15–100	100–230
L-Äpfelsäure	g/l min. 3,0	0,8–5,0	15,5–27	5–20	2–6	0,6–5,0
Asche	g/l 1,9–3,5	2,2–4,0	3,7–7,0	4,5–9,0	3–7	2,8–6,0
Natrium	mg/l max. 30	max. 30	max.30	max. 35	max. 35	max. 30
Kalium	mg/l 900–1500	1000–2000	1600–3500	2000–4000	1400–3300	1000–2300
Magnesium	mg/l 40–75	45–95	80–200	65–130	50–110	70–170
Calcium	mg/l 30–120	35–130	80–240	85–200	40–150	80–300
Phosphor	mg/l 40–75	65–200	150–280	100–300	110–230	100–300
Nitrat	mg/l max. 5	max. 10	max. 10	max. 15	max. 15	
Sulfat	mg/l max. 150	max. 150	max. 300	max. 350	max. 150	max. 150
Formolzahl ml 0,1 mol NaOH/100 ml	3–10	2–17	15–50	12–50	15–35	5–26
Prolin	mg/l max. 20	30–500	50–400	50–800	10–100	Spuren-30

(Quelle: Schobinger, U., 2001, S. 75)

Zucker liegt in Säften und Saftkonzentraten meist in höheren Konzentrationen vor, als von den Mikroorganismen benötigt wird, nämlich bis zu 10,0%. Glucose und Fructose bilden hierbei den größten Anteil. Saccharose liegt häufig in geringeren Mengen vor. Für die Vermehrung von Hefen reichen bereits 0,1% dieser Zucker aus. Pentosen, die beispielsweise von Milchsäurebakterien genutzt werden können, sind nur in sehr geringen Mengen in Säften enthalten.

Freie *Aminosäuren* liegen in allen Säften und Saftkonzentraten in ausreichender Menge vor und bieten den Mikroorganismen somit eine geeignete Stickstoffquelle. Das Stickstoffminimum für eine sichtbare Infektion liegt bei 0,2 mg N/L Getränk.

Organische Säuren wie Zitronen- und Apfelsäure können von den Mikroorganismen umgesetzt werden. Durch den Säureabbau wird der pH-Wert angehoben und somit werden die Vermehrungschancen für Verderbniserreger, wie beispielsweise Milchsäurebakterien, verbessert. Ameisen- und Essigsäure haben dagegen eine antibakterielle Wirkung. Phenolcarbonsäure, die in einigen Säften vorliegt, ist ebenfalls gegen Mikroorganismen wirksam.

Säfte enthalten zudem *Vitamine*, die von den Mikroorganismen genutzt werden können. Einige wasserlösliche Vitamine, die von Milchsäurebakterien benötigt werden, sind in Säften in ausreichenden Mengen vorhanden. Hefen und Schimmelpilze sind in der Lage, die von ihnen benötigten Vitamine zu synthetisieren, falls die im Saft vorhandenen Mengen nicht ausreichen.

Ein weiterer Bestandteil der Säfte sind *Mineralstoffe*. Diese sind für Mikroorganismen unter anderem als Enzymeffektoren, für den Energiestoffwechsel sowie die Synthese schwefelhaltiger Aminosäuren lebensnotwendig. Häufig vorkommende Mineralstoffe sind beispielsweise Kalium, Magnesium, Calcium, Phosphor und Natrium.

Wasser bildet mit über 90% den Hauptbestandteil der Säfte.

Durch Konzentrationsprozesse wird jedoch der a_w -Wert vermindert und das Saftkonzentrat wird für die Vermehrung von Mikroorganismen immer ungeeigneter (Schobinger, U., 2001, S. 518f).

Mikroorganismen hemmende Stoffe, wie beispielsweise ätherische Öle aus Schalen von Zitrusfrüchten, sind in Säften nur in geringen Konzentrationen enthalten. Sie können nur in Verbindung mit chemischen und physikalischen Methoden zur Konservierung dienen (ebd.).

2.1.2 Fruchtsäfte verderbende Mikroorganismen

Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, sind Fruchtsäfte und Fruchtsaftkonzentrate geeignete Nährböden für spezialisierte Mikroorganismen. Fruchtsäfte weisen jedoch einen wirkungsvollen Eigenschutz auf, da sie in Folge der hohen Konzentration an Fruchtsäuren niedrige pH-Werte besitzen. Diese liegen meist im Bereich von 2,5 – 4,5. Somit haben hier nur acidophile und acidotolerante Mikroorganismen die Möglichkeit zur Vermehrung (Back, W., 2000, S. 2).

Fruchtsäfte können im Wesentlichen auf drei verschiedene Arten verderben. Sie können vergären, verschimmeln oder es werden sensorisch abstoßende Verderbnisprodukte gebildet, die das Produkt ungenießbar machen. Dieser Verderb wird durch drei verschiedene Arten infizierender Mikroorganismen verursacht: durch Schimmelpilze, Hefen und Bakterien (Dittrich, H. H., 1998, S. 55).

Zu den Bakterien, die einen Fruchtsaftverderb verursachen können, gehören vor allem die Essigsäurebakterien, Milchsäurebakterien sowie aerobe Sporenbildner.

Essigsäurebakterien findet man häufig auf der Oberfläche von Früchten. Wenn sie beim Pressen heruntergespült werden und stark infizierte Früchte in den Saft gelangen kann es zum sogenannten „Essigstich“ führen. Durch die Bildung der geruchlich und geschmacklich charakteristischen Essigsäure kommt es zum Verlust der Verkehrsfähigkeit (Schobinger, U., 2001, S. 508f).

Milchsäurebakterien findet man ebenfalls auf Blättern und Früchten. Milchsäurebakterien sind säuretolerant und gehören zu den Zucker umsetzenden Organismen. Ein Verderb der Säfte erfolgt durch die Bildung von Milchsäure, Essigsäure oder CO₂. Zudem kann es zur Bildung von Polysacchariden aus dem Zucker der Säfte kommen. Dies führt zu Viskositätsveränderungen, die Säfte werden „zäh“ (ebd., S. 509f).

Ein Saftverderb durch *aerobe Sporenbildner* erfolgt vorwiegend durch die Arten der Gattung *Bacillus spp.* Diese sporenbildenden Bakterien kommen im Erdboden vor und können somit durch ungenügend gereinigte Früchte in den Saft gelangen. Durch die Hitzeresistenz der Sporen überleben diese den Pasteurisationsprozess und werden im Gegensatz zu den meisten Bakterien nicht abgetötet. In Fruchtsäften und Fruchtsaftkonzentraten wurde zudem weltweit *Alicyclobacillus acidoterrestris* entdeckt. Diese Spezies gehört zu den stark säuretoleranten Mikroorganismen. Bakterien können in Fruchtsäften, Fruchtsaftkonzentraten und Nektaren zum Verderb führen indem sie einen phenolartigen „Off-Flavour“ hervorrufen (ebd., S. 511).

Hefen haben als Verderber von Säften die größte Bedeutung. Einige Arten, sind extrem säuretolerant, benötigen nur wenig Sauerstoff und weisen auch bei niedrigen Temperaturen hohe Vermehrungsraten auf. Hefen, die beispielsweise in Fruchtsäften und Konzentraten auftreten können, gehören zur Gattung *Saccharomyces*. Diese Hefen sind in der Lage Aldehyde, Ketosäuren, Glycerin und Ester zu bilden. Zudem besitzen sie die Fähigkeit, Zucker in Ethanol und CO₂ zu vergären und können somit eine Getränkeschädigung hervorrufen. Die wichtigsten Arten sind *Saccharomyces cerevisiae* sowie die osmotolerante Art *Zygosaccharomyces bailii* (ebd., S. 511f).

Ein Saftverderb kann weiterhin durch *Schimmelpilze* hervorgerufen werden. Schimmelpilze sind Aerobier und wachsen meist an der Oberfläche des Substrates. Besonders häufig ist ein Befall durch die Schimmelpilze der Gattung *Penicillium* zu verzeichnen. Ein häufiger Verderber von Fruchtsäften ist beispielsweise *Penicillium velutinum*. Dieser wurde aus Apfel-, Trauben – und Mehrfruchtsäften isoliert. Ebenso häufig treten auch *Penicillium notatum* sowie *Penicillium digitatum*

auf. Zu den *Aspergillus*-Arten, die ebenfalls in Fruchtsäften auftreten können, gehören *Aspergillus sydowi* und *Aspergillus amstelodami*. Diese haben jedoch eine geringere Bedeutung als die *Penicillium*-Arten (ebd., S. 513).

Besonders ernstzunehmende Schädlinge sind vor allem die Schimmelpilz-Arten *Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea*, *Neosartorya fischeri* und *Talaromyces flavus*. Diese weisen eine Resistenz gegen Hitzebehandlung auf (Back, W., 2000, S. 2).

Eventuell gesundheitlich bedenkliche Bakterien wie beispielsweise *Salmonellen*, *Shigellen*, *Listerien* oder *Clostridien* spielen in Fruchtsäften aufgrund der niedrigen pH-Werte eine eher geringe Rolle. Diese Organismen können sich unter pH 4,5 weder vermehren noch Toxine bilden (Schobinger, U., 2001, S. 511).

Visuelle und sensorische Veränderungen

Durch die Aktivität der Mikroorganismen kommt es zu visuellen sowie zu sensorisch wahrnehmbaren Veränderungen in den Säften.

Zu den *visuellen* Veränderungen zählt beispielsweise die Eintrübung klarer Säfte. Sollten Infektanten die Möglichkeit haben, sich in den Säften zu vermehren, nimmt zunächst die Klarheit ab. Eine schnelle Eintrübung der Säfte ist vor allem bei einer Hefeninfektion sichtbar, während die Trübung bei einer Bakterieninfektion meist viel schwächer ist.

Durch die Aktivität von Hefen und Schimmelpilzen kommt es zum Abbau von Pektin und einer damit verbundenen Viskositätsabnahme. Dies ist besonders gefährlich für naturtrübe Säfte, weil es zum Ausfall der Trübstoffe kommt. Die Säfte klären aus (Schobinger, U., 2001, S. 532).

Die Bombagen-Bildung bei Weichpackungen, die Bildung eines Biofilms an der Oberfläche der Säfte durch mikroaerophile und aerobe Mikroorganismen sowie Farbveränderungen sind weitere Folgen der mikrobiellen Aktivität in Säften. (Back, W., 2008, S. 50ff).

Sensorisch wahrnehmbare Veränderungen sind vor allem durch die Bildung von Alkohol, Bitternoten, Medizintönen bzw. Schimmel- und Mufftönen charakterisiert (Back, W., 2008, S. 50ff).

Ebenso kann es durch die Aktivität von Milchsäurebakterien und Essigsäurebakterien zu einer Viskositätszunahme kommen. Die Säfte werden in diesem Fall zäh und schleimig (Schobinger, U., 2001, S. 532).

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Auswirkungen mikrobieller Aktivität in Säften.

Tab. 2: Auswirkungen mikrobieller Aktivität in Säften

A. visuelle Veränderungen	Ursachen
Eintrübung klarer Produkte, Sedimentbildung, Biofilmbildung	<u>Vermehrung</u> : Hefen, Milchsäure-, Essigsäurebakterien, Schimmelpilze
Bombagen bei Weichpackungen, Farbveränderungen	<u>Vermehrung mit CO₂-Bildung</u> : Hefen, heterofermentative Milchsäurebakterien
Ausklaren trüber Säfte	<u>Pektinabbau</u> : Hefen, Schimmelpilze
B. sensorisch wahrnehmbare Veränderungen	
Ethanol, Diacetylbildung, Kohlensäure	<u>Aktivität von</u> : Milchsäurebakterien, Hefen
Flüchtige Säure, Milchsäurebildung	Milchsäurebakterien
Säureverminderung (mit pH-Wert-Erhöhung)	Milchsäurebakterien
Bitternoten	Milchsäurebakterien (→Lactobacillus)
Medizintöne	Brettanomyces-Hefen, Alicyclobacillus acidoterrestris
Erhöhung der Viskosität („Schleimbildung“)	Milchsäurebakterien, („Schleimhefen“, Essigsäurebakterien)
C. weitere Veränderungen	
Biogene Aminbildung	Milchsäurebakterien
Toxin-Freigabe	Enterobacteriaceen, insb. pathogene Escherichia coli → E. coli 0157:H7

(Quelle: Back, W., 2008, S. 51)

2.1.3 Verderbnisfördernde und verderbnishemmende Faktoren

Die Vermehrung einer Bakterienkultur erfolgt durch Zweiteilung der Zelle. Dies führt zur exponentiellen Erhöhung der Zellzahl. Somit wird keine konstante Menge an Zellen in einem bestimmten Zeitraum gebildet, sondern die bereits vorhandene Biomasse wird verdoppelt. Die Zeitdauer, die eine Bakterienkultur benötigt, um die Zellzahl zu verdoppeln nennt man Generationszeit (Keweloh. H., 2008, S. 34).

Die Wachstumsphasen der Vermehrung verlaufen nach der in Abbildung 1 dargestellten Abfolge.

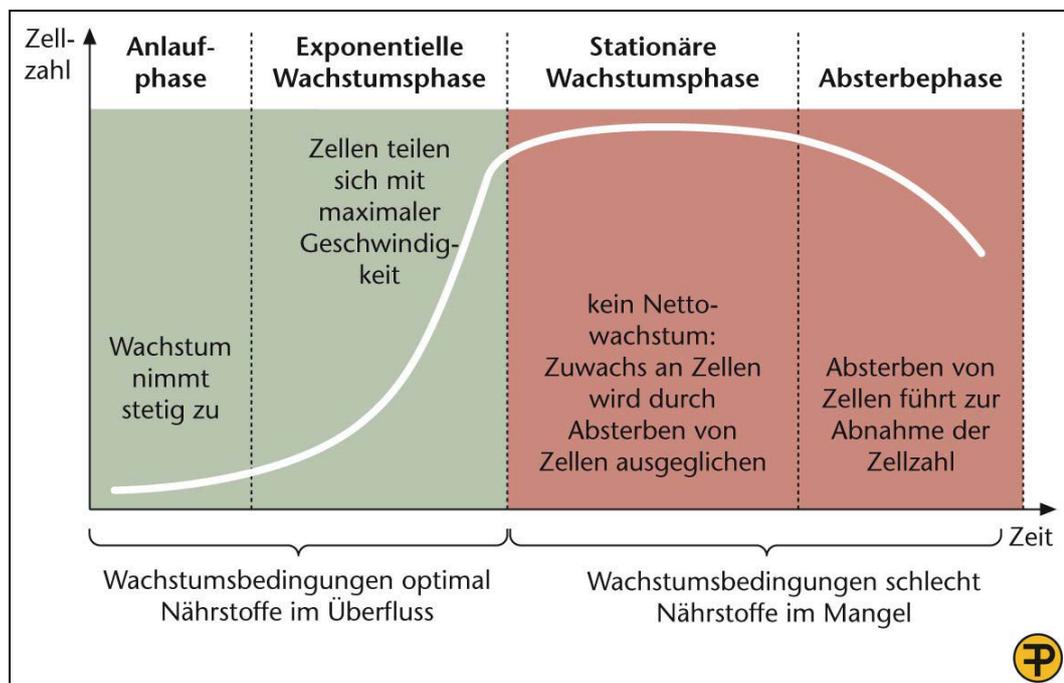


Abb. 1: Wachstumsphasen der Mikroorganismen

(Quelle: Keweloh. H., 2008, S. 36)

In der *Anlauf-Phase* oder *lag-Phase* (engl. lag=Verzögerung) werden Enzyme und Transportsysteme ausgebildet um die angebotenen Substrate zu verwerten. Die Bakterien vermehren sich in dieser Phase nur langsam. In der *exponentiellen Phase* kommt es zur maximalen Wachstumsrate bei optimaler Nutzung der angebotenen Nährstoffe. Das Wachstum schreitet fort, bis das Substrat verbraucht ist und geht dann in die *stationäre Wachstumsphase* über. Es findet kein weiteres

Wachstum mehr statt, da durch die Stoffumsetzung die Lebensbedingungen für die Keime verschlechtert sind. In der *Absterbephase* kommt es zur Abnahme der Lebendzellzahl. Die Bakterien sterben ab und können sich auch in frischem Substrat nicht mehr vermehren. Einige Bakterien können in dieser Phase Dauerformen bilden um diese schlechten Bedingungen zu überleben (Cypionka, H., 2005, S. 94f).

Für das Wachstum und die Vermehrung von Mikroorganismen sind bestimmte Wachstumsbedingungen notwendig. Je nach Beschaffenheit des Substrates, kann dieses das Wachstum von Mikroorganismen begünstigen oder unterdrücken und somit verderbnisfördernd bzw. verderbnishemmend wirken.

Im Folgenden werden die wichtigsten Wachstumsbedingungen für Mikroorganismen aufgeführt.

pH-Wert

Je nach pH-Optimum unterscheidet man acidophile, neutrophile und alkaliphile Organismen (Fuchs, G., 2007, S. 161f). Die meisten Mikroorganismen haben ihr pH-Optimum im schwach sauren bis neutralen Bereich von etwa pH 5 - 8. Wie aus Tabelle 3 zu entnehmen ist, liegt das pH-Minimum bei den meisten Verderbnis erregenden Organismen in Bereichen von pH 4 – 5 und das pH-Maximum bei Werten von 8 – 9. Hefen und Schimmelpilze sind pH-stabil und wachsen auch in pH-Bereichen von 1 - 9 (Krämer, J., 2007, S. 136).

Wie bereits in Kapitel 2.1.2 beschrieben, besitzen Fruchtsäfte häufig einen pH-Wert zwischen 2,5 – 4,5. Dadurch wird das Wachstum der meisten Mikroorganismen unterdrückt. Einen Fruchtsaftverderb können daher nur acidophile und acidotolerante Mikroorganismen hervorrufen (Back, W., 2000, S. 2).

Tab. 3: pH-Werte für das Wachstum von Mikroorganismen

Mikroorganismen (Beispiele)	Minimum pH	Maximum pH	Säuretoleranz
<i>Micrococcus</i> sp.	5,6	8,1	Geringe
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,6	8,0	Säuretoleranz
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	5,2	9,2	pH _{min} > 5,0
<i>Clostridium botulinum</i> Typ E	5,0–5,2		Mittlere
<i>Clostridium sporogenes</i>	5,0	9,0	Säuretoleranz
<i>Clostridium perfringens</i>	5,0	8,3	pH _{min} 5,0–4,0
<i>Campylobacter jejuni</i>	4,9	8,0	
<i>Listeria monocytogenes</i>	4,5	9,0	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4,5	9,0	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4,8	11,0	
<i>Clostridium botulinum</i> Typ A, B	4,5	8,5	
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,0	9,8	
Salmonellen	4,0–4,5	8,0–9,6	
<i>Escherichia coli</i>	4,4	9,0	
<i>Proteus vulgaris</i>	4,4	9,2	
<i>Streptococcus lactis</i>	4,3–4,8	9,2	
<i>Bacillus cereus</i>	4,3–4,9	9,3	
Milchsäurebakterien			Hohe
<i>Lactobacillus</i> spp.	3,8–4,4	7,2	Säuretoleranz
Essigsäurebakterien			pH _{min} < 4,0
<i>Acetobacter acidophilu</i>	2,6	4,3	
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> ,			
<i>A. acidocaldarius</i>	2,2	6,0	
Hefen			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,3	8,6	
Pilze			
<i>Penicillium italicum</i>	1,9	9,3	
<i>Aspergillus oryzae</i>	1,6	9,3	

(Quelle: Krämer, J., 2007, S. 138)

Redoxpotential

Das Redoxpotential (E_h) beschreibt das Verhältnis von oxidierten und reduzierten Stoffen. Ein hohes Redoxpotential weist auf ein sauerstoffreiches Milieu hin während ein niedriges Redoxpotential bei geringen Sauerstoffmengen vorliegt.

Der Sauerstoffbedarf von Bakterien kann art- und stammspezifisch stark variieren. Aerobe Mikroorganismen benötigen hohe E_h -Werte in Bereichen von +100mV - +500mV. Fakultativ anaerobe Mikroorganismen tolerieren dagegen sowohl positive als auch negative E_h -Werte für das Wachstum. Anaeroben Organismen

wachsen nur bei sehr geringen E_h -Werten von etwa -300mV (Krämer, J., 2007, S. 142).

Frucht- und Gemüsesäfte weisen oft erhöhte E_h -Werte in Bereichen von +300mV – +400mV auf (ebd.). Aus diesem Grund kann es an der Oberfläche von Fruchtsäften durch eine gute Sauerstoffversorgung zum Wachstum von Hefen und Schimmelpilzen sowie Essigsäurebakterien kommen, da diese zur Gruppe der Aerobier gehören. Milchsäurebakterien sind mikroaerophil und können sich somit in Fruchtsäften gut vermehren, falls die pH-Werte dies zulassen (Back, W., 2008, S. 77). Ebenso ist ein Verderb durch *Alicyclobacillus spp.* möglich, da diese zur Gruppe der obligat aeroben Organismen gehören. Bei Sauerstoffausschluss können vegetative Zellen sporulieren und anschließend unter günstigen, aeroben Bedingungen auskeimen (Yokota, A. et al., 2007, S. 21).

Wasseraktivität

Die Wasseraktivität (a_w -Wert) ist ein Maß für das frei verfügbare Wasser in einem Lebensmittel. Sie ist definiert als Quotient des Wasserdampfdruckes über einem Lebensmittelsubstrat (p) zu dem Wasserdampfdruck über reinem Wasser (p_0) bei der gleichen Temperatur ($a_w = p/p_0$) (Jay, J. M., 2005, S. 45).

Mikroorganismen benötigen für die Stoffwechselaktivität freies Wasser, ein Wasserentzug führt zur Verlangsamung des Wachstums. Lebensmittelinhaltsstoffe wie Zucker, Salz oder Proteine binden das frei verfügbare Wasser. Dieses steht somit den Mikroorganismen nicht mehr zur Verfügung.

Lebensmittel mit einem a_w -Wert $>0,95$ gelten als leicht verderblich. Mittelgradig verderbliche Lebensmittel sind gekennzeichnet durch a_w -Werte in Bereichen zwischen $<0,95$ und $>0,91$. Kaum verderblichen Lebensmitteln besitzen a_w -Werte unter 0,90 (Krämer, J., 2007, S.139ff). Bei einem a_w -Wert von $<0,60$ ist das Wachstum aller Mikroorganismen gehemmt (Kopra, N., 2006, S. 3).

Abbildung 2 verdeutlicht den Einfluss der Wasseraktivität auf das Wachstum der Mikroorganismen.

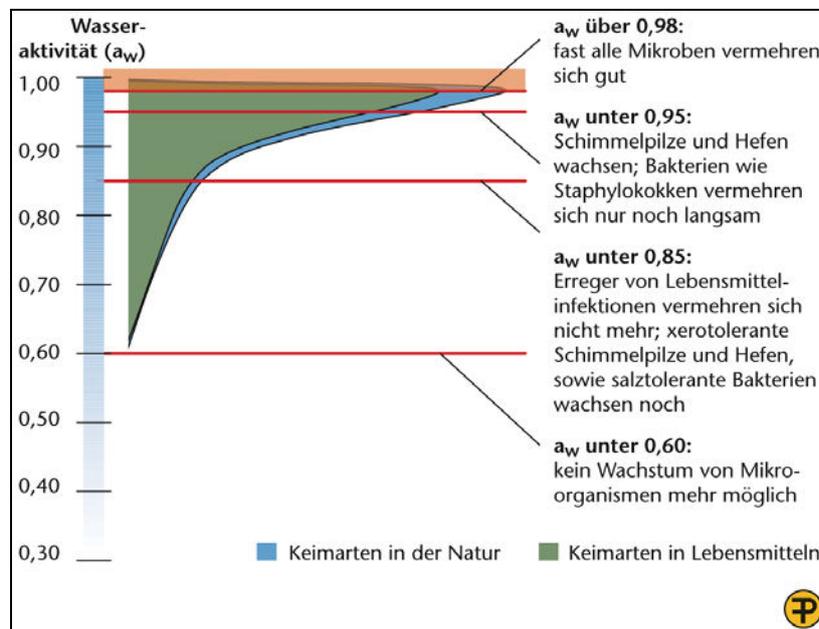


Abb. 2: Einfluss der Wasseraktivität auf das Wachstum von Mikroorganismen
(Quelle: Keweloh, H., 2008, S. 111)

In Säften und Saftkonzentraten liegen hohe Zuckergehalte vor. Zudem kann durch Konzentrierprozesse der Trockensubstanzgehalt auf 60% – 75% erhöht werden. Die Wasseraktivität sinkt damit auf Werte von 0,73 – 0,94 ab. Ein Konzentratverderb durch Bakterien ist daher selten (Schobinger, U., 2001, S. 314).

Osmotolerante Hefen hingegen, sind in der Lage, sich auch in höchstkonzentrierten Zuckerlösungen zu vermehren. Die mit der Gärung verbundene CO_2 -Bildung kann somit zum Platzen des Vorratsbehälters führen (ebd., S. 516).

Durch unsachgemäße Lagerung von Säften und Konzentraten in Behältern mit Wasserresten oder durch Schwitzwasserbildung wird die Oberfläche der Substrate stark verdünnt. Durch die Erhöhung des a_w -Wertes und die optimale Sauerstoffversorgung ist eine Besiedlung der Oberfläche mit Bakterien, Hefen oder Schimmelpilzen möglich (Dittrich, H. H., 1998, S. 59f).

Temperatur

Hinsichtlich ihrer Temperaturansprüche verhalten sich Mikroorganismen verschieden. Nach ihren Temperaturbereichen teilt man sie in vier Gruppen ein, wie auch in Abbildung 3 verdeutlicht wird.

Psychrophile Mikroorganismen haben ihr Wachstumsoptimum bei 12°C - 15°C, wachsen jedoch auch unter 0°C. Psychrotolerante Bakterien wachsen optimal in Temperaturbereichen von 25°C - 30°C. Mesophile Organismen haben ihr Optimum bei 30°C – 40°C und thermophile Mikroorganismen vermehren sich am besten bei 55°C - 75°C (Krämer, J., 2007, S. 143f).

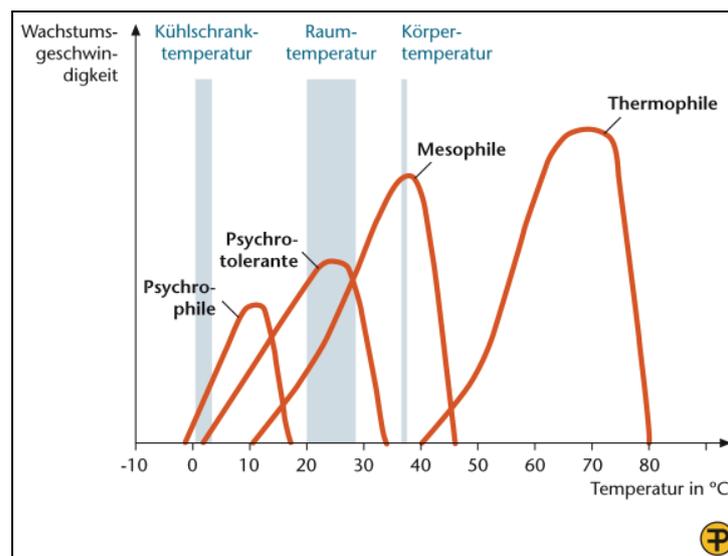


Abb. 3: Einteilung der Mikroorganismen nach ihrem Temperaturverhalten
(Quelle: Keweloh. H., 2008, S. 103)

Alicyclobazillen gehören zur Gruppe der thermophilen Mikroorganismen und vermehren sich in Bereichen von 20°C - 70°C. Das Wachstumsoptimum liegt zwischen 40°C - 60°C (Yokota, A. et al., 2007, S. 14). *Alicyclobacillus acidoterrestris* bildet hitzeresistente Sporen, sodass auch in pasteurisierten Getränken mit dem Vorkommen zu rechnen ist (ebd., S. 24).

Nährstoffangebot

Mikroorganismen können sich in Lebensmitteln nur dann vermehren, wenn ein bestimmtes Nährstoffangebot zur Verfügung steht. Säfte und Saftkonzentrate sind komplexe Substrate und enthalten somit eine Vielzahl wichtiger Substanzen (Kapitel 2.1.1). Somit stellen Fruchtsäfte einen optimalen Nährboden für viele Mikroorganismen dar.

2.1.4 Die Infektion der Säfte

Für die mikrobielle Infektion der Säfte gibt es zwei Hauptinfektionsquellen. Zum einen ist dies der Keimgehalt der verarbeiteten Früchte und zum anderen die Infektionsmöglichkeit im Betrieb.

Auf der Oberfläche von Früchten und Blättern befindet sich eine Vielzahl von Mikroorganismen. Werden diese Mikroorganismen durch fauliges oder verunreinigtes Obst in die Betriebe eingeschleppt, kann dies schnell zu einer Kontamination der Säfte führen und somit zum Verderb.

Das Vorkommen der Mikroorganismen unterliegt jahreszeitlichen Schwankungen. Die Hefezahlen nehmen beispielsweise gegen Herbst zu, während Milchsäurebakterien bereits Ende Juni bis Mitte Juli ihr Maximum erreichen und das Vorkommen der Essigsäurebakterien hauptsächlich Ende Juni zu verzeichnen ist.

Die Verteilung der Mikroorganismen ist meist nicht gleichmäßig. Viele Hefen befinden sich in kleinen Rissen, aus denen Saft austritt. Durch diese Bedingungen können sich die Hefen dort gut vermehren. Auf der Fruchtoberfläche befinden sich dagegen nur wenige Hefen, da sich diese dort nicht vermehren können. Verletzte Früchte weisen somit höhere Mikroorganismenzahlen auf.

Der Erdboden ist ein natürlicher Lebensraum der Mikroorganismen. Durch Erde erfolgt nicht nur eine Kontamination der Früchte mit Schimmelpilzen und Hefen sondern auch mit Bakterien. Dazu gehören vor allem die aeroben Sporenbildner der Gattung *Bacillus* sowie die anaeroben Sporenbildner der Gattung *Clostridium*.

Mit Zunahme der Keimgehalte steigt die Infektions- und Verderbnisgefahr der Säfte. Grundsätzlich sollte verletztes, angefaultes sowie mit Erde verunreinigtes Fallobst aufgrund der hohen Keimgehalte nicht zur Versaftung genutzt werden (Schobinger, U., 2001, S. 520f).

Infektionsmöglichkeiten im Betrieb ergeben sich beim Bearbeiten und Abfüllen der Säfte. Hier können beispielsweise Füllventile, Zentrifugen, Verdampfer oder Plattenerhitzer Infektionsquellen sein. Beim Abfüllen der Säfte können diese mit Mikroorganismen aus Leitungen und Geräten belastet werden. Eine Verkeimung kann auch durch mangelhaft gereinigte Flaschen und Flaschenverschlüsse erfolgen. Bei erhöhten Temperaturen kommt es zu einer schnellen Vermehrung der Mikroorganismen und somit zum Verderb des Saftes.

Kurze Verweilzeiten, niedrige Verarbeitungstemperaturen und gründliche Reinigung und Desinfektion sowie die Einhaltung der Hygienevorschriften durch das Personal sind daher unbedingt notwendig um die Keimzahlen möglichst gering zu halten (ebd., S. 523f).

2.2 *Alicyclobacillus* spp.

Wie bereits in Kapitel 2.1.2 erwähnt, gehören zu den getränkeschädigenden Mikroorganismen die aeroben Sporenbildner.

Ein Fruchtsaftverderb wird häufig ausgelöst durch die aeroben Sporenbildner der Gattung *Alicyclobacillus* spp.

Zur Gattung *Alicyclobacillus* spp. gehören die Spezies: *Alicyclobacillus* (A.) *acidiphilus*, *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius*, *A. cycloheptanicus*, *A. disulfidooxydans*, *A. herbarius*, *A. hesperidum*, *A. pomorum*, *A. sendaiensis*, *A. tolerans* und *A. vulcanalais* (Baumgart, J., 2008, S. 44z9).

2.2.1 Eigenschaften

Morphologische Merkmale:

Vegetative Zellen der Gattung *Alicyclobacillus* spp. sind bewegliche Stäbchen mit elliptischen Endosporen, welche durchschnittlich 0,7µm – 1µm breit und 3µm – 5µm lang sind. Die Sporenposition ist terminal oder subterminal. Abhängig von der Spezies sind die Sporangien geschwollen.

Die Anordnung der Zellen zu Ketten erfolgt selten. Die Zellen sind gram-positiv bis gram-variabel.

Die Größe der Bakterienkolonien ist abhängig vom Wachstumsmedium und erreicht beispielsweise auf YSG-Agar bei optimalen Temperaturen zwischen 2mm – 5mm, unter der Agaroberfläche aufgrund des niedrigen Sauerstoffgehalts 0,5mm – 1mm. Die Form der gebildeten Kolonien ist meist rund. Die Farbe der Kolonien variiert zwischen weiß und beige und wird zunehmend dunkler, je länger die Bebrütungsdauer (Yokota, A. et al., 2007, S. 13).

Abbildung 4 zeigt die morphologischen Merkmale verschiedener Spezies der Gattung *Alicyclobacillus* spp.

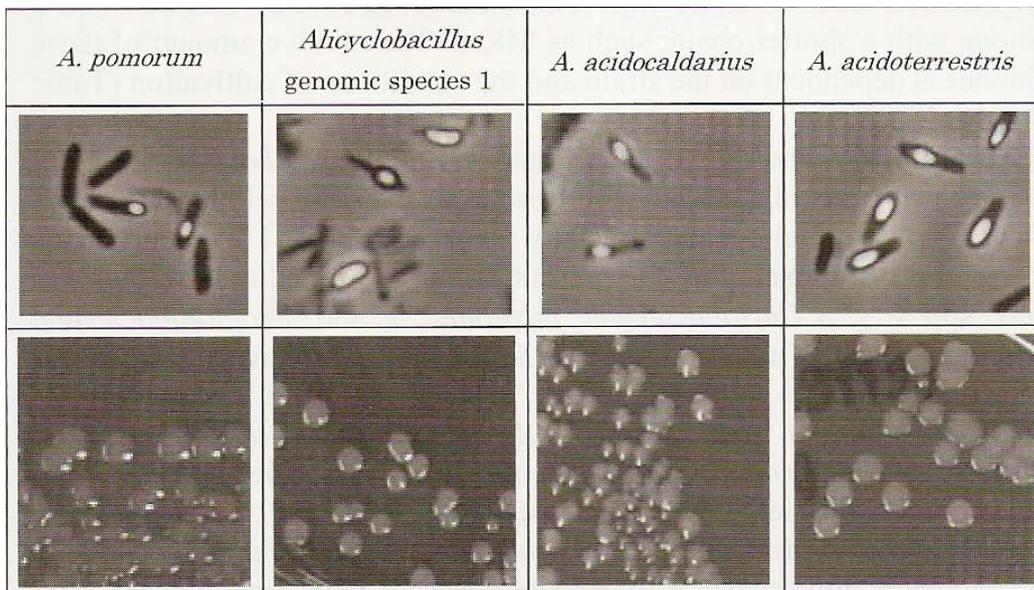


Abb. 4: Morphologische Merkmale von *Alicyclobacillus* spp.
(Quelle: Yokota, A. et al., 2007, S. 13)

Physiologische und biochemische Merkmale:

Die Gattung *Alicyclobacillus* spp. gehört zu den apathogenen, strikt aeroben, acidophilen und thermophilen Organismen.

Sie vermehren sich im Temperaturbereich zwischen 20 °C - 70 °C und haben ihr Wachstumsoptimum bei 40 °C - 60 °C. Da sie zu den acidophilen Sporenbildnern gehören, sind sie in der Lage sich bei pH-Werten zwischen 2,0 – 6,0 zu vermehren. Das pH-Optimum liegt zwischen 3,5 - 4,5 (Yokota, A. et al., 2007, S. 14f).

Alicyclobazillen gehören zur Gruppe der obligat aeroben Organismen. Abhängig von der Spezies reichen jedoch Sauerstoffmengen von 0,1% aus, um Zellwachstum hervorzurufen. Zudem sind vegetative Zellen in der Lage unter Sauerstoffabschluss zu sporulieren (ebd., S. 21).

Die Sporen sind hitzeresistent und überleben den normalen Pasteurisationsprozess der Saffherstellung. Aus diesem Grund ist auch in pasteurisierten Getränken mit dem Vorkommen zu rechnen. Wenn Säuregehalt und Temperaturen dies zulassen, können die Sporen auskeimen und einen Saftverderb hervorrufen (ebd., S 24f).

Typisch für den Genus *Alicyclobacillus spp.* ist die Bildung zwei verschiedener ω -alicyclischer Fettsäuren in den Membranen: ω -Cyclohexyl bzw. ω -Cycloheptyl. Diese Fettsäuren treten nur selten auf und wurden nur in wenigen Bakterienkulturen nachgewiesen. Die Anwesenheit dieser ω -alicyclischen Fettsäuren erleichtert den Bakterien das Überleben unter acidophilen und termophilen Bedingungen (ebd., S. 14).

2.2.2 Vorkommen und Bedeutung

Die Sporenbildner der Gattung *Alicyclobacillus spp.* kommen vorwiegend in heißen Quellen sowie im Erdboden vor. Bei der Ernte können die Bakterien über den Staub an die Oberfläche von Früchten gelangen und somit die Ursache für den Verderb von Fruchtsäften, Fruchtsaftkonzentraten oder alkoholfreien Erfrischungsgetränken mit Fruchtzusatz sein (Baumgart, J., 2004, S. 184).

A. acidocaldarius, *A. cycloheptanicus* und *A. acidophilus* sind die Arten, die einen Verderb verursachen können. Die größte Bedeutung für die Fruchtsaftindustrie hat jedoch *A. acidoterrestris*. Diese Spezies wurde erstmals in den 80er Jahren mit dem Verderb von pasteurisierten Fruchtsäften in Verbindung gebracht und erlangte eine bedeutende Rolle für die Hersteller von Fruchtsaftgetränken (Yokota, A. et al., 2007, S. 6).

Weltweit wurde diese Spezies aus zahlreichen Getränkerohstoffen und Säften, wie beispielsweise Traubensaft, Apfelsaft, Tomatensaft, Citrussäften sowie Eistee, isoliert. In Deutschland wurde dieser Verderber hauptsächlich in Apfelsaftkonzentraten und pasteurisiertem Apfelsaft nachgewiesen (Baumgart, J., 2004, S. 184).

Ein Verderb der Produkte äußert sich durch einen fremdartig chemisch-phenolischen Geruch und Geschmack. Dieser wird hervorgerufen durch die Bildung der Stoffwechselprodukte Guajakol, 2,6-Dibromphenol und 2,6-Dichlorphenol (Yokota, A. et al., 2007, S. 37).

Die Strukturformeln dieser Verbindungen sind in Abbildung 5 dargestellt.



Abb. 5: Strukturformeln der Geruchskomponenten
(Quelle: Yokota, A. et al., 2007, S. 37)

Guajakol ist die signifikanteste Komponente. Es ist charakterisiert durch einen sauren und rauchig-medizinischen Geruch. Bereits geringste Mengen sind sensorisch wahrnehmbar, denn die Aromaschwelle liegt bei 1ppb Guajakol in Wasser bzw. 10ppb Guajakol in Orangensaft. 2,6-Dibromphenol und 2,6-Dichlorphenol verursachen ebenfalls diesen „medizinischen“ Geruch. Die Aromaschwellen liegen hier bei 0,5ng/L bzw. 6,2ng/L (Yokota, A. et al., 2007, S. 37ff).

Voraussetzung für die Bildung dieser Komponenten ist das Vorhandensein von Sauerstoff (ca. 3,2mg/l), pH-Werte zwischen 3,0 und 5,0 sowie eine Lagertemperatur von über 25°C (Schobinger, U., 2001, S. 511). Aus diesem Grund haben Alicyclobazillen vor allem in tropischen Ländern große Bedeutung, können jedoch auch bei uns zu Problemen führen, wenn Getränke nach der Heißabfüllung für längere Zeit hohen Temperaturen ausgesetzt sind (Back, W., 2008, S. 107).

Eine große Herausforderung für die Fruchtsaftindustrie ist, wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, die Hitzeresistenz der Sporen.

Wie in Tabelle 4 dargestellt, beträgt der $D_{85^{\circ}\text{C}}$ -Wert in Orangensaftkonzentraten je nach Stamm 60,8min – 94,5min. Der $D_{90^{\circ}\text{C}}$ Wert liegt bei 10,0min – 12,0min und der $D_{95^{\circ}\text{C}}$ -Wert beträgt 2,5min – 8,7min. Somit reichen die handelsüblichen Pasteurisationsprozesse von 90°C – 95°C für 15s – 20s nicht aus, um die Sporen abzutöten (Yokota, A. et al., 2007, S. 25).

In alkoholhaltigen Getränken mit einem Alkoholgehalt von mindestens 6% keimen die Sporen jedoch nicht aus (ebd., S. 23).

Tab. 4: Hitzeresistenz von Alicyclobacillus-Sporen in Orangensaftkonzentrat

Strain	D-value (min)			z-value (°C)
	85 °C	90 °C	95 °C	
No.46*	60.8	10.0	2.5	7.2
No.70*	67.3	15.6	8.7	11.3
No.145*	94.5	20.6	3.8	7.2
DSM2498	50.0	16.9	2.7	7.9

(Quelle: Yokota, A. et al., 2007, S. 25)

Ein weiteres bedeutendes Problem für die Fruchtsaftindustrie ist der nicht sichtbare Verderb der Produkte. *A. acidoterrestris* produziert während des Wachstums kein Gas. Somit kann ein verkaufsfertiges Produkt während der Lagerung un bemerkt verderben, da es nicht zur Bombage des Behältnisses kommt. Den hervorgerufenen „Off-Flavour“ bemerkt der Verbraucher erst nach dem Öffnen der Packung (Maldonado, M.C. et al., 2008, S. 141ff).

Aufgrund dieser Tatsache ist es unbedingt notwendig, dass die Hersteller von Fruchtsaftgetränken ihre Produkte regelmäßig kontrollieren lassen, um eine Verkehrsfähigkeit der Säfte zu garantieren und die Zufriedenheit der Kunden nicht zu beeinträchtigen.

2.2.3 Untersuchungsmethoden

Durch Filtrationen oder Anreicherungen mittels geeigneter Selektivmedien unter Beachtung bestimmter Inkubationsbedingungen wird der Nachweis von *Alicyclobacillus spp.* ermöglicht.

Dabei ist es wichtig, zwischen filtrierbaren und nicht filtrierbaren Produkten zu unterscheiden. Bei der Filtrationsmethode würden beispielsweise feste Bestandteile in den zu untersuchenden Säften zur Verstopfung der Filter führen. Eine Filtration ist somit nicht möglich.

Die IFU-Methode Nr. 12 (Internationale Fruchtsaft Union) unterscheidet folgende Routineverfahren:

1. Presence-Absence-Test:

Dieses Verfahren wird hauptsächlich für nicht filtrierbare Produkte verwendet. Bei dieser Methode werden mindestens 10g des Produktes in 90ml BAT-Anreicherungsbouillon für *Alicyclobacillus spp.* angereichert. Dazu sollte nach Möglichkeit ein Weithalskolben verwendet werden, da es sich um obligat aerobe Organismen handelt. Um vegetative Zellen zu deaktivieren und die Sporenbildner zu aktivieren wird die Probe erhitzt. Dazu wird die Anreicherung in einem 80°C heißen Wasserbad für 10min erwärmt und anschließend in einem kalten Wasserbad schnellstmöglich auf ca. 45°C abgekühlt. Die Anreicherungsbouillon wird bei 45±1°C für sieben Tage bebrütet. Anschließend erfolgt ein Ösenausstrich auf BAT-Agar (pH 4,0) und auf neutralem PC-Agar (pH 7,0). Diese Medien werden ebenfalls bei 45±1°C für weitere drei - fünf Tage inkubiert. Zum Schutz vor Austrocknung sollten die Petrischalen in einer Plastiktüte verpackt werden. Die Petrischalen werden täglich auf Wachstum überprüft.

Erfolgt innerhalb von fünf Tagen ein Wachstum auf BAT-Agar, jedoch nicht auf PC-Agar, gilt die Probe als *Alicyclobacillus spp.* positiv (IFU-Method No. 12, Jan. 2004/Feb. 2006, S. 2f).

Angabe des Ergebnisses - qualitativ: *positiv/10g bzw. negativ/10g*

Ein positives Ergebnis gibt jedoch keine Auskunft, um welche Spezies der Gattung *Alicyclobacillus spp.* es sich genau handelt.

2. Membranfiltration:

Diese Methode kann nur bei filtrierbaren Flüssigkeiten angewendet werden. Bei diesem Verfahren werden üblicherweise 100ml der erhitzten Probe bzw. 10ml Konzentrat (1:10 Verdünnung mit A. dest.) über einen sterilen Filter mit einem Porendurchmesser von 0,45µm filtriert. Sollten in der Probe Bakterien vorhanden sein, befinden sich diese nach der Filtration auf dem entsprechenden Filterpapier. Die Filtermembran wird anschließend auf eine Petrischale mit BAT-Agar gelegt und bei 45±1 °C für drei - fünf Tage bebrütet. Sichtbare Kolonien können nach der Inkubationszeit ausgezählt werden.

Zur Bestätigung erfolgt auch hier ein Ösenausstrich auf BAT-Agar (pH 4,0) und neutralem PC-Agar (pH 7,0) und eine Bebrütung dieser Medien bei 45±1 °C für weitere drei - fünf Tage.

Erfolgt innerhalb von fünf Tagen ein Wachstum auf BAT-Agar, jedoch nicht auf PC-Agar, gilt die Probe als *Alicyclobacillus spp.* positiv (IFU-Method No. 12, Jan. 2004/Feb. 2006, S. 2f).

Angabe des Ergebnisses - quantitativ: *KbE/10g bzw. <1/10g*

Auch ein Ergebnis >1/10g sagt nicht aus, ob es sich tatsächlich um die Alicyclobazillen handelt, die den „Off-Flavour“ hervorrufen.

3. Spatelverfahren:

Auch diese Methode wird mit einer vorher erhitzten (80 °C, 10min, Kühlung auf ca. 45 °C) Probe durchgeführt. Es werden von einer 1:10 Verdünnung mit physikalischer Kochsalzlösung 0,1ml auf BAT-Medium gegeben und mit einem sterilen Spatel ausgespatelt. Die Bebrütung der BAT-Platten erfolgt bei 45±1 °C für zwei - fünf Tage.

Zur Bestätigung, ob es sich tatsächlich um *Alicyclobacillus spp.* handelt, werden verdächtige Kolonien auf BAT-Agar (pH 4,0) und neutralem PC-Agar (pH 7,0) ausgestrichen und bei 45 ± 1 °C für zwei - fünf Tage bebrütet.

Auf PC-Agar erfolgt auch hier keine Vermehrung der Gattung *Alicyclobacillus spp.* (IFU-Method No. 12, Sept. 2004, S. 4).

4. Peroxidase-Test zum Nachweis der Guajakol-Produktion:

Der Guajakol-Nachweis ist ein biochemischer Test zum Nachweis der *Alicyclobacillus*-Stämme mit besonderem Potential zur Getränkeschädigung. Auch dieser Test ist Bestandteil der IFU-Methode Nr. 12 (Sept. 2004).

Durch die oben beschriebenen, klassischen Untersuchungsmethoden mit BAT-Anreicherungsbouillon und BAT-Agar kann nur die gesamte Gruppe der *Alicyclobacillus*-Bakterien nachgewiesen werden. Der Guajakol-Test ermöglicht es, die Bakterien der Gattung *Alicyclobacillus spp.* hinsichtlich ihres Gefährdungspotentials zu differenzieren.

Das Testprinzip beruht auf einer enzymatischen Reaktion, bei welcher der farblose Stoff Guajakol in einen braun gefärbten Komplex umgewandelt wird. Anschließend ist eine einfache visuelle Auswertung möglich.

Zur Durchführung des Tests wird eine ausreichende Menge der zu untersuchenden Kolonien mit einer sterilen Impföse in BAT-IB (auf Basis BAT-Bouillon) suspendiert und für mindestens drei Stunden bei 45 ± 1 °C inkubiert. Anschließend werden 1mL Pufferlösung, 20µl Wasserstoffperoxid und 20µl Enzymlösung zugegeben. Die Testlösung wird gut gemischt und bei Raumtemperatur 5min – 10min stehen gelassen. Sofern eine deutliche Braunfärbung der Testlösung im Vergleich zur Negativkontrolle sichtbar ist, liegen getränkeschädigende Bakterien mit hohem Potential zur Fehlromabildung vor. Sollte der Farbwechsel nicht eindeutig sein, muss eine weitere Inkubation von 24 Stunden erfolgen (Fa. Döhler GmbH, Sept. 2006).

Da die beschriebenen kulturellen Untersuchungsmethoden einen hohen Zeitaufwand (bis zu zwölf Tage) erfordern und der Zeitfaktor eine immer größere Rolle spielt, ist es wichtig, geeignete Alternativen zu finden.

Die A.I.J.N. (Association of the Industries of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Union) empfiehlt hier unter anderem die Methode der real-time PCR. Dieses Verfahren liefert ein Untersuchungsergebnis innerhalb weniger Stunden (A.I.J.N., 2008, S. 24).

Im nachfolgenden Kapitel wird das Verfahren der PCR genauer erläutert.

2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR (engl. polymerase chain reaction) ist eine *in vitro* Technik, die es ermöglicht, vielfache Kopien einer spezifischen Nukleotidsequenz eines bestimmten Organismus herzustellen. Das Ziel der PCR ist es, bestimmte Sequenzen der DNA eines Zielorganismus zu vervielfältigen, um ausreichend Material zur Analyse und Sequenzierung zu gewinnen (Clark, D. P., 2006, S. 635).

Diese Methode wurde von Kary Mullis entwickelt und erstmals 1985 durch die Cetus Corporation von R. Saiki et al. in *Science* publiziert (Saiki, R. et al., 1985, S. 1350ff).

Die PCR wird heute vor allem für klinische Diagnostik, genetische und biologische Forschung und kriminaltechnische Analysen verwendet (Clark, D. P., 2006, S. 635).

2.3.1 Die Struktur der DNA

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist ein in allen Lebewesen vorkommendes Biomolekül und Träger der Erbanlagen.

Chemisch gesehen ist die DNA eine Nukleinsäure, deren Einzelbausteine die Nukleotide sind. Jedes Nukleotid hat drei Bestandteile: den Zucker Desoxyribose, Phosphorsäure und eine der vier organischen Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T). Die Reihenfolge der vier Basen hat große Bedeutung für die genetischen Informationen. Man nennt diese Reihenfolge der Basen Basensequenz (Renneberg, R., 2006, S 50).

Die Desoxyribose- und Phosphoreinheiten sind bei jedem Nukleotid gleich. Sie bilden das Rückgrat des Moleküls. Das Zuckermolekül ist ein Pentosering. Es trägt am 3'-C-Atom eine Hydroxylgruppe, das 5'-C-Atom ist Teil einer Methylgruppe. Das 3'-C-Atom und das 5'-C-Atom sind die Bindungsstellen für die Phosphatgruppen (Roche Diagnostics GmbH, 1998, S. 10).

Jeweils zwei Einzelstränge der DNA sind zu einer Doppelhelix gewunden. Diese werden durch Wasserstoffbrückenbindungen gehalten, welche zwischen den gegenüberliegenden Basen wirken. Thymin bindet immer mit Adenin über zwei Wasserstoffbrücken und Guanin mit Cytosin über drei Wasserstoffbrücken (Reneberg, R., 2006, S 50).

Die nachfolgende Abbildung verdeutlicht den Aufbau der DNA.

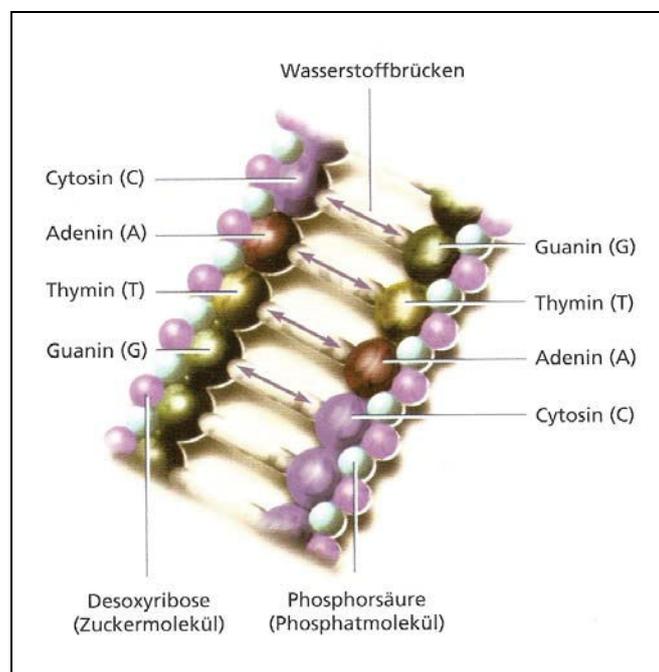


Abb. 6: Die Struktur der DNA
(Quelle: Roche Diagnostics GmbH, 1998, S.11)

2.3.2 Das Reaktionsprinzip der PCR

Die gesamte Reaktion der PCR verläuft in drei Teilschritten mit jeweils unterschiedlichen Temperaturen, die ständig wiederholt werden. Zuerst wird die DNA-Doppelhelix in die beiden Einzelstränge aufgetrennt. Anschließend werden so genannte Primer an die Zielsequenz angelagert und schließlich wird durch ein spezielles Enzym, der Taq DNA-Polymerase, der neue DNA-Doppelstrang synthetisiert. Dieser neue DNA-Strang dient im nächsten Zyklus wieder als Vorlage für

die Synthese (Mackay, I. M., 2007, S. 2f). Diesen Vorgang bezeichnet man als Kettenreaktion. Somit verdoppelt sich nach jedem Zyklus die Menge der Ziel-DNA. Nach ca. 30 bis 40 Zyklen verfügt man über genügend Material um einen Nachweis der gesuchten DNA durchführen zu können (Roche Diagnostics GmbH, 1998, S. 13ff).

2.3.3 Die Teilschritte der PCR

1. Schritt: Denaturierung

Der erste Teilschritt der PCR ist die Aufspaltung des DNA-Doppelstrangs in zwei Einzelstränge. Dies erfolgt bei Temperaturen von 94°C (Mülhardt, C., 2006, S. 80ff). Zwischen den Phosphatgruppen und der Desoxyribose herrschen starke kovalente Bindungen, die den hohen Temperaturen standhalten. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den organischen Basen brechen jedoch bei hohen Temperaturen auf, sodass die beiden Einzelstränge entstehen (Roche Diagnostics GmbH, 1998, S. 13).

2. Schritt: Annealing

Dieser Prozess findet bei Temperaturen von 50°C - 60°C statt. Hierbei werden zur Zielsequenz komplementäre Primer an die DNA-Einzelstränge angelagert. Diese Primer sind synthetische Oligonukleotide mit 15 – 20 Basen. Da es sich bei der DNA um zwei homologe Stränge handelt, die über die Basenpaarung A-T und G-C zusammengehalten werden, braucht man zwei Primer - auf jedem Strang einen. (Clark, D. P., 2006, S. 638). Sie haben die Aufgabe, den Beginn und das Ende der Zielsequenz zu markieren. Die Primer besitzen ein biotinmarkiertes 5'-Ende, welches sich an das 3'-Ende der Zielsequenz anlagert. Durch die Bindung der Primer wird somit der Startpunkt für das Enzym Polymerase festgelegt (Roche Diagnostics GmbH, 1998, S. 14).

3. Schritt: Elongation

Wenn die Primer an die DNA gebunden sind, wird die Temperatur auf 72°C erhöht. Das ist das Temperaturoptimum der Taq DNA-Polymerase (Mülhardt, C., 2006, S. 80). Die Taq DNA-Polymerase ist ein Enzym, welches aus dem hitzestabilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus* isoliert wird. Diese Polymerase besitzt eine 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität (ebd., S. 88). Die Polymerase verlängert nun die Primer, indem sie die komplementären Nukelotide aneinanderfügt. Die Verlängerung beginnt jeweils am 3'-Ende der Primer. Somit erhält man zwei neue DNA-Doppelstränge, die mit der DNA-Zielsequenz identisch sind (Roche Diagnostics GmbH, 1998, S. 15).

In Abbildung 7 werden die Teilschritte der PCR vereinfacht dargestellt.

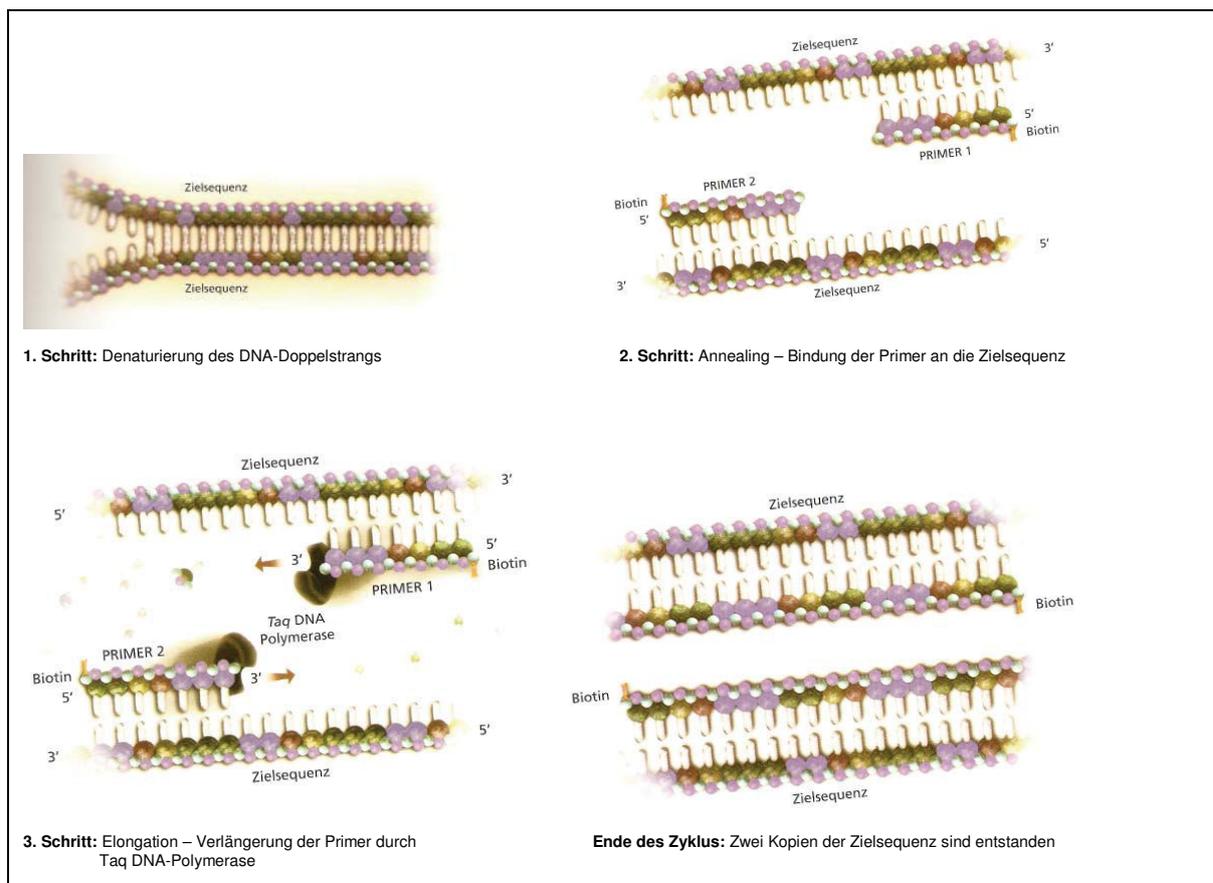


Abb. 7: Die Teilschritte der PCR

(Quelle: Roche Diagnostics GmbH, 1998, S. 13ff); leicht modifiziert

Während einer PCR für *Alicyclobacillus spp.* binden spezifische Primer an die aus der Probe isolierte DNA. Wenn *Alicyclobacillus*-DNA vorhanden ist, wird diese während der Kettenreaktion vervielfältigt und kann somit nachgewiesen werden. Die Mindestzellzahl für dieses Verfahren wird von der A.I.J.N. auf 100KbE pro ml Probe geschätzt. Aus diesem Grund ist eine Voranreicherung und Inkubation der Anreicherungsmedien erforderlich (A.I.J.N., 2008, S. 24).

Die Ermittlung der Nachweisgrenze der Polymerase-Kettenreaktion für *Alicyclobacillus spp.* und der Vergleich dieses Verfahrens zur IFU-Methode Nr. 12 sind Teil der Praktischen Arbeit.

3 Praktischer Teil

In diesem Kapitel wird die praktische Vorgehensweise im Labor, einschließlich der angewandten Untersuchungsmethoden und verwendeten Materialien beschrieben.

3.1 Begriffsbestimmung

Referenzverfahren

Das Referenzverfahren ist ein international anerkanntes und akzeptiertes Verfahren (DIN EN ISO 16140:2003, S. 6).

Alternatives Verfahren

Das alternative Verfahren ist ein Analyseverfahren, das bei einer bestimmten Kategorie von Produkten den gleichen Analyt nachweist, wie das Referenzverfahren (DIN EN ISO 16140:2003, S. 5).

Qualitatives Verfahren

Das qualitative Verfahren ist ein Analyseverfahren, aus dem sich das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein eines Analyten ergibt, der in einer bestimmten Probenmenge indirekt oder direkt nachgewiesen werden kann (DIN EN ISO 16140:2003, S. 6).

Quantitatives Verfahren

Das quantitative Verfahren ist ein Analyseverfahren, aus dem sich die Menge des Analyten ergibt, der in einer bestimmten Probenmenge indirekt oder direkt nachgewiesen werden kann (DIN EN ISO 16140:2003, S. 6).

Validierung eines alternativen Verfahrens

Bei der Validierung eines alternativen Verfahrens geht es darum, einen ausreichenden Vertrauensnachweis dafür zu liefern, dass mittels alternativer Verfahren erzielte Ergebnisse mit denen durch das Referenzverfahren gewonnenen Ergebnissen vergleichbar sind (DIN EN ISO 16140:2003, S. 6).

Verfahrensvergleichsuntersuchung

Die Verfahrensvergleichsuntersuchung ist eine Untersuchung des alternativen Verfahrens im Vergleich zum Referenzverfahren (EN ISO 16140:2003, S. 5).

3.2 Arbeitsvorschrift für die Validierung qualitativer Verfahren

Die Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Verfahren auf dem Gebiet der mikrobiologischen Untersuchung von Lebensmitteln und Futtermitteln (DIN EN ISO 16140:2003) schreibt für die Validierung eines mikrobiologischen, qualitativen Verfahrens die Untersuchung von 60 Proben jeder Lebensmittelkategorie vor. Diese Proben müssen mit dem nachzuweisenden Analyt, mit möglichst geringen Keimzahlen, kontaminiert sein.

Um mindestens 60 Gesamtergebnisse mit jedem Verfahren zu erzielen, müssen die Proben jeweils mit dem Referenzverfahren sowie mit dem vorgeschlagenen Alternativverfahren untersucht werden.

Wenn bei beiden Verfahren der erste Untersuchungsschritt gleich ist, wie beispielsweise in diesem Fall die Voranreicherungsbouillon, wird die Doppeluntersuchung vom zweiten Untersuchungsschritt an durchgeführt.

Die Untersuchungsdaten aus dem Referenzverfahren und dem Alternativverfahren werden anschließend in einer Tabelle erfasst und es erfolgt die statistische Berechnung und Auswertung der Ergebnisse (DIN EN ISO 16140:2003, S. 8f).

3.3 Material

3.3.1 Probenmaterial

Bei dem Probenmaterial handelt es sich um verschiedene mit *Alicyclobacillus spp.* „natürlich“ kontaminierte Apfel- und Birnensaftkonzentrate unterschiedlicher Produzenten. Diese wurden von GfL (Gesellschaft für Lebensmittelforschung GmbH, Landgrafenstraße 16, 10787 Berlin) zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um Rückstellmuster marktfähiger Proben.

Von den verwendeten Saftkonzentraten lagen bereits quantitative Ergebnisse vor, die vor der Validierung nochmals überprüft wurden.

Bei den Proben handelt es sich ausschließlich um filtrierbare Produkte. Nicht filtrierbare Produkte sind für die Validierung der Methodenvergleiche nicht geeignet, da die Animpfkonzentrationen bekannt sein müssen. Die Anzahl an *Alicyclobacillus spp.* kann zwar auch aus nicht filtrierbaren Produkten ermittelt werden, jedoch können hier aus methodischen Gründen Keimgehalte $< 100 \text{KbE} / \text{mL}$ nicht ermittelt werden.

Die Proben weisen unterschiedliche Lagerzeiten auf.

Um die DIN EN ISO 16140:2003 zu befolgen, wurden 60 mit *Alicyclobacillus spp.* „natürlich“ kontaminierte Saftkonzentrat-Proben mit dem qualitativen Verfahren der IFU-Methode Nr. 12 und mittels real-time PCR für *Alicyclobacillus spp.* untersucht.

3.3.2 Bakterienstämme

Für die Beimpfungsversuche zur Festlegung der Nachweisgrenze der PCR sowie für die Positivkontrolle in der PCR wurde der Bakterienstamm *A. acidoterrestris* ATCC Nr. 49025 verwendet. Durch regelmäßiges Ausstreichen auf frischem BAT-Agar wurde gewährleistet, dass die Arbeitskulturen für jeden Versuch „frisch“ waren.

3.3.3 Nährmedien und Reagenzien

Nachfolgend werden die für die kulturellen Methoden sowie für die real-time PCR verwendeten Nährmedien und Reagenzien aufgeführt und es wird die Zusammensetzung der Medien beschrieben.

Nährmedien und Reagenzien für die kulturellen Methoden

- BAT-Anreicherungsbouillon (Fa. Döhler GmbH)
- BAT-Agar (LADR GmbH)
- PC-Agar (Heipha Dr. Müller GmbH)
- Mc Farland-Lösung 0,5 (bio Merieux)
- NaCl-Verdünnungslösung (LADR GmbH)

Zusammensetzung und Herstellung des BAT-Mediums

A.	CaCl ₂ x H ₂ O	0,25 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,50 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,20 g
	KH ₂ PO ₄	3,00 g
	Hefeextrakt	2,00 g
	Glucose	5,00 g
	Spurenelementlösung	1,00 mL
	A. dest	500 mL

Den pH-Wert mit 1 N H₂SO₄ oder 1 N NaOH auf 4,0 einstellen, anschließend für 15 min bei 121 °C autoklavieren und auf 50 °C abkühlen lassen.

B.	Agar	15-20 g
	A. dest	500 mL

Autoklavieren (15 min bei 121 °C) und abkühlen lassen auf 50 °C.

C. Spurenelementlösung

CaCl ₂ x H ₂ O	0,66 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,16 g
MnSO ₄ x H ₂ O	0,15 g
CoCl ₂ x 5 H ₂ O	0,18 g
H ₃ BO ₃	0,10 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,30 g
A. dest	1000 mL

Die Spurenelementlösung autoklavieren und im Kühlschrank aufbewahren.

Aseptisch gleiche Volumina von A und B mischen und in sterile Petrischalen ausgießen. (IFU-Method No. 12, Jan. 2004/Feb. 2006, S. 6)

BAT-Agar sowie BAT-Bouillon sind Selektivnährmedien zum Nachweis von *Alicyclobacillus spp.* Der niedrige pH-Wert in Kombination mit den hohen Inkubationstemperaturen hemmt das Wachstum der Begleitflora. Alicyclobazillen sind jedoch in der Lage, diese Kulturbedingungen optimal für ihr Wachstum zu nutzen.

Zusammensetzung PC-Agar

Caseinpepton	5,00 g
Hefeextrakt	2,50 g
Glucose	1,00 g
Agar	9,00 g
Leitungswasser	1000 mL
pH-Wert	7,0 ± 0,2

Den Agar für 15min bei 121 °C autoklavieren und abkühlen lassen (Oxoid Handbuch, S. 263).

PC-Agar ist ein neutrales Nährmedium, welches hauptsächlich zur Bestimmung der mesophilen, aeroben Keimzahl in Milchprodukten, Wasser und diversen Lebensmitteln verwendet wird (Oxoid Handbuch, S. 263).

Reagenzien für die Durchführung der real-time PCR

Isolierung und Reinigung der DNA

Die verwendeten Reagenzien sind Bestandteil des *High-Pure PCR Template Preparation Kit*, der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim.

Im Kit enthalten sind:

- Proteinase K
(als Lyophilisat zum Auflösen in 4,5ml doppelt destilliertem Wasser)
- Binding Buffer (Bindungspuffer)
(6M guanidine-HCl, 10mM urea, 10mM Tris-HCl, 20% Triton-X-100, pH 4,4 bei 25°C)
- Inhibitor Removal Buffer (Entfernungspuffer)
(5M guanidine-HCl, 20mM Tris-HCl, pH 6,6 bei 25°C; Endkonzentration nach Zugabe von 20mL Ethanol)
- Wash Buffer (Waschpuffer)
(20mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7,5 bei 25°C; Endkonzentration nach Zugabe von 80mL Ethanol)
- Elution Buffer (Elutionspuffer)
(10mM Tris-HCl, pH 8,5 bei 25°C; vor Gebrauch auf 70°C erwärmen)

Weiterhin wurde benötigt:

- Ethanol
- Isopropanol (100%)

Amplifikation der DNA

Die verwendeten Reagenzien wurden von der Firma Roche Diagnostics GmbH aus Mannheim bezogen und sind Bestandteil des *Light Cycler Taq Man Master Kit*.

Im Kit enthalten sind:

- Light Cycler Taq Man Master H₂O PCR-grade
- Light Cycler Taq Man Master 5xconc. Master Mix
(enthält: FastStart Taq DNA Polymerase, reaction buffer (PCR-Puffer), MgCl₂, dNTP-Mix)

Zusätzlich wurden die entsprechenden Primer benötigt.

Es wurden die von der Firma Metabion nach einer Veröffentlichung von Christopher J. Connor et al. im „*International Journal of Food Microbiology*“, 2005, für die LADR GmbH hergestellten Primer CC16S-F und CC16S-R sowie die CC16S-Probe eingesetzt. Die Primer eignen sich zur Amplifikation der DNA von *Alicyclobacillus spp.* (Connor, C.J. et al., 2005, S. 231ff).

- Primer CC16S-F (Metabion)
Sequenz: 5´-CGT AGT TCG GAT TGC AGGC-3´
- Primer CC16S-R (Metabion)
Sequenz: 5´-GTG TTG CCG ACT CTC GTG-3´
- Probe CC16S (Metabion)
Sequenz: 5´-CGG AAT TGC TAG TAA TCGC-3´

3.3.4 Geräte, Hilfsmittel und Chemikalien

In diesem Abschnitt werden alle Geräte, Hilfsmittel und Chemikalien aufgeführt, die für den Nachweis von *Alicyclobacillus spp.* mittels kultureller Methoden und real-time PCR benötigt wurden.

Geräte

- Kühlschrank 5 °C (Liebherr profiline)
- Waage (AND EK-2000)
- Wasserbad 80 °C (GFL)
- Wasserbad 45 °C (GFL)
- Brutschrank 45 °C (Memmert)
- Filtrationsanlage (Faster BHA 36)
 - Dreifach-Absaugvorrichtung
 - Absaug-Pumpe
 - 100mL-Aufsatz
 - Filtermembran
 - Silikon-Flachringe
- Vortexer Genius 3 (IKA)
- Vortexer (Jahnke + Kunkel IKA Labortechnik VF2)
- Heizblock (Techne DRI-Block DB-2D)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf)
- Zentrifuge 5417C (Eppendorf)
- Zentrifuge LC Carousel Centrifuge 2.0 (Roche)
- Light Cycler 2.0 (Roche)

Hilfsmittel

- Filterpapier Porendurchmesser 0,45µm (Whatmann GmbH)
- Erlenmeyerkolben 250mL (Borosilicatglas)
- Falconröhrchen 50mL (Sarstedt)
- sterile Pinzette
- Bunsenbrenner/Gaskartusche (Labogaz 206)
- Spezial Vernichtungsbeutel 200x300x0,5mm, autoklavierbar (Nerbe plus)
- Sterile Impfösen (Intermed Service Spezial)
- Sterile Pipetten (10mL) (VWR)
- Sterile Plattierungsspatel (VWR)
- Reagenzglasständer
- Pipettierhilfe (IUL)
- Zählstift
- Lupe
- Reaktionsgefäßständer (Roth, Sarstedt)
- Collection Tubes (2mL) (Roche)
- High Pure Filter Tubes (700µL) (Roche)
- Eppendorftubes (1,5mL) (Eppendorf)
- Multipette (Eppendorf)
- Combitips plus (10µL, 50µL, 100µL, 250µL) (Eppendorf)
- Eppendorfpipette (10µL) (Eppendorf)
- Eppendorfpipette (100µL) (Eppendorf)
- Eppendorfpipette (1000µL) (Eppendorf)
- Pipettenspitzen-Biosphere Filter Tips (10µL) (Sarstedt)

- Pipettenspitzen-Biosphere Filter Tips (100 μ L) (Sarstedt)
- Pipettenspitzen-Biosphere Filter Tips (1000 μ L) (Sarstedt)
- Kühlblock (Roche)
- Glaskapillaren mit entsprechenden Verschlussklappen (20 μ L) (Roche)
- Latex-Handschuhe, puderfrei (Intermed Service Spezial)
- steriles A. dest. (LADR GmbH)

Chemikalien

- Ethanol (70%) zum Abflammen der Pinzette
- Händedesinfektionsmittel (Asepto Man)
- Instrumentendesinfektionslösung (Intermed Service Spezial)
- 0,05%ige Natriumhypochloridlösung für 2 Liter Desinfektionsbad

3.4 Methoden

3.4.1 Bestimmung der Animpfkonzentration von *Alicyclobacillus spp.*

Um sicher zu stellen, dass die mit dem Referenzverfahren sowie mit dem alternativen Verfahren zu untersuchenden Proben mit *Alicyclobacillus spp.* belastet sind, bzw. zur Ermittlung der Animpfkonzentration für die BAT-Anreicherungsbouillon wurde zu Beginn von jeder Probe der Keimgehalt von *Alicyclobacillus spp.* / 10g Probe durch Membranfiltration bestimmt.

Das quantitative Verfahren der Membranfiltration ist Bestandteil der IFU-Methode Nr. 12 und kann ausschließlich für filtrierbare Produkte angewendet werden. Es ist ein Analyseverfahren, aus dem sich die Menge an *Alicyclobacillus spp.* in einer bestimmten Probenmenge ergibt.

Nährmedium

- BAT-Agar (Zusammensetzung siehe 3.3.3)

Durchführung

- 10g der jeweiligen Saftkonzentrat-Probe in einen sterilen Erlenmeyerkolben einwiegen und mit 90mL sterilem A. dest verdünnen
- Verdünnung für 10min auf 80°C im Wasserbad erhitzen
- anschließend die Verdünnung schnell auf 45°C abkühlen

Membranfiltration

- sterile Silikon-Flachringe mit einer sterilen Pinzette auf die Filtriertische legen
- anschließend eine sterile Filterunterstützung (Fritte) mit einer sterilen Pinzette auf die Silikon-Flachringe auflegen

- das sterile Filterpapier (Porendurchmesser 0,45µm), mit dem Gitternetzaufdruck nach oben, auf die sterile Fritte legen
- den sterilen Filtrationsaufsatz (100mL) auf den Filtriertisch setzen und die Verschlussklammer schließen
- die Probenlösung nach mehrmaligem Schwenken vorsichtig in den Filtrationsaufsatz gießen
- Vakuumpumpe anschalten und Absperrhähne öffnen
- die Probe wird filtriert
- nach dem Abschalten der Pumpe die Verschlussklammern lösen und den Filtrationsaufsatz entnehmen
- nach der Filtration die Anlage mit Instrumentendesinfektions-Lösung, Alkohol und A. dest. reinigen

Bebrütung

- den Filter mit einer sterilen Pinzette am äußersten Rand fassen und mit der Probenschichtseite nach oben auf eine beschriftete Petrischale mit BAT-Agar legen (darauf achten, dass zwischen dem Filter und dem Nährboden keine Luftblasen entstehen)
- Bebrütung der Petrischalen bei 45 ± 1 °C für fünf Tage (um Austrocknung des Nährbodens zu verhindern, Petrischalen in einer Plastiktüte verpacken)

Auswertung

- Sollten in der Probe Alicyclobazillen vorhanden sein, befinden sich diese nach der Filtration auf dem Filterpapier.
- nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen sichtbare Kolonien mit Hilfe eines Zählstiftes und einer Lupe auszählen
- Ergebnisse dokumentieren

Abbildung 8 zeigt typische Filterkolonien von *Alicyclobacillus* spp. auf BAT-Agar

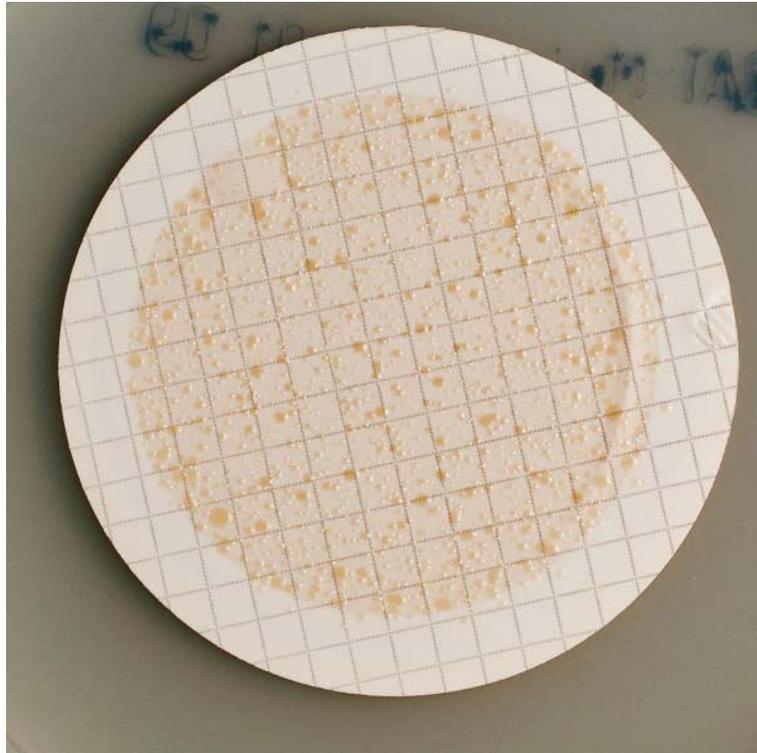


Abb. 8: Typische Filterkolonien von *Alicyclobacillus* spp. auf BAT-Agar

3.4.2 Qualitativer Nachweis von *Alicyclobacillus* spp. – IFU-Nr. 12

Das Verfahren zur Untersuchung auf Anwesenheit / Abwesenheit von *Alicyclobacillus* spp. gemäß IFU-Methode Nr. 12 wird für nicht filtrierbare Produkte angewendet. Zu den nicht filtrierbaren Proben zählen beispielsweise trübe Säfte, Säfte mit Fruchtfleischzusätzen oder hochviskose Produkte. Bei der Filtrationsmethode würden die festen Bestandteile in den zu untersuchenden Säften zur Verstopfung des Filters führen. Die Methode der Membranfiltration ist somit nicht möglich.

Bei diesem Methodenvergleich wurde die BAT-Anreicherungsbouillon für *Alicyclobacillus spp.* mit einer bekannten Konzentration von *Alicyclobacillus spp.* / 10g Probe beimpft. Die Animpfkonzentrationen wurden vor der Beimpfung durch Membranfiltration quantitativ bestimmt. (Abschnitt 3.4.1)

Nährmedien (siehe 3.3.3)

- BAT-Bouillon
- BAT-Agar
- PC-Agar

Durchführung

- 10g der jeweiligen Saftkonzentrat-Probe in einen sterilen Erlenmeyerkolben einwiegen und mit 90mL BAT-Anreicherungsbouillon für *Alicyclobacillus spp.* anreichern (1:10)
- Anreicherung für 10min auf 80°C im Wasserbad erhitzen
- anschließend die Anreicherung schnell auf 45°C abkühlen
- Bebrütung der Anreicherung bei 45±1 °C für sieben Tage



Abb. 9: Anreicherung von *Alicyclobacillus spp.* in BAT-Anreicherungsbouillon

- nach der Inkubation der Anreicherung mit einer sterilen Impföse einen Ösenausstrich aus der BAT-Bouillon auf BAT-Agar (pH 4,0) und neutralem PC-Agar (pH 7,0) vornehmen
- diese Medien für weitere drei – fünf Tage bei $45\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ bebrüten (um Austrocknung des Nährbodens zu verhindern, Petrischalen in einer Plastiktüte verpacken)

Auswertung

Erfolgt, wie in Abbildung 10 und 11 verdeutlicht, innerhalb von fünf Tagen ein Wachstum auf BAT-Agar, jedoch nicht auf PC-Agar, gilt die Probe als *Alicyclobacillus spp.* positiv.

Ein positives Ergebnis gibt jedoch keine Auskunft, um welche Spezies der Gattung *Alicyclobacillus spp.* es sich genau handelt. Eine zuverlässige Bestimmung der Spezies ist nur molekularbiologisch mittels 16S rRNA-Gensequenzierung möglich.



Abb. 10: Positiver Ösenausstrich auf BAT-Agar unter dem Licht des colony counter



Abb. 11: Negativer Ösenausstrich auf PC-Agar unter dem Licht des colony counter

3.4.3 Nachweis von *Alicyclobacillus* spp. – real-time PCR

Parallel zum Ösenausstrich aus der BAT-Anreicherungsbouillon auf BAT- und PC-Agar nach der kulturellen Methode der IFU-Nr. 12 (Abschnitt 3.4.2), wurde aus der BAT-Bouillon je 1 ml der Anreicherung in ein Eppendorftube (1,5mL) abgefüllt. Dies diente zur Durchführung der real-time PCR.



Abb. 12: Alicyclobazillen-Anreicherung in einem Eppendorftube

3.4.3.1 Isolierung und Reinigung der DNA

Zur Isolierung und Reinigung der DNA wurde das *High-Pure PCR Template Preparation Kit* für die Isolierung hochmolekularer Nukleinsäuren der Firma Roche Diagnostics, Mannheim verwendet. Die Lyse der Zellen erfolgte durch das Enzym Proteinase K bei einer Temperatur von 74°C. Zur Inaktivierung von Nukleasen wurde Guanidin-HCl verwendet (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Feb. 2008, S. 21). Das Isolationsprinzip beruht auf der selektiven Bindung der DNA an so genannte Anionenaustauschersäulen. Bei dieser Methode bindet die negativ geladene DNA an positiv geladene Gruppen des Säulenmaterials (Mülhardt, C., 2006, S. 28). Die so gebundene DNA konnte durch Wasch-Zentrifugationsschritte von den übrigen

Zellkomponenten getrennt und gereinigt werden. Nach dem Waschen konnte die DNA mit einem niedrig konzentrierten Puffer eluiert werden.

(Fa. Roche Diagnostics GmbH, Feb. 2008, S 21).



Abb. 13: Anionenaustauschersäulen

Reagenzien (siehe 3.3.3)

High-Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH)

Durchführung

- zur Verteilung des Proben-Sediments in der Lösung die Proben-Suspensionen zu Beginn vorsichtig vortexen
- anschließend 200µL der Suspension in ein beschriftetes 1,5mL Eppendorftube mit der Eppendorfpipette überführen
- Zugabe von 40µL Proteinase K mit der Multipette
- Zugabe von 200µL Bindungspuffer mit der Multipette
- Eppendorftubes für 10min bei 74 °C im Thermomixer auf Stufe 13 erhitzen
- anschließend je Tube 100µL Isopropanol (100%) mit der Multipette zugeben

- Suspension im Vortexer so lange mischen, bis keine Schlieren mehr sichtbar sind
- Suspension in ein beschriftetes kombiniertes Filter-Tube/Collection-Tube überführen
- Filter-Tube/Collection-Tube für 1 min bei 8000U/min zentrifugieren
- Unterstand verwerfen und das Filter-Tube auf ein neues Collection-Tube überführen
- zur Waschung und Elution mit der Multipette 500µL Entfernungspuffer in das Filter-Tube pipettieren
- erneut für 1 min bei 8000U/min zentrifugieren
- den Unterstand verwerfen und das Filter-Tube auf ein neues Collection-Tube setzen
- Zugabe von 500µL Waschpuffer in das Filter-Tube mit der Multipette
- 1 min bei 8000U/min zentrifugieren
- Unterstand erneut verwerfen und das Filter-Tube auf ein neues Collection-Tube überführen
- Waschvorgang mit 500µL Waschpuffer wiederholen
- Unterstand anschließend verwerfen und das Filter-Tube auf ein beschriftetes 1,5mL Eppendorftube überführen
- 200µL Elutionspuffer (vorher auf 70°C erwärmt) mit der Multipette in das Filter-Tube pipettieren
- 1 min bei 8000U/min zentrifugieren
- das Filter-Tube verwerfen und das Eppendorftube verschließen

Im Eppendorftube befindet sich nun die reine DNA.

(Fa. Roche Diagnostics GmbH, Feb. 2008)

Zur Vermeidung von Kontaminationen nach Beendigung der Arbeit den Tisch sowie die gebrauchten Pipetten gründlich mit 0,05% Natriumhypochloridlösung säubern und mit A. dest nachwischen.

3.4.3.2 Amplifikation der DNA

Zur Amplifikation der DNA wurde das Verfahren der real-time quantitativen PCR angewendet.

Diese Methode beruht auf dem herkömmlichen Prinzip der PCR und ermöglicht zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA durch die Messung eines Fluoreszenzsignals. Bei der real-time PCR wird ein fluoreszierender Farbstoff verwendet, welcher an die doppelsträngige DNA bindet. Dadurch kommt es mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Fluoreszenzanstieg, da die Fluoreszenz proportional mit der Produktmenge ansteigt. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve gibt Auskunft über die Menge der gebildeten DNA-Fragmente (Mülhardt, C., 2006, S. 105ff).

Reagenzien (siehe 3.3.3)

Light Cycler Taq Man Master Kit (Roche Diagnostics GmbH)

Im Reaktionsansatz einer PCR müssen enthalten sein: alle vier Nukleotide dATP; dCTP, dGTP, dTTP sowie PCR-Puffer mit KCl, Tris-HCl und MgCl₂. Dabei dienen KCl und Tris-HCl zur Stabilisierung des pH-Wertes. Freies Mg²⁺ wird von der Polymerase benötigt. Weiterhin müssen enthalten sein: zwei Primer und eine thermostabile Polymerase (Petersmann, A., 2005, S. 12).

Durchführung

Die PCR für *Alicyclobacillus spp.* umfasst jeweils ein Reaktionsvolumen von 20µL.

- in einem 1,5mL Eppendorftube PCR-Master Mix, wie in Tabelle 5 beschrieben, herstellen

N = Anzahl der zu untersuchenden Proben

+1 - Negativkontrolle

+1 - Positivkontrolle

+1 – aufgrund von Pipettierfehlern

Tab. 5: Pipettierschema zur Erstellung des PCR Master Mix

	Menge	Reagenz	Bemerkungen
Nx	9µL	Light Cycler Taq Man Master H ₂ O-grade	<i>Vial 2</i>
Nx	4µL	Light Cycler Taq Man Master 5xconc. Master-Mix	<i>Vial 1</i> Vial 1a (Enzyme) Vial 1b (Reaktionsmix) Je 10µL zusammen pipettieren (ergibt Vial 1)
Nx	2µL	Primer/Probes 10xconc.	10µL CC16S-F (Metabion) 10µL CC16S-R (Metabion) 10µL CC16S (Metabion) + 70µL H ₂ O-PCR-grade

- den Ansatz vorsichtig vortexen
- je nach Anzahl der zu untersuchenden Proben eine entsprechende Anzahl an Light Cycler Glaskapillaren in einen Kühlblock einstecken
- in jede Reaktionskapillare 15µL des hergestellten PCR-Master Mixes pipettieren

- zu den 15µL Master Mix in jede Kapillare 5µL isolierte DNA der Probe pipettieren und das Reaktionsgemisch durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette vorsichtig mischen
- bei der Negativkontrolle zum vorgelegten Master Mix 5µL H₂O PCR-grade pipettieren
- bei der Positivkontrolle zum vorgelegten Master Mix 5µL *A. acidoterrestris* ATCC 49025 pipettieren
- Kapillaren sofort nach dem Befüllen mit dem entsprechenden Verschlussstopfen verschließen
- die einzelnen Glaskapillaren vorsichtig in das Light Cycler Karussell einsetzen (bei Position 1 mit der Negativkontrolle beginnen)
- anschließend das Light Cycler Karussell in die LC Carousel Centrifuge 2.0 einsetzen und bei 3000U/min 30sek. zentrifugieren
- das Karussell aus der Zentrifuge entnehmen und in den Light Cycler 2.0 einsetzen
- PC-Programm Macro-*Alicyclobacillus spp.* starten (Fa. Roche Diagnostics GmbH, April 2006)

PCR-Bedingungen

Die Temperaturen und Zeiten der PCR-Phasen können je nach Ziel-DNA und Primern sehr unterschiedlich sein. Die optimalen Bedingungen müssen im Vorfeld durch mehrere Versuche ermittelt werden.

Zu Beginn einer PCR und zum Abschluss werden meist gesonderte Reaktionsschritte durchgeführt. Am Anfang wird häufig ein längerer Denaturierungsschritt als in den folgenden Zyklen durchgeführt, um zu gewährleisten, dass alle Moleküle als Einzelstränge vorliegen. Ähnliches führt man auch zum Abschluss der PCR durch, um sicher zu gehen, dass alle Polymerisationen zu Ende geführt wurden (Petersmann, A., 2005, S. 12f).

Bei der real-time PCR für *Alicyclobacillus spp.* wurde auf diese gesonderten Reaktionsschritte verzichtet, da das Ziel eine Gesamtlaufzeit der real-time PCR von unter einer Stunde war.

Die verwendete FastStart Taq DNA Polymerase wird durch die Erhitzung auf 95°C in der Denaturierungs-Phase aktiviert.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Reaktionsbedingungen der real-time PCR für *Alicyclobacillus spp.*

Tab. 6: PCR-Bedingungen für die Amplifikation von Alicyclobacillus-DNA

40 Zyklen	Denaturierung	95°C 30s
	Amplifikation	58°C 30s
	Kühlung	40°C 30s
Gesamtlaufzeit der real-time PCR: ca. 50 Minuten		

Auswertung

Bei der Auswertung des Light Cycler Laufes wird die Amplifikationsanalyse ausgeführt. Es kann beurteilt werden, ob und zu welchem Zeitpunkt der PCR-Reaktion Amplifikationsprodukte entstanden sind, die durch Hybridisierung mit den spezifischen Light Cycler Sonden zu einem messbaren Fluoreszenzsignal geführt haben.

Bei der Negativkontrolle darf kein Anstieg des Fluoreszenzsignals erkennbar sein. Bei der Positivkontrolle muss ein eindeutig wahrnehmbarer Anstieg der Fluoreszenzwerte sichtbar sein.

Einzelne Untersuchungsproben werden als positiv bewertet, wenn die Amplifikationskurve bei steigender Zyklenzahl einen deutlich wahrnehmbaren Anstieg der Fluoreszenzwerte zeigt und die Sonden einen Schmelzpunkt im erwarteten Temperaturbereich aufweisen.

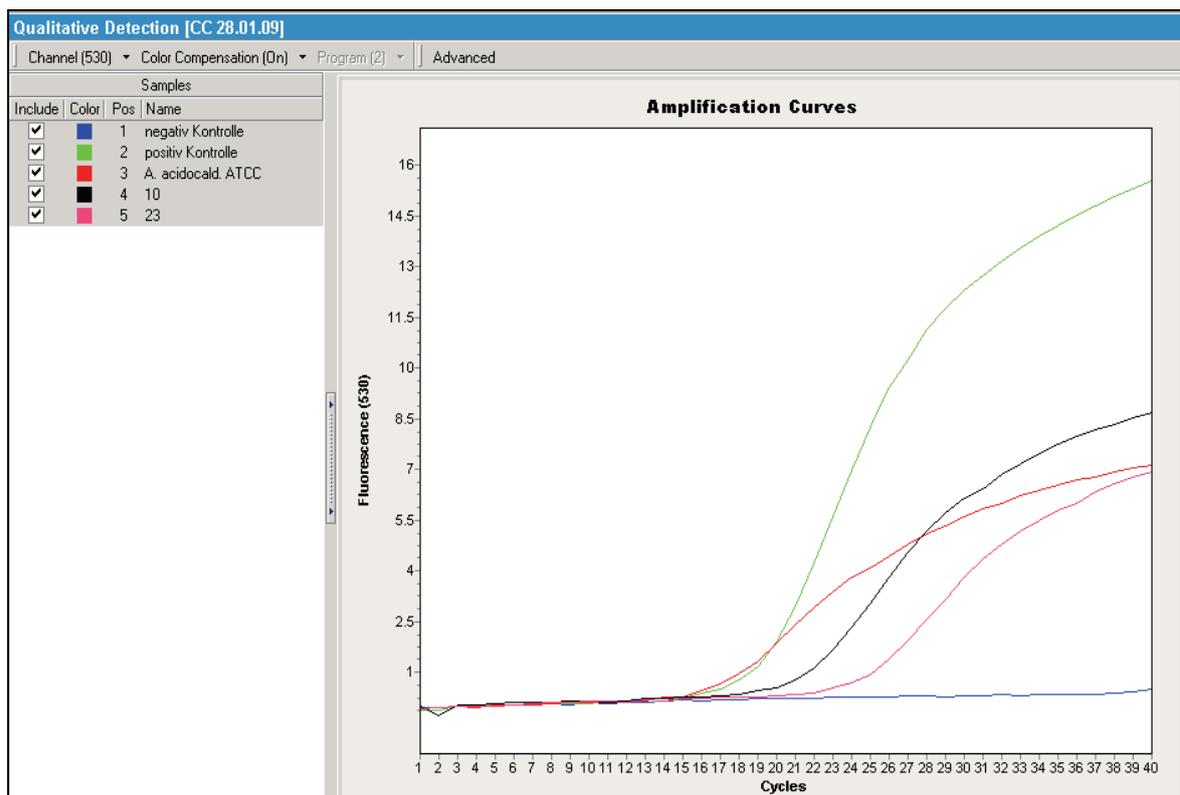


Abb. 14: Typische Amplifikationskurven positiver real-time PCR

3.4.4 Ermittlung der Keimgehalte nach jeweils 24 Stunden

Neben dem qualitativen Verfahren gemäß IFU-Nr. 12 und dem Verfahren real-time PCR wurden nach jeweils 24 Stunden die Keimgehalte von *Alicyclobacillus spp.* / 10mL durch Membranfiltration bestimmt.

Damit wurden die einzelnen Wachstumskurven aufgezeichnet und die Generationszeiten ermittelt.

Zudem dienen die Ergebnisse zur Ermittlung der Nachweisgrenze der real-time PCR (siehe Abschnitt 3.4.5).

Nährmedien (siehe 3.3.3)

- BAT-Bouillon
- BAT-Agar
- PC-Agar

Durchführung

- aus der mit *Alicyclobacillus spp.* in bekannten Konzentrationen angeimpften und bebrüteten BAT-Anreicherungsbouillon (Abschnitt 3.4.2) nach je 24 Stunden mit einer sterilen Pipette 10mL in einen sterilen 250mL Erlenmeyerkolben überführen und mit 90mL sterilem A. dest. verdünnen
- Suspension nach der in Abschnitt 3.4.1 beschriebenen Methode der Membranfiltration filtrieren
- den Filter auf BAT-Agar legen und bei 45 ± 1 °C für fünf Tage bebrüten

Auswertung

Falls in der Probe Alicyclobazillen vorhanden sind, befinden sich diese nach der Filtration auf dem Filterpapier. Sichtbare Kolonien können nach einer Inkubation von fünf Tagen ausgezählt und die Ergebnisse entsprechend dokumentiert werden.

- zur nochmaligen Überprüfung, ob es sich um *Alicyclobacillus spp.* handelt, einen Ösenausstrich auf BAT- und PC-Agar vornehmen
- Bebrütung der Medien für weitere drei – fünf Tage bei 45 ± 1 °C

Auswertung

BAT-Agar: Wachstum

PC-Agar: kein Wachstum

→ *Alicyclobacillus spp.* **positiv**

Aus den ermittelten Keimgehalten von *Alicyclobacillus spp.* / 10mL nach je 24 Stunden, konnte für jede Probe eine Wachstumskurve aufgezeichnet werden. Zudem war es möglich die Generationszeiten zu berechnen.

3.4.5 Nachweisgrenze der real-time PCR für *Alicyclobacillus spp.*

Die Nachweisgrenze der real-time PCR wurde zum einen durch Untersuchungen mit dem Bakterienstamm *A. acidoterrestris* ATCC 49025 bestimmt und zum anderen durch die Ermittlung der Keimgehalte der 60 untersuchten Saftkonzentrat-Proben.

3.4.5.1 Ermittlung der Nachweisgrenze anhand einer Verdünnungsreihe des Stammes *A. acidoterrestris*

Die Nachweisgrenze der real-time PCR wurde anhand einer quantifizierten Verdünnungsreihe mit dem Stamm *A. acidoterrestris* ATCC 49025 überprüft. Für diese Untersuchung wurde einer Doppelbestimmung durchgeführt.

Nährmedien und Reagenzien (siehe 3.3.3)

- Mc Farland 0,5
- 6 Reagenzgläser mit je 9mL NaCl-Verdünnungslösung
- BAT-Agar
- BAT-Bouillon

Durchführung

1. Herstellung der Verdünnungsreihe und Ermittlung des Keimgehaltes / 1mL

- mit einer sterilen Impföse zwei - drei Kolonien des *A. acidoterrestis* Stammes ATCC 49025 abnehmen und in ein steriles Reagenzglas mit A. dest. überführen, bis die Trübung der Mc Farland-Lösung 0,5 entspricht
- Suspension ca. 10s vortexen
- mit einer sterilen Pipette 1mL aus der Suspension entnehmen und in das Reagenzglas „10⁻¹“ mit 9mL NaCl überführen
- die Suspension ebenfalls ca. 10s vortexen
- aus der Suspension „10⁻¹“ mit einer sterilen Pipette 1mL in das Reagenzglas „10⁻²“ überführen und Suspension vortexen
- in dieser Weise bis zur Verdünnung „10⁻⁶“ verfahren

Eine entsprechende Verdünnungsreihe ist in Abbildung 15 dargestellt.



Abb. 15: Verdünnungsreihe von *A. acidoterrestris* in NaCl-Lösung

- aus der Verdünnungsreihe je 1,0mL und 0,1mL auf BAT-Agar pipettieren und mit einem sterilen Plattierungsspatel ausspateln
- Petrischalen bei 45 ± 1 °C für fünf Tage bebrütet

Die Zellzahl pro 1mL erhält man, indem man das Zählergebnis mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und durch das eingesetzte Volumen (in mL) dividiert.

2. Beimpfung der BAT-Bouillon und Ermittlung des Keimgehaltes / 10mL durch Membranfiltration

- 99mL BAT-Bouillon in einen sterilen 250mL Erlenmeyerkolben einfüllen
- mit einer sterilen Pipette 1mL der Verdünnungslösung mit bekannter Animpfkonzentration von *A. acidoterrestris* in den Kolben pipettieren
- Suspension gut mischen und für 10min auf 80 °C im Wasserbad erhitzen
- anschließend die Anreicherung schnell auf 45 °C abkühlen

- Bebrütung der Anreicherung bei 45 ± 1 °C
- nach je zwei Stunden Ermittlung des Keimgehaltes von *A. acidoterrestris* / 10mL durch das Verfahren der Membranfiltration (Abschnitt 3.4.1)
- Durchführung einer real-time PCR

3. Real-time PCR

Die Durchführung der real-time PCR ist bereits in Abschnitt 3.4.3 ausführlich beschrieben.

3.4.5.2 Ermittlung der Nachweisgrenze anhand der untersuchten Saftkonzentrat-Proben

Wie in Abschnitt 3.4.4 beschrieben, wurden von den 60 mit *Alicyclobacillus spp.* „natürlich“ kontaminierten Saftkonzentrat-Proben nach jeweils 24 Stunden die Keimgehalte von *Alicyclobacillus spp.* / 10mL durch Membranfiltration bestimmt.

Parallel dazu wurde eine real-time PCR für *Alicyclobacillus spp.* durchgeführt. Anhand der quantitativen Ergebnisse durch das Verfahren der Membranfiltration konnte somit die Nachweisgrenze der real-time PCR bestimmt werden.

4 Ergebnisse

Im nachfolgenden Kapitel erfolgt eine Darstellung und Auswertung aller Untersuchungsergebnisse.

4.1 Animpfkonzentration von *Alicyclobacillus* spp.

Wie in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt, konnten von 60 untersuchten Saftkonzentrat-Proben durch die Methode der Membranfiltration in 16 Proben Keimgehalte von *Alicyclobacillus* spp. ≤ 10 KbE / 10g ermittelt werden. Das Minimum betrug hier 1KbE / 10g, das Maximum betrug 6KbE / 10g.

In 44 Proben konnten Keimgehalte von *Alicyclobacillus* spp. > 10 KbE / 10g ermittelt werden. Hier betrug das Minimum 11KbE / 10g, das Maximum betrug 602KbE / 10g.

In Tabelle 7 sind die Keimgehalte von *Alicyclobacillus* spp. / 10g der 60 untersuchten Proben aufgeführt.

Tab. 7: Animpfkonzentrationen von *Alicyclobacillus* spp. für die BAT-Bouillon

Nr.	Produkt	Ergebnis	Nr.	Produkt	Ergebnis
1	Apfelsaftkonzentrat	2 KbE/10g Probe	31	Apfelsaftkonzentrat	61 KbE/10g Probe
2	Apfelsaftkonzentrat	55 KbE/10g Probe	32	Apfelsaftkonzentrat	17 KbE/10g Probe
3	Apfelsaftkonzentrat	2 KbE/10g Probe	33	Apfelsaftkonzentrat	17 KbE/10g Probe
4	Apfelsaftkonzentrat	86 KbE/10g Probe	34	Birnensaftkonzentrat	106 KbE/10g Probe
5	Apfelsaftkonzentrat	6 KbE/10g Probe	35	Birnensaftkonzentrat	19 KbE/10g Probe
6	Apfelsaftkonzentrat	4 KbE/10g Probe	36	Apfelsaftkonzentrat	2 KbE/10g Probe
7	Apfelsaftkonzentrat	28 KbE/10g Probe	37	Apfelsaftkonzentrat	1 KbE/10g Probe
8	Apfelsaftkonzentrat	43 KbE/10g Probe	38	Birnensaftkonzentrat	4 KbE/10g Probe
9	Apfelsaftkonzentrat	3 KbE/10g Probe	39	Birnensaftkonzentrat	56 KbE/10g Probe
10	Apfelsaftkonzentrat	35 KbE/10g Probe	40	Birnensaftkonzentrat	3 KbE/10g Probe
11	Apfelsaftkonzentrat	12 KbE/10g Probe	41	Birnensaftkonzentrat	6 KbE/10g Probe
12	Apfelsaftkonzentrat	12 KbE/10g Probe	42	Apfelsaftkonzentrat	1 KbE/10g Probe
13	Apfelsaftkonzentrat	17 KbE/10g Probe	43	Apfelsaftkonzentrat	115 KbE/10g Probe
14	Birnensaftkonzentrat	12 KbE/10g Probe	44	Apfelsaftkonzentrat	1 KbE/10g Probe
15	Apfelsaftkonzentrat	27 KbE/10g Probe	45	Apfelsaftkonzentrat	1 KbE/10g Probe
16	Apfelsaftkonzentrat	16 KbE/10g Probe	46	Birnensaftkonzentrat	63 KbE/10g Probe

17	Apfelsaftkonzentrat	27 KbE/10g Probe	47	Apfelsaftkonzentrat	1 KbE/10g Probe
18	Apfelsaftkonzentrat	1 KbE/10g Probe	48	Apfelsaftkonzentrat	86 KbE/10g Probe
19	Apfelsaftkonzentrat	11 KbE/10g Probe	49	Apfelsaftkonzentrat	18 KbE/10g Probe
20	Apfelsaftkonzentrat	145 KbE/10g Probe	50	Apfelsaftkonzentrat	77 KbE/10g Probe
21	Apfelsaftkonzentrat	207 KbE/10g Probe	51	Apfelsaftkonzentrat	115 KbE/10g Probe
22	Apfelsaftkonzentrat	1 KbE/10g Probe	52	Apfelsaftkonzentrat	413 KbE/10g Probe
23	Apfelsaftkonzentrat	11 KbE/10g Probe	53	Apfelsaftkonzentrat	251 KbE/10g Probe
24	Apfelsaftkonzentrat	174 KbE/10g Probe	54	Apfelsaftkonzentrat	110 KbE/10g Probe
25	Apfelsaftkonzentrat	36 KbE/10g Probe	55	Apfelsaftkonzentrat	368 KbE/10g Probe
26	Apfelsaftkonzentrat	55 KbE/10g Probe	56	Apfelsaftkonzentrat	271 KbE/10g Probe
27	Apfelsaftkonzentrat	38 KbE/10g Probe	57	Apfelsaftkonzentrat	208 KbE/10g Probe
28	Apfelsaftkonzentrat	15 KbE/10g Probe	58	Apfelsaftkonzentrat	196 KbE/10g Probe
29	Apfelsaftkonzentrat	44 KbE/10g Probe	59	Apfelsaftkonzentrat	27 KbE/10g Probe
30	Apfelsaftkonzentrat	65 KbE/10g Probe	60	Apfelsaftkonzentrat	602 KbE/10g Probe

4.2 Qualitativer Nachweis von *Alicyclobacillus spp.* – IFU-Nr. 12

Von den 60 verwendeten *Alicyclobacillus spp.* positiven Saftkonzentrat-Proben, konnten sich in 19 BAT-Anreicherungsbouillons *Alicyclobacillus spp.* nicht vermehren. Durchschnittlich wurden diese mit 22KbE / 10g angeimpft. (1 – 86KbE / 10g)

Bei diesen Proben erfolgte nach den Vorgaben der qualitativen Methode der IFU-Nr. 12 nach einer Bebrütung der Anreicherungsbouillon für sieben Tage ein Ösenausstrich auf BAT-Agar und PC-Agar und eine Bebrütung dieser Medien für weitere fünf Tage.

In allen 19 Fällen war innerhalb von fünf Tagen weder ein Wachstum auf PC-Agar noch auf BAT-Agar zu verzeichnen.

Dies führte zu dem Ergebnis: *Alicyclobacillus spp.* **negativ**.

In 41 von 60 untersuchten Proben konnte sich *Alicyclobacillus spp.* vermehren. Hier wurden neun BAT-Anreicherungsbouillons mit Keimgehalten von *Alicyclobacillus spp.* $\leq 10\text{KbE} / 10\text{g}$ (1 – 6KbE/10g) und 32 BAT-Anreicherungsbouillons mit Keimgehalten von *Alicyclobacillus spp.* $> 10\text{KbE} / 10\text{g}$ (11 – 602KbE / 10g) beimpft.

Auch bei diesen Proben erfolgte nach sieben Tagen Bebrütung der Bouillon ein Ösenausstrich auf BAT-Agar und PC-Agar. Hier war bei allen 41 Proben innerhalb von fünf Tagen auf BAT-Agar ein Wachstum zu verzeichnen. Auf PC-Agar erfolgte auch nach fünf Tagen kein Wachstum.

Somit galten diese Proben als *Alicyclobacillus spp.* **positiv**.

In 100% der wachstumsfähigen Proben konnte somit durch das Verfahren der IFU-Methode Nr. 12 *Alicyclobacillus spp.* nachgewiesen werden.

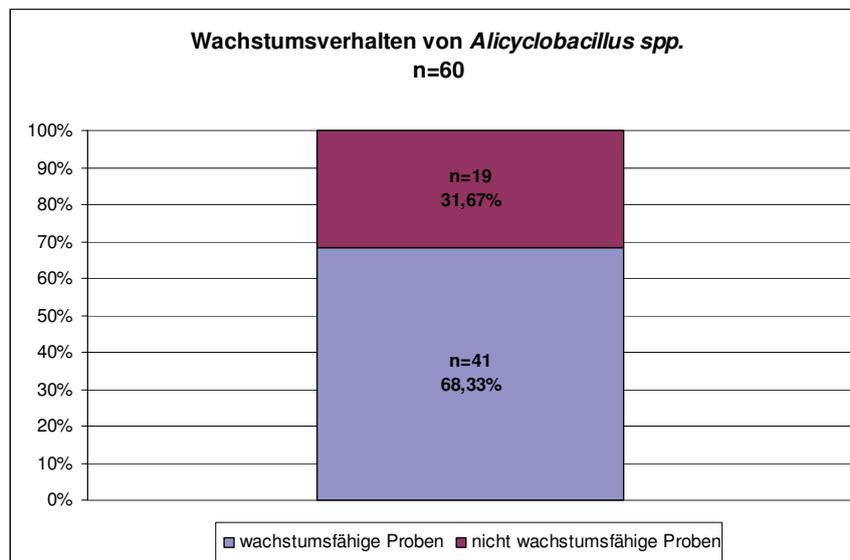


Abb. 16: Wachstumsverhalten von *Alicyclobacillus spp.* in BAT-Bouillon

Im **Anhang 1** (Seite A-3) ist die Tabelle mit den Ergebnissen der Ausstriche auf BAT-Agar und PC-Agar aufgeführt.

4.3 Nachweis von *Alicyclobacillus spp.* – real-time PCR

Zur Amplifikation der DNA wurde das Verfahren der real-time PCR mit spezifischen *Alicyclobacillus*-Primern angewendet. Nach jeweils 24 Stunden Bebrütung der BAT-Anreicherungsbouillon wurde eine real-time PCR durchgeführt.

Die zu Beginn einer PCR nahezu exponentielle Vermehrung der DNA verlangsamt sich mit dem Verbrauch der Reagenzien, die PCR verliert an Effizienz. Daher wird eine PCR nach 30 bis 40 Zyklen beendet. Für die real-time PCR zum Nachweis von *Alicyclobacillus spp.* wurde eine Anzahl von 40 Zyklen gewählt. Da es in den letzten Zyklen vermehrt zur Anhäufung von „Schmutz-DNA“ kommt, wurden bei der Auswertung der real-time PCR nur solche Proben als *Alicyclobacillus spp.* positiv gewertet, die einen Anstieg der Schmelzkurve bis einschließlich Zyklus 37 verzeichneten.

Im **Anhang 2** (Seite A-6) ist die Tabelle mit den Ergebnissen der real-time PCR nach unterschiedlichen Bebrütungszeiten aufgeführt.

Im **Anhang 3** (Seite A-9) sind die zugehörigen Amplifikationskurven der real-time PCR aufgelistet.

Proben nicht vermehrungsfähiger Alicyclobazillen

Bei 19 Proben, war *Alicyclobacillus spp.* in der BAT-Anreicherungsbouillon nicht wachstums- und vermehrungsfähig.

Hier konnte einerseits mittels Methode IFU-Nr. 12 und andererseits mit dem Verfahren der real-time PCR *Alicyclobacillus spp.* nicht nachgewiesen werden.

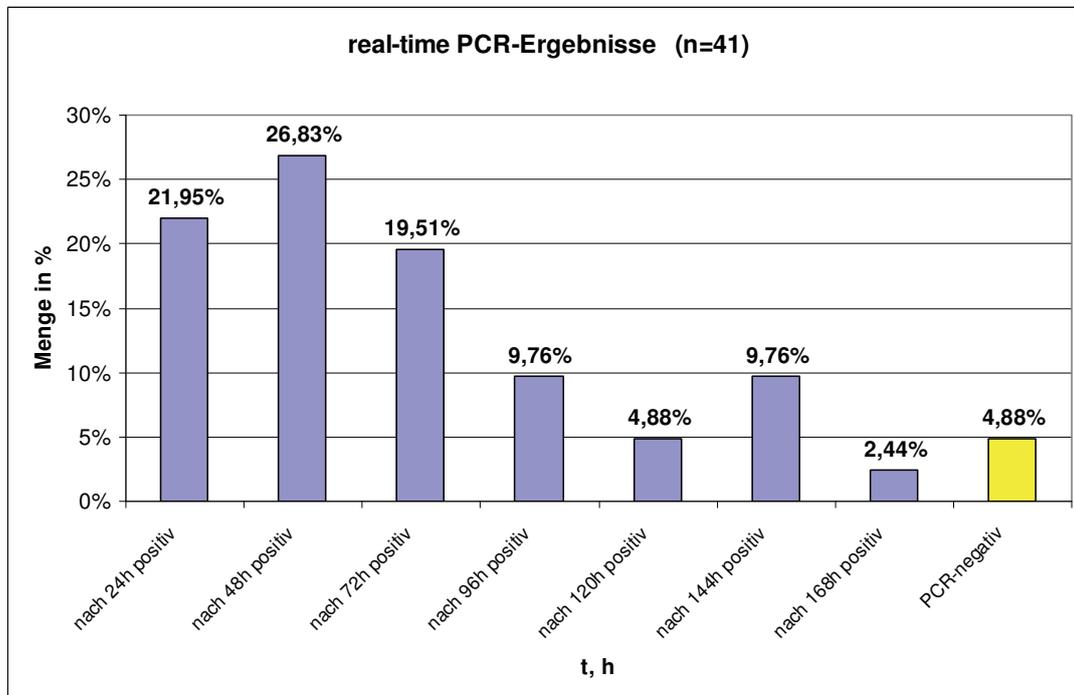
Proben vermehrungsfähiger Alicyclobazillen

Abb. 17: Ergebnisse der real-time PCR bei Proben mit vermehrungsfähigen Alicyclobazillen

In 41 von 60 untersuchten Proben konnte sich *Alicyclobacillus spp.* vermehren.

- Hier konnte bei neun Proben mittels real-time PCR bereits nach 24 Stunden Bebrütung der BAT-Anreicherungsbouillon *Alicyclobacillus spp.* nachgewiesen werden. Dies entspricht 21,95% der Proben mit vermehrungsfähigen Alicyclobazillen.
- Bei elf weiteren Proben (entspricht 26,83%) konnte nach 48 Stunden Anreicherung ein Nachweis von *Alicyclobacillus spp.* mittels real-time PCR erfolgen.
- Acht Proben waren nach 72 Stunden in der real-time PCR *Alicyclobacillus spp.* positiv. Dies entspricht 19,51%.
- Bei vier der 41 Proben mit wachstumsfähigen Alicyclobazillen erfolgte ein positiver Nachweis nach 96 Stunden Bebrütung der Bouillon (entspricht 9,76%).

- Bei zwei weiteren Proben zeigte sich nach 120 Stunden ein real-time PCR positives Ergebnis. Dies sind 4,88%.
- In vier Proben waren nach 144 Stunden mittels real-time PCR Alicyclobazillen nachweisbar (entspricht 9,76%).
- Eine Probe war nach einer Anreicherung von 168 Stunden real-time PCR positiv (entspricht 2,44%).
- Bei zwei Proben (Nummer 10 und 23) (entspricht 4,88%) konnte auch nach einer Bebrütung der Bouillon für 168 Stunden mittels real-time PCR *Alicyclobacillus spp.* nicht nachgewiesen werden. In diesen Proben konnte sich *Alicyclobacillus spp.* jedoch vermehren und die Methode der IFU-Nr. 12 zeigte ein positives Ergebnis. Auch bei mehrfachen Wiederholungen der real-time PCR aus der BAT-Bouillon konnte kein Nachweis von *Alicyclobacillus spp.* erfolgen. Die entsprechenden Amplifikationskurven sind im **Anhang 3** (Seite A-17) zu finden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass nach zwei Tagen Bebrütung der BAT-Anreicherungsbouillon in 48,79% der Proben mit wachstumsfähigen Alicyclobazillen mittels real-time PCR *Alicyclobacillus spp.* nachgewiesen werden konnte (Abb. 18 A). Nach drei Tagen konnte in 68,29% dieser Proben ein Nachweis von *Alicyclobacillus spp.* mittels real-time PCR erfolgen (Abb. 18 B). Nach sieben Tagen Bebrütung der Bouillon konnte in 95,12% der Proben mit wachstumsfähigen Alicyclobazillen mittels real-time PCR *Alicyclobacillus spp.* nachgewiesen werden (Abb. 18 C).

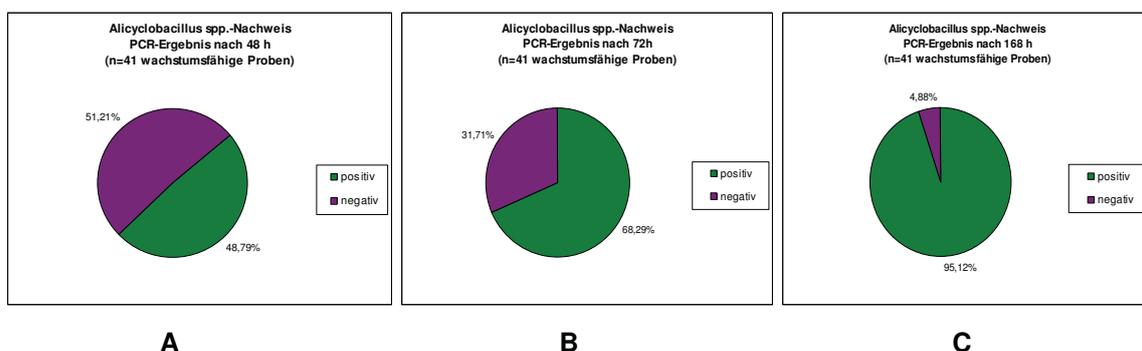


Abb. 18: Zusammengefasste Ergebnisse der real-time PCR

4.4 Verfahrensvergleich IFU-Nr. 12 – real-time PCR

Von 60 mit *Alicyclobacillus spp.* natürlich kontaminierten Saftkonzentrat-Proben konnte mit dem Referenzverfahren (IFU-Methode Nr. 12) in 41 Proben *Alicyclobacillus spp.* nachgewiesen werden. Bei 19 Proben konnte der Nachweis von *Alicyclobacillus spp.* nicht erfolgen.

Mit dem Alternativverfahren (real-time PCR) konnte in 39 Proben *Alicyclobacillus spp.* nachgewiesen werden. Bei 21 Proben ergab sich ein real-time PCR negatives Ergebnis.

Somit ergeben sich folgende Übereinstimmungen / Abweichungen zwischen dem Referenzverfahren und dem Alternativverfahren:

Tab. 8: Übereinstimmungen/Abweichungen zwischen IFU-Nr. 12 und real-time PCR

Ergebnisse	Referenzverfahren positiv (IFU-Nr. 12) (R+) 41	Referenzverfahren negativ (IFU-Nr.12) (R-) 19
Alternatives Verfahren positiv (PCR) (A+) 39	Positive Übereinstimmungen (PA) 39	Positivabweichungen (PD) 0
Alternatives Verfahren negativ (PCR) (A-) 21	Negativabweichungen (ND) 2	Negative Übereinstimmungen (NA) 19

Definition Positivabweichung (PD):

Wenn das Alternativverfahren ein positives Ergebnis ergibt, während das Referenzverfahren ein Negativergebnis zeigt, spricht man von einer Positivabweichung (DIN EN ISO 16140:2003, S. 8).

Definition Negativabweichung (ND):

Das Alternativverfahren zeigt eine Negativabweichung, wenn es ein negatives Ergebnis erbringt, während das Referenzverfahren ein Positivergebnis zeigt (ebd.).

Statistische Berechnungen:

1.) Relative Genauigkeit (AC)

Die relative Genauigkeit ist der Grad der Übereinstimmung zwischen dem Referenz- und dem Alternativverfahren.

$$AC = (PA + NA) / N * 100\%$$

$$AC = (39 + 19) / 60 * 100\%$$

$$**AC = 96,7%**$$

2.) Relative Spezifität (SP)

Die relative Spezifität ist die Eignung des alternativen Verfahrens den Analyt *nicht* nachzuweisen, wenn er mit dem Referenzverfahren *nicht* nachgewiesen werden kann.

$$SP = NA / N^- * 100\%$$

$$SP = 19 / 19 * 100\%$$

$$**SP = 100%**$$

3.) Relative Empfindlichkeit (SE)

Die relative Empfindlichkeit ist die Eignung des alternativen Verfahrens, den Analyt nachzuweisen, wenn er mit dem Referenzverfahren nachgewiesen werden kann.

$$SE = PA / N+ * 100\%$$

$$SE = 39 / 41 * 100\%$$

$$**SE = 95,1 %**$$

- N Gesamtanzahl der Proben
N- Gesamtanzahl negativer Ergebnisse mit dem Referenzverfahren (NA + PD)
N+ Gesamtanzahl positiver Ergebnisse mit dem Referenzverfahren (PA + ND)
(DIN EN ISO 16140:2003, S. 10)

4.5 Wachstumskurven und Generationszeiten

Nach jeweils 24 Stunden wurden die Keimgehalte von *Alicyclobacillus spp.* / 10mL Anreicherungsbouillon durch Membranfiltration ermittelt. Dies diente zur Aufzeichnung der Wachstumskurven und zur Ermittlung der Generationszeiten.

Die Tabelle mit den Keimgehalten von *Alicyclobacillus spp.* / 10ml Bouillon nach je 24 Stunden ist im **Anhang 4** (Seite A-18) aufgeführt.

Die Zahl 1000 steht hier für einen Rasen, d.h. der Filter war so stark bewachsen, dass einzelne Kolonien nicht ausgezählt werden konnten. Durch die Berechnung der Generationszeiten konnte jedoch der genaue Keimgehalt ermittelt werden. Die Werte lagen hier zwischen 946KbE / 10mL - 1097KbE / 10mL.

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, gibt es Alicyclobazillen, die sich in der BAT-Anreicherungsbouillon nicht vermehren konnten. Hier war nach sieben Tagen entweder kein Koloniewachstum auf dem Filter zu verzeichnen (beispielsweise Probe-Nr. 1 und 18) oder die Koloniezahl hat sich im Vergleich zum Zeitpunkt t_0 nicht signifikant verändert (beispielsweise Probe-Nr. 27 und 29).

Weiterhin verdeutlicht die Tabelle, dass es zwei Gruppen von Alicyclobazillen gibt. Alicyclobazillen, mit einer kurzen lag-Phase, die bereits nach zwei – drei Tagen eine starke Vermehrung zeigen (beispielweise Probe-Nr. 3 und 4) und Alicyclobazillen mit einer lag-Phase von bis zu drei Tagen. Hier ist eine signifikante Vermehrung erst nach vier – sieben Tagen sichtbar (beispielsweise Probe-Nr. 2 und 16).

Dieses unterschiedliche Wachstumsverhalten wird in den nachfolgenden Abbildungen verdeutlicht.

Wachstumskurven von *Alicyclobacillus* spp.

In Abbildung 19 sind die Wachstumskurven aller 60 untersuchten Saftkonzentrat-Proben aufgezeigt.

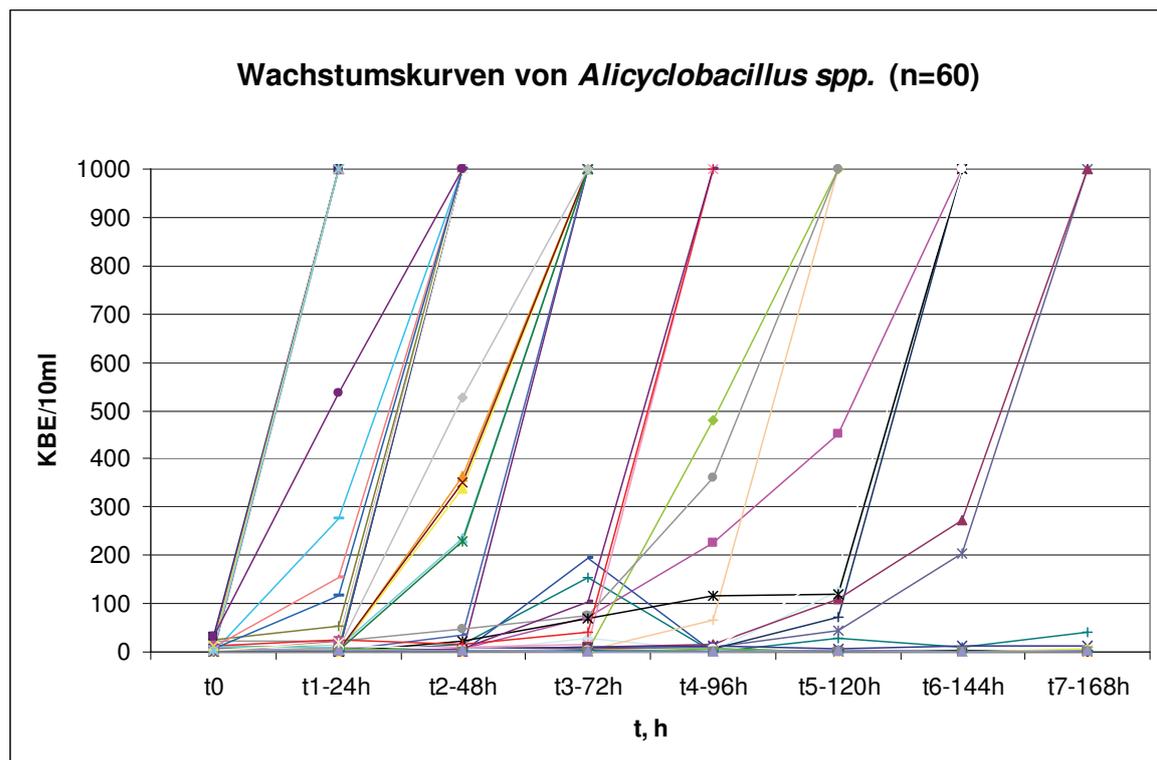


Abb. 19: Wachstumskurven von *Alicyclobacillus* spp.

Wie bereits oben beschrieben, wird hier sichtbar, dass es Proben gibt, bei denen sich *Alicyclobacillus* spp. in der BAT-Anreicherungsbouillon innerhalb von sieben Tagen nicht vermehren konnte.

Des Weiteren wird deutlich, dass Alicyclobazillen durch unterschiedliche lag-Phasen charakterisiert sind und somit unterschiedliche Bebrütungszeiten für eine signifikante Vermehrung benötigen.

Um die unterschiedlichen lag-Phasen zu verdeutlichen, wurden in den nachfolgenden Abbildungen die vereinzelt Wachstumskurven nach Wachstumszeiten aufgeteilt.

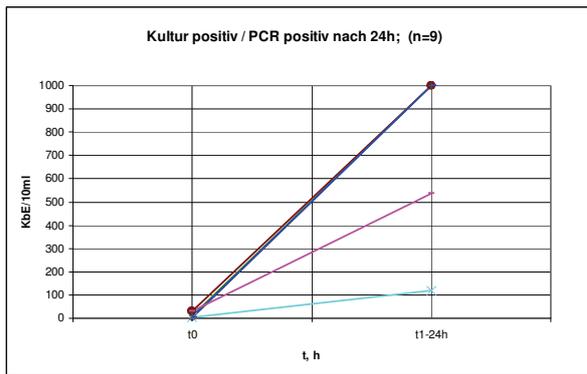


Abb. 20: Wachstumskurven nach 24h

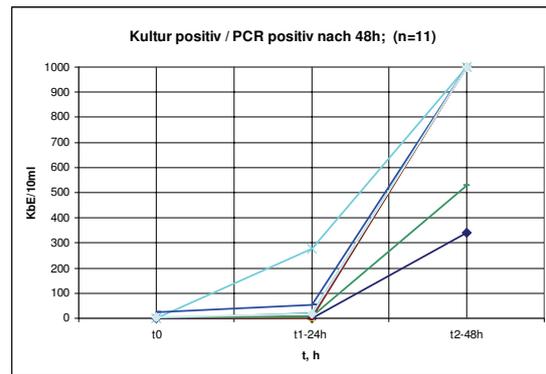


Abb. 21: Wachstumskurven nach 48h

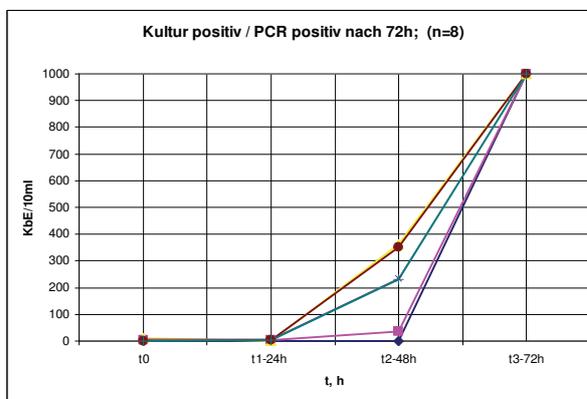


Abb. 22: Wachstumskurven nach 72h

Die Abbildungen 20 – 22 zeigen Wachstumskurven von Alicyclobazillen mit einer kurzen lag-Phase. Die real-time PCR war hier innerhalb von drei Tagen positiv.

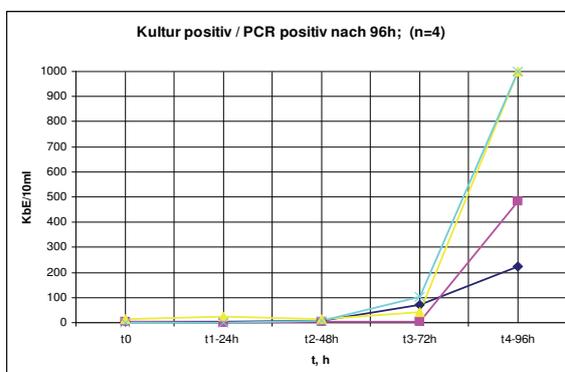


Abb. 23: Wachstumskurven nach 96h

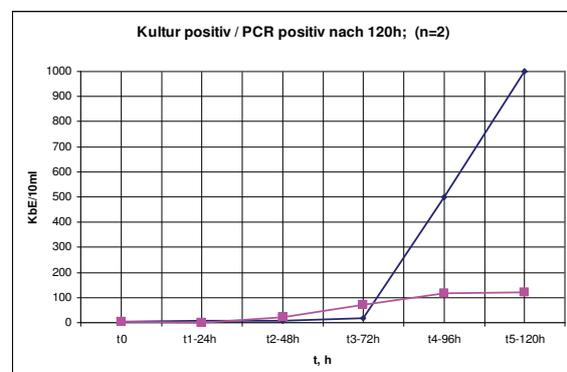


Abb. 24: Wachstumskurven nach 120h

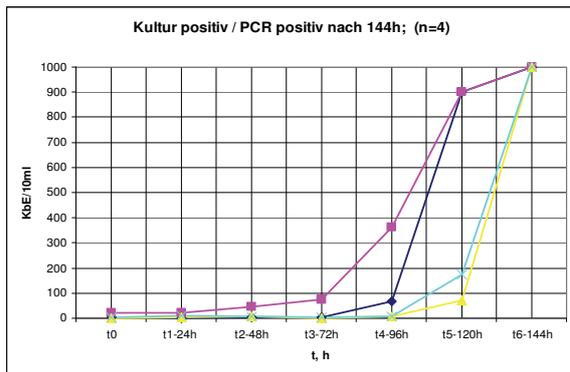


Abb. 25: Wachstumskurven nach 144h

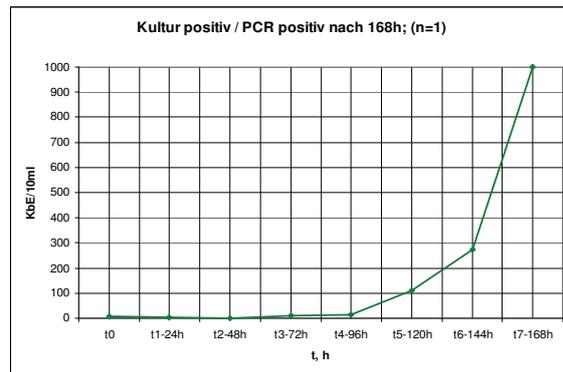


Abb. 26: Wachstumskurven nach 168h

Die Abbildungen 23 – 26 zeigen Wachstumskurven von Alicyclobazillen mit einer lag-Phase von bis zu drei Tagen. Hier erfolgte der positive Nachweis mittels real-time PCR nach vier - sieben Tagen.

Generationszeiten von *Alicyclobacillus* spp.

Als Generationszeit (g) bezeichnet man das Zeitintervall für die Verdopplung der Zellzahl, als Teilungsrate (v) bezeichnet man die Anzahl der Zellteilungen pro Zeit (Fuchs, G., 2007, S. 171).

Die Generationszeiten der 60 untersuchten Saftkonzentrat-Proben wurden wie folgt berechnet:

1.) Berechnung der Teilungsrate (v)

$$v = \lg N - \lg N_0 / \lg 2 (t-t_0)$$

N_0 = Anfangskeimgehalt

N = Keimgehalt nach n Teilungen

2.) Berechnung der Generationszeit (g)

$$g = 1 / v$$

Beispiel: Probe Nr. 4

$$N_0 = 6 \text{ KbE} / 10\text{mL}$$

$$N = 1000 \text{ KbE} / 10\text{mL}$$

$$T = 24\text{h}$$

Teilungsrate (v)

$$v = \lg N - \lg N_0 / \lg 2 (t-t_0)$$

$$v = \lg 1000 - \lg 6 / \lg 2 (24)$$

$$\underline{v = 0,307}$$

Generationszeit (g)

$$g = 1 / v$$

$$g = 1 / 0,307$$

$$\underline{g = 3,25\text{h}}$$

Die Generationszeiten der 60 untersuchten Proben sind in aufsteigender Reihenfolge in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 9: Generationszeiten von *Alicyclobacillus* spp.

Probe-Nr.	Generationszeit
1	kein Wachstum
7	kein Wachstum
8	kein Wachstum
11	kein Wachstum
12	kein Wachstum
13	kein Wachstum
15	kein Wachstum
18	kein Wachstum
22	kein Wachstum
27	kein Wachstum
28	kein Wachstum
29	kein Wachstum
31	kein Wachstum
35	kein Wachstum
37	kein Wachstum
42	kein Wachstum
45	kein Wachstum
47	kein Wachstum
48	kein Wachstum
5	2,4 h
6	2,4 h
49	2,4 h
21	2,8 h
3	2,9 h
59	2,9 h
4	3,2 h
20	3,4 h
51	3,4 h
55	3,4 h
40	3,5 h

Probe-Nr.	Generationszeit
26	3,7 h
46	3,7 h
58	3,8 h
52	4,0 h
14	4,1 h
41	4,1 h
50	4,1 h
57	4,1 h
38	4,3 h
36	4,8 h
56	4,8 h
17	5,0 h
39	5,0 h
54	5,3 h
43	5,6 h
60	5,9 h
53	6,1 h
16	6,2 h
44	7,3 h
25	7,7 h
32	7,9 h
10	8,0 h
33	9,4 h
23	11,0 h
9	12,8 h
34	16,1 h
24	16,4 h
30	18,5 h
19	22,7 h
2	23,8 h

Alicyclobazillen mit einer kurzen Anlaufphase (lag-Phase), die in der real-time PCR bereits nach ein - drei Tagen positiv waren, haben im Mittel eine Generationszeit von vier Stunden.

Alicyclobazillen mit einer Anlaufphase (lag-Phase) von bis zu drei Tagen, die mittels real-time PCR nach vier – sieben Tagen positive Ergebnisse zeigten, haben im Mittel eine Generationszeit von zwölf Stunden.

4.6 Nachweisgrenze der real-time PCR für *Alicyclobacillus spp.*

4.6.1 Ermittlung der Nachweisgrenze anhand einer Verdünnungsreihe des Stammes *A. acidoterrestris*

Anhand einer quantifizierten Verdünnungsreihe mit dem Stamm *A. acidoterrestris* ATCC 49025 wurde die Nachweisgrenze der real-time PCR überprüft.

Aus den beimpften BAT-Anreicherungsbouillons wurden die Keimgehalte / 10 mL nach je zwei Stunden ermittelt sowie eine real-time PCR durchgeführt.

Die Untersuchung erfolgte in einer Doppelbestimmung.

Ergebnisse Untersuchung I:

Tab. 10: Wachstum der Kultur - Beimpfungsversuch I

Nr.	Beimpfung pro 10mL		t0	t1-2h	t2-4h	t3-6h	t4-8h	t5-10h	t6-12h
1A	ca. 1000 KbE/10mL	KbE/10ml	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
2A	ca. 200 KbE/10mL	KbE/10ml	275	289	447	1000			
3A	ca. 30 KbE/10mL	KbE/10ml	30	39	64	374	1000		
Legende: 1000 = Rasen									

Durch Membranfiltration konnten die Keimgehalte von *A. acidoterrestris* / 10mL, wie in Tabelle 10 dargestellt, ermittelt werden. Davon konnten die Keimgehalte von *A. acidoterrestris* / 1mL für die real-time PCR abgeleitet werden.

Tab. 11: PCR-Ergebnisse - Beimpfungsversuch I

Nr	Beimpfung		t0	t1-2h	t2-4h	t3-6h	t4-8h	t5-10h	t6-12h
1A	ca.100KbE/1mL	KbE/1ml	100	100	100	100	100	100	100
		PCR	pos. Z. 36						
2A	ca. 20KbE/1mL	KbE/1ml	28	29	45	100			
		PCR	neg.	neg.	pos. Z. 37				
3A	ca. 3KbE/1mL	KbE/1ml	3	4	6	37	100		
		PCR	neg.	neg.	neg.	neg.	pos. Z. 37		

Legende: neg. = PCR negativ, Bsp: pos. Z. 36 = PCR positiv im 36. Zyklus

Wie aus Tabelle 11 zu entnehmen ist, ergaben sich bei der Probe 1A und 3A real-time PCR positive Ergebnisse bei Keimgehalten von $\geq 100\text{KbE} / 1\text{mL}$, während bei der Probe 2A ein positives PCR-Ergebnis bereits bei ca. $45\text{KbE} / 1\text{mL}$ erzielt werden konnte.

Ergebnisse Untersuchung II:

Tab. 12: Wachstum der Kultur - Beimpfungsversuch II

Nr.	Beimpfung pro 10mL		t0	t1-2h	t2-4h	t3-6h	t4-8h	t5-10h	t6-12h
1B	ca. 1000 KbE/10mL	KbE/10ml	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
2B	ca. 300 KbE/10mL	KbE/10ml	319	325	442	1000			
3B	ca. 40 KbE/10mL	KbE/10ml	41	56	73	362	1000		

Legende: 1000 = Rasen

Auch im 2. Versuch wurden die Keimgehalte von *A. acidoterrestris* / 10mL durch Membranfiltration ermittelt (Tabelle 12) und davon die Keimgehalte von *A. acidoterrestris* / 1mL für die real-time PCR abgeleitet.

Tab. 13: PCR-Ergebnisse - Beimpfungsversuch II

Nr	Beimpfung		t0	t1-2h	t2-4h	t3-6h	t4-8h	t5-10h	t6-12h
1B	ca.100KbE/1mL	KbE/1ml	100	100	100	100	100	100	100
		PCR	pos. Z. 34						
2B	ca.30KbE/1mL	KbE/1ml	32	33	44	100			
		PCR	neg.	neg.	neg.	pos. Z. 35			
3B	ca.4KbE/1mL	KbE/1ml	4	6	7	36	100		
		PCR	neg.	neg.	neg.	neg.	pos. Z. 37		
Legende: neg. = PCR negativ, Bsp: pos. Z. 34 = PCR positiv im 34. Zyklus									

Aus Tabelle 13 ist zu entnehmen, dass beim Beimpfungsversuch II bei allen Proben positive real-time PCR-Ergebnisse erst bei Keimgehalten von $\geq 100\text{KbE} / 1\text{mL}$ erzielt werden konnte.

4.6.2 Ermittlung der Nachweisgrenze anhand der untersuchten Saftkonzentrat-Proben

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der real-time PCR wurde zudem nach jeweils 24 Stunden der Keimgehalt von *Alicyclobacillus spp.* / 10mL der 60 untersuchten Saftkonzentrat-Proben aus den entsprechenden BAT-Anreicherungsbouillons bestimmt. Parallel dazu wurde von diesen Proben die real-time PCR durchgeführt.

In Abbildung 27 sind die Ergebnisse verdeutlicht.

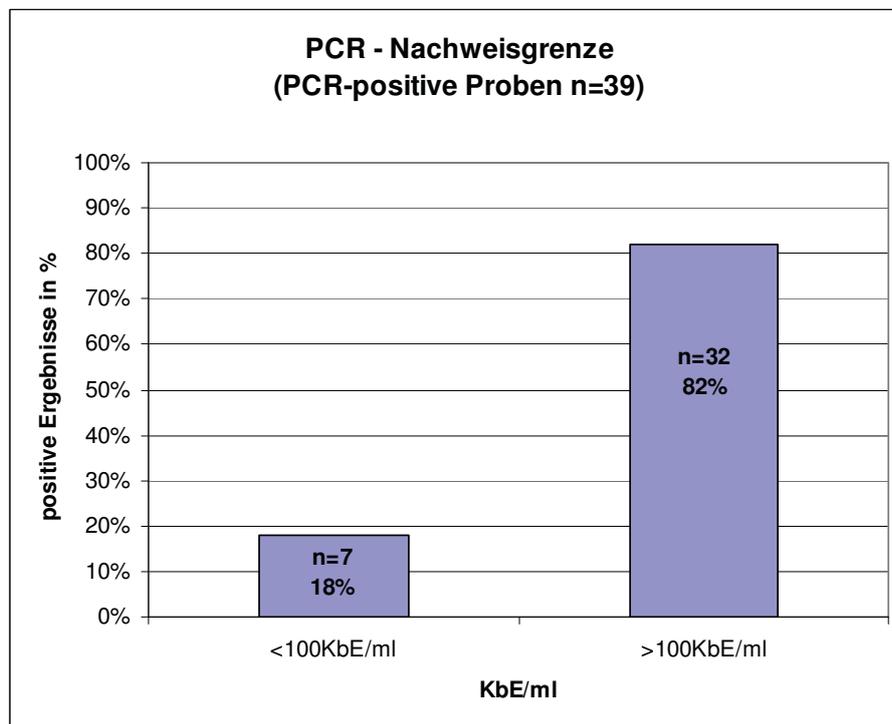


Abb. 27: Nachweisgrenze PCR-positiver Proben

In 82% (n=32) der real-time PCR-positiven Proben wurde ein positives Ergebnis bei Keimgehalten von $\geq 100\text{KbE} / 1\text{mL}$ ermittelt, in 18% (n=7) der positiven Proben bei Keimgehalten $\leq 100\text{KbE} / 1\text{mL}$.

Die Nachweisgrenze der real-time PCR für *Alicyclobacillus spp.* liegt bei $\geq 100\text{KbE} / 1\text{mL}$.

Bei einem Keimgehalt von $\leq 100\text{KbE} / 1\text{mL}$ kann es zu falsch negativen real-time PCR-Ergebnissen kommen.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Diplomarbeit bestand darin, zu überprüfen, ob durch das Alternativverfahren der real-time PCR zum Nachweis von *Alicyclobacillus spp.* Ergebnisse schneller zur Verfügung stehen als durch das Referenzverfahren der IFU-Methode Nr. 12. Hierzu wurden 60 Saftkonzentrat-Proben mit beiden Verfahren untersucht. Anschließend erfolgte ein Vergleich gemäß DIN EN ISO 16140:2003. Weiterhin galt es, die Nachweisgrenze der real-time PCR zu bestimmen.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Untersuchungen zusammengefasst:

In 41 von 60 untersuchten Saftkonzentrat-Proben war *Alicyclobacillus spp.* in der BAT-Anreicherungsbouillon vermehrungsfähig, in 19 von 60 untersuchten Proben konnte sich *Alicyclobacillus spp.* in der Anreicherungsbouillon nicht vermehren.

Durch das Referenzverfahren IFU-Nr. 12 konnte in 100% der wachstumsfähigen Proben *Alicyclobacillus spp.* nachgewiesen werden. Das Alternativverfahren real-time PCR lieferte in 95,12% der Proben mit wachstumsfähigen Alicyclobazillen ein positives Ergebnis nach einer Bebrütung der BAT-Bouillon für sieben Tage. Die Wahrscheinlichkeit falsch negativer Ergebnisse liegt nach sieben Tagen Bebrütung der Anreicherung bei 4,88%.

Weiterhin wurde deutlich, dass Alicyclobazillen durch unterschiedliches Wachstumsverhalten charakterisiert sind und somit unterschiedliche Generationszeiten aufweisen.

Die Nachweisgrenze der real-time PCR liegt bei $\geq 100\text{KbE} / 1\text{ml}$.

Anhand der Untersuchungsergebnisse ergeben sich folgende Diskussionspunkte:

- Ergebnisse des Referenzverfahrens IFU-Nr. 12
- Ergebnisse des Alternativverfahrens real-time PCR
- Vergleich
- Wachstumsverhalten und Generationszeiten
- Nachweisgrenze der real-time PCR

5.1 Ergebnisse des Referenzverfahrens IFU-Methode Nr. 12

In 19 von 60 untersuchten natürlich kontaminierten Saftkonzentrat-Proben, konnte sich *Alicyclobacillus spp.* in der BAT-Anreicherungsbouillon nicht vermehren. In allen 19 Fällen konnte *Alicyclobacillus spp.* mittel IFU-Methode-Nr. 12 und mittels real-time PCR nicht nachgewiesen werden.

Eine eventuelle Ursache dafür könnte sein, dass sich die Bakterien in einem Zustand befinden, der als „viable but not culturable“ (VBNC) bezeichnet wird. Mikroorganismen, die sich in diesem Zustand befinden, sind mit den üblichen Nährmedien zwar nachweisbar, die Zellen sind jedoch nicht vermehrungsfähig. Es wird vermutet, dass der VBNC-Zustand eine physiologische Anpassung der Zellen ist, um schädliche Umweltbedingungen und Stresssituationen zu überleben. Hierzu zählen beispielsweise der plötzliche Abfall der Temperatur, zu geringes Sauerstoffangebot, geringes Nährstoffangebot oder intensive Lichteinstrahlung. Zellen, die sich im VBNC-Zustand befinden, sind durch eine Reduktion der Größe sowie durch Änderungen der Membranstruktur und Proteinzusammensetzungen charakterisiert (Oliver, J.D., 2005, S. 94ff).

Um Bakterien nachzuweisen, die sich im VBNC-Zustand befinden, werden spezielle Wiederbelegungsverfahren eingesetzt. Danach sind einige Spezies, wie beispielsweise *Listeria spp.* in der Lage ihre Vermehrungsfähigkeit wiederzuerlangen (ebd., S. 96).

Für *Alicyclobacillus spp.* sind keine Wiederbelebungsmaßnahmen in der Literatur beschrieben.

In den 19 Proben, in denen sich *Alicyclobacillus spp.* nicht vermehrt hat, könnten die Mikroorganismen durch Einwirkungen während des Produktionsprozesses oder durch radikale Veränderungen der Umgebungsbedingungen, wie beispielsweise Kühlung, so stark beschädigt sein, dass sie ihre Vermehrungsfähigkeit verlieren.

Auch niedrige Keimgehalte könnten für eine Nicht-Vermehrungsfähigkeit der Alicyclobazillen ursächlich sein.

In 41 von 60 untersuchten Proben konnten sich *Alicyclobacillus spp.* in der BAT-Anreicherungsbouillon vermehren. In diesen Proben konnte zu 100% mittels Referenzmethode IFU-Nr. 12 *Alicyclobacillus spp.* nachgewiesen werden.

In neun dieser Anreicherungen vermehrte sich *Alicyclobacillus spp.* trotz Keimgehalten von $\leq 10\text{KbE} / 10\text{g}$. Hier waren die Bakterien vermutlich keinen schädlichen Umgebungsbedingungen ausgesetzt und konnten die Kulturbedingungen optimal für ihr Wachstum zu nutzen.

Die Lagerzeit der Probe, hat nach den hier durchgeführten Untersuchungen, keinen signifikanten Einfluss auf die Wachstums- und Vermehrungsfähigkeit der Alicyclobazillen.

5.2 Ergebnisse des Alternativverfahrens real-time PCR

Parallel zum qualitativen Nachweis von *Alicyclobacillus spp.* nach IFU-Methode Nr. 12 wurde die real-time PCR mit spezifischen Alicyclobacillus-Primern durchgeführt. Dieses Verfahren liefert Untersuchungsergebnisse innerhalb weniger Stunden. Um jedoch einen zuverlässigen Nachweis auf *Alicyclobacillus spp.* zu führen ist eine Anreicherung in der BAT-Bouillon unerlässlich.

Nach zwei Tagen Bebrütung der beimpften BAT-Bouillon konnte mittels real-time PCR in 48,79% der wachstumsfähigen Proben *Alicyclobacillus spp.* nachgewiesen werden, nach drei Tagen Bebrütung der beimpften BAT-Bouillon erfolgte der Nachweis in 68,29% der wachstumsfähigen Proben. Diese Proben wiesen eine kurze lag-Phase auf. Die exponentielle Wachstumsphase ist bei diesen Proben durch eine Generationszeit von durchschnittlich vier Stunden charakterisiert. Durch diese schnelle Vermehrung erreichen die Proben in kurzer Zeit die für die real-time PCR notwendige Nachweisgrenze von $\geq 100\text{KbE} / 1\text{ mL}$ und sind bereits nach ein – drei Tagen mittels real-time PCR nachweisbar.

Mit dem Referenzverfahren IFU-Methode Nr. 12, konnten in allen wachstumsfähigen Proben (n=41) Alicyclobazillen nachgewiesen werden. Das Alternativverfahren real-time PCR lieferte in 95,12% ein positives Ergebnis nach einer Bebrütung der BAT-Anreicherungsbouillon für sieben Tage.

In zwei untersuchten Proben mit wachstumsfähigen Alicyclobazillen konnte der Nachweis von *Alicyclobacillus spp.* aus der BAT-Anreicherung mittels eingesetzter real-time PCR nicht erfolgen. Auch mehrfache Wiederholungen lieferten ein negatives PCR-Ergebnis. Die Wahrscheinlichkeit falsch negativer Ergebnisse bei Anwendung der real-time PCR liegt nach einer Bebrütung der Anreicherung für sieben Tage somit bei 4,88%.

Die isolierten Bakterien der beiden abweichenden Proben wurden mittels 16S rRNA-Gensequenzierung untersucht. In beiden Fällen wurde *A. acidocaldarius* identifiziert. Die Vermutung, dass die Ursache für die Abweichung auf den verwendeten Primer bzw. eine Sequenzveränderung des identifizierten Wildstammes von *A. acidocaldarius* in der definierten Zielregion zurückzuführen sein könnte, wurde widerlegt. Mittels IFU-Methode Nr. 12 konnte in diesen Proben *Alicyclobacillus spp.* nachgewiesen werden. Mit den auf BAT-Agar gewachsenen Kolonien wurde erneut eine real-time PCR mit denselben spezifischen Alicyclobacillus-Primern durchgeführt. Hier konnte *Alicyclobacillus spp.* nachgewiesen werden.

Eine eventuelle fehlerhafte Durchführung der real-time PCR ist unwahrscheinlich, da die Ergebnisse mehrfach reproduziert werden konnten.

Zur eindeutigen Klärung dieser beiden unplausiblen Ergebnisse wären weitere Untersuchungen erforderlich, empfehlenswert wären eventuell PCR-Versuche mit veränderten Reaktionsbedingungen, wie beispielsweise längere Denaturierungsschritte.

5.3 Verfahrensvergleich IFU-Nr. 12 – real-time PCR

In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der statistischen Berechnungen nochmals zusammengefasst.

Tab. 14: Zusammenfassung der statistischen Berechnungen

PA	NA	ND	PD	Summe	Relative Genauigkeit AC (%)	N+	Relative Empfindlichkeit SE (%)	N-	Relative Spezifität SP (%)
				N	$\frac{100 \cdot (PA+NA)}{N}$	PA+ND	$\frac{100 \cdot PA}{N+}$	Na+PD	$\frac{100 \cdot NA}{N-}$
39	19	2	0	60	96,7%	41	95,1%	19	100%

(DIN EN ISO 16140:2003, S. 11)

Die Untersuchung auf Abwesenheit (negative Ergebnisse) von *Alicyclobacillus spp.* im Vergleich des Referenzverfahrens der IFU-Methode Nr.12 zum Alternativverfahren real-time PCR, erbrachte eine vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse. Die relative Spezifität beträgt 100%.

Die Übereinstimmung der mit dem Referenzverfahren ermittelten positiven Ergebnisse betrug im Vergleich mit dem real-time PCR-Verfahren 95,1% (relative Empfindlichkeit). Falsch negative real-time PCR-Ergebnisse wurden in 4,9% gefunden.

Insgesamt beträgt der Grad der Übereinstimmung (relative Genauigkeit) zwischen dem Referenzverfahren und dem Alternativverfahren 96,7%.

Die IFU-Methode Nr. 12 zur Untersuchung auf Anwesenheit / Abwesenheit von *Alicyclobacillus spp.* ist die zuverlässige Methode, wenn es um den Nachweis von Alicyclobazillen geht. Die Zeit bis zum sicheren negativen Ergebnis beträgt zwölf Tage.

Da der Grad der Übereinstimmung zwischen den beiden Verfahren 96,7% beträgt, ist auch die real-time PCR zum Nachweis von *Alicyclobacillus spp.* geeignet. Wie aus den Daten hervorgeht, ist eine siebentägige Anreicherung der Proben in BAT-Bouillon unerlässlich, um ein zuverlässiges Ergebnis mittels real-time PCR-Verfahren zu erzielen. Das Ergebnis liegt hier bereits nach sieben Tagen vor.

5.4 Wachstumsverhalten und Generationszeiten

Anhand des Wachstumsverhaltens konnten zwei Gruppen von Alicyclobazillen unterschieden werden.

Erstens, Alicyclobazillen mit einer kurzen lag-Phase, die bereits nach ein - drei Tagen mittels real-time PCR nachgewiesen werden konnten. Diese haben im Mittel eine Generationszeit von vier Stunden.

Zweitens, Alicyclobazillen mit einer lag-Phase von bis zu drei Tagen, die mittels real-time PCR nach vier – sieben Tagen nachweisbar waren. Die Generationszeit beträgt im Mittel zwölf Stunden.

Die Vermutung, dass es sich um verschiedene Arten der Gattung *Alicyclobacillus spp.* handelt, die ein unterschiedliches Wachstumsverhalten in der BAT-Bouillon aufweisen, konnte nicht bestätigt werden.

Mittels 16S rRNA-Gensequenzierung wurden stichprobenartige Identifizierungen durchgeführt. Hier konnte in beiden Wachstumsgruppen *A. acidocaldarius* nachgewiesen werden.

Das unterschiedliche Wachstumsverhalten könnte jedoch auf die verschiedenen Anpassungsmöglichkeiten der Alicyclobazillen an die BAT-Anreicherungsbouillon zurückzuführen sein.

Die Anlaufphase umfasst das Zeitintervall zwischen dem Beimpfen und dem Erreichen der maximalen Teilungsrates. Die Bakterien vermehren sich in dieser Phase nur langsam, da hier die Ausbildung von Enzymen und Transportsystemen

stattfindet, um die angebotenen Substrate zu verwerten. Die Dauer der Anlaufphase ist insbesondere von der Eignung der Nährlösung und des Impfmateri als abhängig (Fuchs, G., 2007, S. 174).

Alicyclobazillen, die durch schädliche Umweltbedingungen und Stresssituationen, wie beispielsweise Kühlung, intensive Lichteinstrahlung oder durch Einwirkungen während des Produktionsprozesses, eine subletale Schädigung der Zellen erlitten haben, benötigen demzufolge länger, um sich an die neuen Bedingungen in der Nährlösung anzupassen und entsprechende Enzyme neu zu synthetisieren.

Bei Alicyclobazillen, die keine Schädigung der Zellen erlitten haben, läuft dieser Prozess vermutlich schneller ab und dementsprechend sind hier kürzere lag-Phasen und eine schnelle Vermehrung zu verzeichnen.

5.5 Nachweisgrenze der real-time PCR für *Alicyclobacillus spp.*

Die Mindestzellzahl für das Verfahren der real-time PCR für *Alicyclobacillus spp.* wird von der A.I.J.N. auf 100KbE pro ml Probe geschätzt (A.I.J.N., 2008, S. 24). Diese Angabe galt es zu überprüfen.

Zur Bestimmung dieser Nachweisgrenze wurden nach jeweils 24 Stunden die Keimgehalte von *Alicyclobacillus spp.* / 10g aus den entsprechenden BAT-Anreicherungsbouillons bestimmt und parallel dazu eine real-time PCR durchgeführt.

In 18% der real-time PCR positiven Proben wurde ein positives Ergebnis bereits bei Keimgehalten von $\leq 100\text{KbE} / 1\text{mL}$ ermittelt. In 82% der real-time PCR positiven Proben bei Keimgehalten von $\geq 100\text{KbE} / 1\text{mL}$.

Mittels real-time PCR aus der Verdünnungsreihe des Stammes *A. acidoterrestris* ATCC 49025 ergaben sich positive Ergebnisse bei Keimgehalten von $\geq 100\text{KbE} / 1\text{mL}$.

Die Angaben der A.I.J.N. wurden somit bestätigt. Die ermittelte Nachweisgrenze der real-time PCR für den Nachweis von *Alicyclobacillus spp.* liegt bei $\geq 100\text{KbE} / 1\text{mL}$. Bei einem Keimgehalt von $\leq 100\text{KbE} / 1\text{ mL}$ kann es zu falsch negativen real-time PCR-Ergebnissen kommen.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte die Frage geklärt werden, ob beim Nachweis von *Alicyclobacillus spp.* mittels real-time PCR Verfahren, Ergebnisse schneller zur Verfügung stehen, als durch die kulturelle Methode gemäß IFU-Nr. 12. Erwartet wurde ein sicheres PCR-Ergebnis nach zwei – drei Tagen.

Hierzu wurden 60 mit *Alicyclobacillus spp.* „natürlich“ kontaminierte Saftkonzentrat-Proben sowohl mit der kulturellen Methode der IFU-Nr. 12, als auch mit dem Verfahren der real-time PCR untersucht. Anschließend erfolgte ein Vergleich der beiden Verfahren gemäß DIN EN ISO 16140:2003.

Des Weiteren galt es, die Nachweisgrenze der real-time PCR zu ermitteln. Dies erfolgte zudem anhand einer quantifizierten Verdünnungsreihe mit dem Stamm *A. acidoterrestris* ATCC 49025.

Die Untersuchungen ergaben, dass ein Nachweis von *Alicyclobacillus spp.* mittels real-time PCR bei Keimgehalten von $\geq 100\text{KbE} / 1\text{mL}$ erfolgen konnte. Um diesen Keimgehalt von $\geq 100\text{KbE} / 1\text{mL}$ zu erhalten, ist eine Voranreicherung der Proben in BAT-Anreicherungsbouillon für *Alicyclobacillus spp.* unerlässlich.

Nach zwei Tagen Bebrütung der beimpften BAT-Bouillon konnte in 48,79% der Proben mit wachstumsfähigen Alicyclobazillen mittels real-time PCR *Alicyclobacillus spp.* nachgewiesen werden, nach drei Tagen konnte mittels real-time PCR ein Nachweis in 68,29% dieser Proben erfolgen. Nach sieben Tagen Bebrütung der beimpften Bouillon konnte in 95,12% der Proben mit wachstumsfähigen Alicyclobazillen mittels real-time PCR *Alicyclobacillus spp.* nachgewiesen werden. Falsch negative real-time PCR-Ergebnisse ergaben sich bei zwei Proben mit wachstumsfähigen Alicyclobazillen (entspricht 4,88%).

Mit dem Referenzverfahren IFU-Methode Nr. 12 konnte in 100% der wachstumsfähigen Proben *Alicyclobacillus spp.* nachgewiesen werden.

Insgesamt beträgt der Grad der Übereinstimmung zwischen dem Referenzverfahren (IFU-Methode Nr. 12) und dem Alternativverfahren (real-time PCR) 96,7%.

Fazit:

Aufgrund der ermittelten Untersuchungsergebnisse ist eine siebentägige Anreicherung der zu untersuchenden Saftkonzentrat-Proben in BAT-Anreicherungsbouillon unerlässlich, um einen zuverlässigen Nachweis auf *Alicyclobacillus spp.* mittels real-time PCR-Verfahren zu führen. Das Ergebnis liegt bereits nach sieben Tagen vor. Die Wahrscheinlichkeit falsch negativer Ergebnisse nach einer siebentägigen Anreicherung beträgt nahezu 5%.

Eine vorzeitige real-time PCR-Untersuchung der Anreicherungsbouillon auf *Alicyclobacillus spp.*, beispielsweise nach drei Tagen, ist nicht empfehlenswert. Hier liegt die Wahrscheinlichkeit falsch negativer Ergebnisse bei fast 32%.

Das Referenzverfahren IFU-Methode Nr. 12 zur Untersuchung auf Anwesenheit / Abwesenheit von *Alicyclobacillus spp.* ist weiterhin die zuverlässige Methode. Die Zeit bis zum sicheren negativen Ergebnis beträgt jedoch zwölf Tage.

7 Abstract

Within the framework of this diploma thesis there should be examined, if the molecular-biological method of real-time PCR supplies a faster result in detection of *Alicyclobacillus spp.* than the cultural method of IFU-No. 12. A certain PCR-result within two – three days was expected.

For this, 60 with *Alicyclobacillus spp.* “naturally” contaminated samples were examined with both methods. Subsequently, the two methods were compared according to DIN EN ISO 16140:2003.

Further the detection limit of real-time PCR was to be specified. This was examined with a quantified dilution row with the bacteria *A. acidoterrestris* ATCC No. 49025.

The analysis resulted a detection limit of real-time PCR of $\geq 100\text{cfu} / 1\text{ml}$. For this reason preincubation of samples in BAT-Bouillon is absolutely necessary.

After two days of incubation 48.79% of the samples with viable of growth *Alicyclobacillus spp.* show a positive result in real-time PCR, after three days of incubation 68.29% of these samples were positive. After an incubation-time of seven days in 95.12% of the mentioned samples *Alicyclobacillus spp.* could be proven by using the method of real-time PCR. False negative real-time PCR-results were given in two samples with viable of growth *Alicyclobacillus spp.* (4.88%).

By using the reference-method IFU-No. 12 100% of viable of growth *Alicyclobacillus spp.* could be proven.

Altogether the degree of correlation between IFU-method No. 12 and real-time PCR is 96.7%.

Result:

Due to the determined results a preincubation of juice-concentrate-samples in BAT-Bouillon for seven days is essential for a reliable proof of *Alicyclobacillus spp.* by using the method of real-time PCR. The result is already present after seven days. The probability of false negative results is nearly 5%.

A premature investigation by using real-time PCR, for example after three days, is not recommendable. Here the probability of false negative results amounts to nearly 32%.

The reference-method IFU-No. 12 for investigation of presence / absence of *Alicyclobacillus spp.* is still the reliable method. However the time to the correct negative result amounts to twelve days.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Wachstumsphasen der Mikroorganismen.....	15
Abb. 2: Einfluss der Wasseraktivität auf das Wachstum von Mikroorganismen ...	19
Abb. 3: Einteilung der Mikroorganismen nach ihrem Temperaturverhalten.....	20
Abb. 4: Morphologische Merkmale von <i>Alicyclobacillus spp.</i>	24
Abb. 5: Strukturformeln der Geruchskomponenten	26
Abb. 6: Die Struktur der DNA	33
Abb. 7: Die Teilschritte der PCR.....	35
Abb. 8: Typische Filterkolonien von <i>Alicyclobacillus spp.</i> auf BAT-Agar	49
Abb. 9: Anreicherung von <i>Alicyclobacillus spp.</i> in BAT-Anreicherungsbouillon....	50
Abb. 10: Positiver Ösenausstrich auf BAT-Agar.....	51
Abb. 11: Negativer Ösenausstrich auf PC-Agar	51
Abb. 12: Alicyclobazillen-Anreicherung in einem Eppendorftube	52
Abb. 13: Anionenaustauschersäulen.....	53
Abb. 14: Typische Amplifikationskurven positiver real-time PCR	59
Abb. 15: Verdünnungsreihe von <i>A. acidoterrestris</i> in NaCl-Lösung.....	63
Abb. 16: Wachstumsverhalten von <i>Alicyclobacillus spp.</i> in BAT-Bouillon	67
Abb. 17: Ergebnisse der real-time PCR	69
Abb. 18: Zusammengefasste Ergebnisse der real-time PCR	70
Abb. 19: Wachstumskurven von <i>Alicyclobacillus spp.</i>	74
Abb. 20: Wachstumskurven nach 24h.....	75
Abb. 21: Wachstumskurven nach 48h.....	75
Abb. 22: Wachstumskurven nach 72h.....	75
Abb. 23: Wachstumskurven nach 96h.....	75
Abb. 24: Wachstumskurven nach 120h.....	75
Abb. 25: Wachstumskurven nach 144h.....	76
Abb. 26: Wachstumskurven nach 168h.....	76
Abb. 27: Nachweisgrenze PCR-positiver Proben.....	81

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Chemische Zusammensetzung von Fruchtsäften	9
Tab. 2: Auswirkungen mikrobieller Aktivität in Säften.....	14
Tab. 3: pH-Werte für das Wachstum von Mikroorganismen.....	17
Tab. 4: Hitzeresistenz von Alicyclobacillus-Sporen in Orangensaftkonzentrat	27
Tab. 5: Pipettierschema zur Erstellung des PCR Master Mix	56
Tab. 6: PCR-Bedingungen für die Amplifikation von Alicyclobacillus-DNA.....	58
Tab. 7: Animpfkonzentrationen von <i>Alicyclobacillus spp.</i> für die BAT-Bouillon	65
Tab. 8: Übereinstimmungen/Abweichungen zwischen IFU-Nr. 12 und PCR.....	71
Tab. 9: Generationszeiten von <i>Alicyclobacillus spp.</i>	77
Tab. 10: Wachstum der Kultur - Beimpfungsversuch I	78
Tab. 11: PCR-Ergebnisse - Beimpfungsversuch I.....	79
Tab. 12: Wachstum der Kultur - Beimpfungsversuch II	79
Tab. 13: PCR-Ergebnisse - Beimpfungsversuch II.....	80
Tab. 14: Zusammenfassung der statistischen Berechnungen.....	86

Literaturverzeichnis

Literatur

Back, W. (Hrsg.): Mikrobiologie der Lebensmittel; Getränke, Hamburg (Behr's Verlag GmbH & Co), 2008

Back, W.: Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie Teil II, Nürnberg (Hans Carl, Getränke-Fachverlag), 2000

Bast, E.: Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken, 2. Auflage, Heidelberg (Spektrum Akademischer Verlag GmbH), 2001

Baumgart, J.; Becker, B. (Hrsg.): Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln, 5. Auflage, Hamburg, (Behr's Verlag), 2004

Baumgart, J.; Firnhaber J.: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln - Loseblattsammlung, 43. Aktualisierungs-Lieferung 11/2008, Hamburg, (Behr's Verlag), 2008

Clark, D. P.: Molecular Biology – Understanding the Genetic Revolution, (Spektrum Akademischer Verlag GmbH), 2006

Cypionka, H.: Grundlagen der Mikrobiologie, 3. überarbeitete und erweiterte Auflage, Berlin, Heidelberg, New York (Springer-Verlag), 2006

Dittrich, H. H. (Hrsg): Mikrobiologie der Lebensmittel: Getränke, Hamburg (Behr's Verlag GmbH & Co), 1998

Fuchs, G. (Hrsg.): Allgemeine Mikrobiologie, 8. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart, New York (Georg Thieme Verlag), 2007

Jay, J. M.; Loessner, M. J.; Golden, D. A.: Modern Food Microbiology, 7th edition, New York (Springer), 2005

Keweloh, Dr. H.: Mikroorganismen in Lebensmitteln: Theorie und Praxis der Lebensmittelhygiene, 2. Auflage, Haan-Gruten, (Fachbuchverlag Pfannberg GmbH & Co.KG), 2008

Krämer, J.: Lebensmittel-Mikrobiologie, 5. korrigierte und neu bearbeitete Auflage, Stuttgart, (Verlag Eugen Ulmer KG), 2007

Mackay, I. M.: Real-Time PCR in Microbiology – From Diagnosis to Characterization, Norfolk, UK, (Caister Academic Press) 2007

Mülhardt, C.: Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics, 5. Auflage, München, (Spektrum Akademischer Verlag), 2006

Oxoid GmbH (Hrsg.): Oxoid Handbuch, 6. aktualisierte deutsche Auflage, Wesel, (VVA Vereinigte Verlagsanstalten), 2003

Renneberg, R.: Biotechnologie für Einsteiger, München, (Spektrum Akademischer Verlag GmbH), 2006

Schobinger, U. (Hrsg.): Frucht- und Gemüsesäfte, 3. Auflage, Stuttgart, (Eugen Ulmer GmbH & Co), 2001

Yokota, A.; Fujii, T.; Goto K. (Eds.): Alicyclobacillus: Thermophilic Acidophilic Bacilli, Tokyo, Berlin, Heidelberg, New York (Springer), 2007

Skript

Kopra, N.: Mikrobiologie, Hamburg, 2006

Zeitschriften

Connor, C.J. et al.: Development of a real-time PCR-based system targeting the 16S rRNA gene sequence of rapid detection of Alicyclobacillus spp. in juice products, in: International Journal of Food Microbiology, 99 (2005), 229-235

Maldonado, M.C.; Belfiore, C.; Navarro, A.R.: Temperature, soluble solids and pH effect on Alicyclobacillus acidoterrestris viability in lemon juice concentrate, in: Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35 (2008), 141-144

Oliver, J.D.: The Viable but Nonculturable State in Bacteria, in: The Journal of Microbiology, 43 (2005), 93-100

Saiki, R. et al.: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis of sickle cell anemia, in: Science, 230 (1985), 1350-1354

Normen

DIN EN ISO 16140:2003: Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Verfahren, September 2003

IFU-Method No. 12: First Standard IFU-Method on the Detection of Alicyclobacillus in Fruit Juices, January 2004/February 2006

IFU-Method No. 12: Method on the Detection of taint producing Alicyclobacillus in Fruit Juices, revision1, September 2004

Arbeitsanweisungen

Fa. Döhler GmbH: Guajakol Nachweis Kit (Artikel 2.04737.991), Darmstadt, September 2006

Fa. Roche Diagnostics GmbH: High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat. No. 11 796 828 001), Mannheim, February 2008

Fa. Roche Diagnostics GmbH: LightCycler TaqMan Master (Cat. No. 04 535 286 001) Mannheim, April 2006

Veröffentlichungen

A.I.J.N: Alicyclobacillus Best Practice Guideline – A guideline for the reduction and control of thermophilic, sporeforming bacteria (Alicyclobasillus species, ACB) in the production, packing and distribution of fruit juices, juice concentrates, purees and nectars, Brüssel, 2008

Roche Diagnostics GmbH: Polymerase-Kettenreaktion – Amplicor-Produkte im diagnostischen Routinelabor, Wien, 1998

Dissertation

Petersmann, A.: Mitochondriale und nukleäre Mikrosatelliteninstabilität in Kopf- und Halstumoren, Dissertation, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, 2005

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich und sinngemäße Zitate aus anderen Werken sind als solche, unter Angabe der Quelle, kenntlich gemacht.

Hamburg, den 2. Juli 2009

Annette Ellenberger