

Zum Nachweis von *Alicyclobacillus*-Arten aus Konzentraten und Säften

Durch die Kombination von mikrobiologischen Kultivierungsmethoden mit der PCR und einem Lateral Flow System ist ein schneller Nachweis von *Alicyclobacillus* binnen vier Tagen möglich

| ACB | Guajacol-Test | IFU | Konzentrate | Säfte |

Bakterien der Gattung *Alicyclobacillus* (ACB) sind vor allem als Verderbsorganismen in Fruchtsäften bekannt. ACB gelten als nicht pathogen für Mensch und Tier. Der natürliche Lebensraum von ACB ist der Erdboden, sie sind weltweit verbreitet (Hippchen et al., 1981). Aus biologischer Sicht ist dies insofern ungewöhnlich, da die acido- und thermophilen Eigenschaften, d. h. säure- und wärme liebend, der Bakterien eher einen extremen Standort vermuten lassen. Tatsächlich wurden *Alicyclobacillus*-Stämme erstmals aus einer heißen japanischen Quelle (Uchino et al., 1967) und in Erd- und Wasserproben im Yellowstone Nationalpark und im Hawaiian Volcano National Park (Darland et al., 1971) isoliert.

Als acido- und thermophile Sporenbildner können ACB nur in einem engen pH-Bereich von 3,5 bis 4,0 und bei Temperaturen von 20 °C bis 70 °C wachsen. Die Bakterien oder deren hitzeresistente Sporen können über Staub und Erdboden auf Früchte und in daraus hergestellte Produkte gelangen. Sporen von ACB werden durch die Hitzeeinwirkung bei der Pasteurisation nicht inaktiviert, sondern erst der Hitzeschock kann zum Auskeimen der Sporen führen. Insbesondere in Fruchtsäften können ACB durch Fehl- aromabildung Verderbserscheinungen verursachen. Die betroffenen Säfte riechen unangenehm chemisch, sichtbare Veränderungen sind meist nicht zu erkennen. Der erste Fall wurde in der Literatur 1982 beschrieben (Cerny

Methode	Arbeit	Woche 1							Woche 2							Woche 3							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
	filtrierbar quantitativ	10 T	→																				
	Inkubation	5 T	[Green bar] < 1 KBE /X g																				
	Bestätigung	5 T	Verdacht: [Red bar] n KBE /X g																				
	nicht-filtrierbar quantitativ	10 T	→																				
	Inkubation	5 T	[Green bar] negativ /X g																				
	Bestätigung	5 T	Verdacht: [Red bar] positiv /X g																				
	nicht-filtrierbar qualitativ	15 T	→																				
	Anreicherung	5 T	[Orange bar]																				
	Inkubation	5 T	Verdacht: [Green bar] < 10 KBE /g																				
	Bestätigung	5 T	Verdacht: [Red bar] n KBE /g																				
	Schnellmethode	5 T	→																				
	Anreicherung	2 T	[Orange bar]																				
	Wachstumsüberwachung	2 T	[Purple bar] negativ /X g																				
	Bestätigung	1 T	Verdacht: [Red bar] PCR + Lateral-Flow-Test positiv /X g																				
Legende:		Anreicherung: [Orange bar] Inkubation: [Green bar] Bestätigung: [Red bar] Wachstumskurve: [Purple bar]																			Ergebnisangabe: X: Einwaage [g] n: Keimzahl [KBE]		

Abb. 1: IFU Methode Nr. 12: Die Zeit bis zum sicheren negativen Ergebnis kann hier bis zu 15 Tage betragen.

© GfL

et al., 1984). Apfelnektar mit einem pH-Wert von 3,15 verdarb nach einigen Wochen Lagerung trotz Pasteurisation (92 °C, 10 s). Mikroskopisch ließen sich im betroffenen Apfelsaft stäbchenförmige Sporenbildner nachweisen. Die mikrobiologische Anzucht der Bakterien gelang mit den üblichen Standardnährböden der Branche zunächst nicht. Erst nach der Entwicklung neuer Nährmedien für den optimalen Wachstumsbereich von pH 3,5 bis 4,0 konnten ACB kultiviert werden. Im nur schwach sauren bis neutralen pH-Bereich stellen ACB das Wachstum ein. Der unangenehme Geruch der verdorbenen Säfte wird durch die Bildung von Guajacol verursacht. Die Produktion von Guajacol korreliert mit der Wachstumskurve. Das heißt, wenn sich die zur Guajacolbildung befähigten ACB vermehren, wird entsprechend mehr Guajacol gebildet (Pettipher et al., 1997). Der in der Fruchtsaftindustrie bekannteste Verderbserreger der ACB ist *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Nachweisverfahren

Im Jahr 2001 begann die Internationale Fruchtsaftunion (IFU) mit der Standardisierung der Analyse, die im September 2004 in einer kulturellen Methode zur Bestimmung von *Alicyclobacillus* spp. in Fruchtsaft mündete (IFU Handbook, 2004). Als mikrobiologisches Referenzverfahren gilt seitdem weltweit die zuverlässige Methode Nr. 12 der International Fruit and Vegetable Juice Association (IFU), die in neuer Fassung seit April 2019 vorliegt. Zwei wesentliche Änderungen zur Vorversion haben sich ergeben. Es wird zum ACB Nachweis ausschließlich BAT-Agar oder BAT-Bouillon verwendet und zur Bestimmung der Anzahl von ACB in nicht filtrierbaren Produkten wird das Gussplattenverfahren von 1 g Produkt vorgeschrieben.

Die Keimzählung oder der Nachweis von *Alicyclobacillus* spp. erfordert ein unterschiedliches Vorgehen im Labor, methodisch sind drei Varianten entsprechend IFU Nr. 12 (2019) möglich.

- A) Bestimmung der Anzahl von *Alicyclobacillus* spp. für nicht filtrierbare Proben mittels Gussplattenverfahren
- B) Bestimmung der Anzahl von *Alicyclobacillus* spp. für filtrierbare Proben mittels Membranfiltration
- C) Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit von *Alicyclobacillus* spp. durch Anreicherung von 10 g Probe

Werden *Alicyclobacillus* Spezies mit dem Referenzverfahren IFU 12 nachgewiesen, liegen die Ergebnisse frühestens nach 12 Tagen, in der Regel erst nach fast zwei Wochen vor (siehe Abbildung 1 und 2). Bei Vorliegen von Einzelkolonien bietet sich eine Bestätigung/Identifikation mittels MALDI-TOF MS an sich an, um die Analysendauer zu verkürzen.

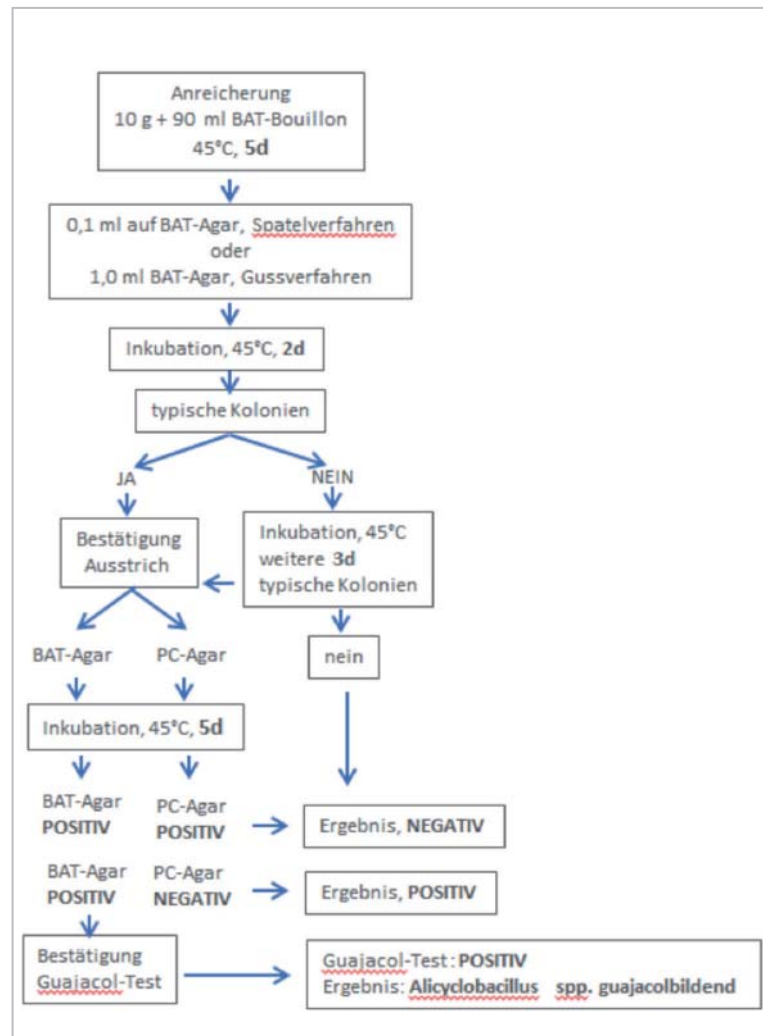


Abb. 2: *Alicyclobacillus*-Nachweis Verlaufsschema IFU 12 Variante C

Tab. 1: Klassische Bestätigung charakteristischer Kolonien gemäß IFU Nr. 12 (siehe auch Abbildung 1 und 2)

Wachstum auf PC-Agar (neutrales Medium)	Wachstum auf BAT-Agar	Ergebnisse nach 72 ± 4 h, Inkubation
+	+	Negativ <i>Alicyclobacillus</i> spp. – nicht nachgewiesen
-	+	Positiv <i>Alicyclobacillus</i> spp. – nachgewiesen

Der Guajacol-Test wird zur weiteren Bestätigung von verdächtigen Kolonien und zur Einschätzung des Verderbrisikos empfohlen.

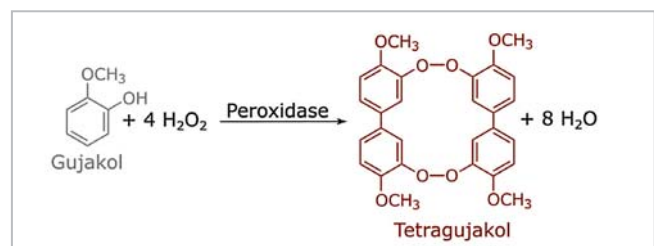


Abb. 3: Bei dem biochemischen Nachweis wird das farblose Guajacol enzymatisch in den farbigen Komplex Tetragujacol umgewandelt.

Zeit bis zum Ergebnis

Der Wunsch, die Analytik zu beschleunigen, ist sowohl von Seiten der Rohwaren-Lieferanten als auch Abfüller sehr groß. Immer wieder wird von Testanbietern mit einer schnellen Diagnostik wie beispielsweise der PCR geworben. Denn üblicherweise erlaubt die Polymerasekettenreaktion (PCR) eine höhere Empfindlichkeit im Vergleich zu kulturellen Methoden, so dass es nahe liegt, aus Anreicherungsbouillons, früher als von der IFU-Methode empfohlen, einen molekularbiologischen Test durchzuführen. Bei schnell vermehrungsfähigen und pathogenen Erregern wie beispielsweise bei Salmonellen ist die 24 h Schnell-Analytik aus geeigneten Lebensmitteln schließlich zum Branchenstandard geworden.

Die IFU-Methode Nr. 12 gilt weltweit als Referenzverfahren. Haben andere Verfahren Vorteile, z. B. eine kürzere Zeit bis zum Ergebnis, müssen die Ergebnisse des Alternativverfahrens vergleichbar und ebenso zuverlässig sein, wie die mit dem Referenzverfahren erzielten. Alternativ- und Referenzverfahren müssen dafür entsprechend der DIN EN ISO 16140 validiert werden. Im Rahmen einer Diplomarbeit (Ellenberger) wurden bereits 2009 natürlich ACB kontaminierte Säfte mittels real time PCR aus Anreicherungen untersucht und hinsichtlich schnellst möglicher Analytik validiert.

Hierbei stellte sich heraus, dass eine 5 tägige, am besten sogar 7 tägige Anreicherung in BAT-Bouillon, unerlässlich ist (siehe Abbildung 4). Verkürzungen etwa auf 3 Tage, wie häufig von Anbietern kommerzieller PCR-Kits vorgegeben wird, sind nicht empfehlenswert, da hier aufgrund des Wachstumsverhaltens von ACB mit falsch negativen Ergebnissen bei einem erheblichen Anteil (28 %) der Fälle zu

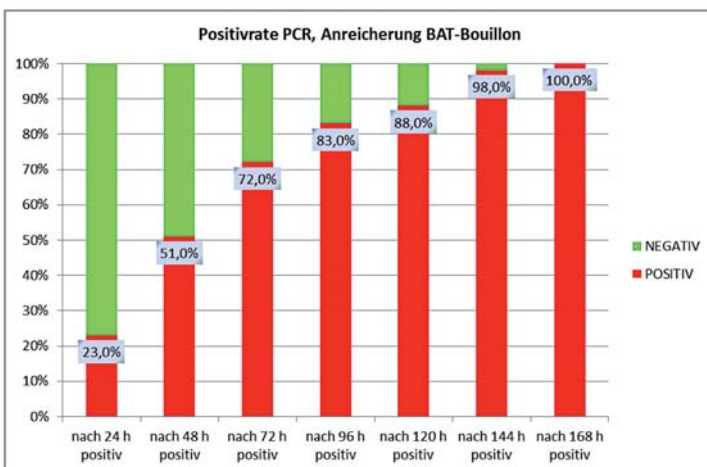


Abb. 4: Natürlich mit ACB kontaminierte Säfte benötigten bis zu 7 Tage Inkubationszeit, damit der PCR ACB Nachweis zuverlässig ist (Ellenberger, 2009)

rechnen ist. Insgesamt konnten grob zwei Gruppen von ACB identifiziert werden. Jene ACB mit einer kurzen lag-Phase und einer Generationszeit von nur 4 h sowie diejenigen ACB mit einer längeren lag-Phase und einer Generationszeit von 12 h. Konzentrationsabhängig können dementsprechend ACB erst nach bis zu 7 Tagen nachweisbar sein (Abbildung 5).

Künstlich kontaminierte Proben, wie sie häufig für die Methoden-Entwicklung eingesetzt werden, verhalten sich häufig anders als „natürlich“ kontaminierte Proben. Daraus abgeleitete Werbeversprechen von sogenannten Schnelltests sind stets kritisch zu hinterfragen und immer durch Vergleichsuntersuchungen zu belegen. Denn auch zum Nachweis der DNA mit der empfindlichen PCR darf nicht vergessen werden, dass sich die Zielbakterien auch dafür entsprechend vermehren müssen.

Die Nachweisgrenzen für *Alicyclobacillus* spp. liegen in der PCR im Bereich von 100 KBE/ml.

Zweistufige Anreicherung

Ein schnellerer und ebenso zuverlässiger Nachweis von *Alicyclobacillus* spp. ist mit dem Alternativverfahren Soleris ACB-System möglich. Durch eine zweistufige Anreicherung von 10 g Probe (2 Tage in BAT-Bouillon und folgender Überführung von 1 ml in das Soleris-Vial mit Bouillon, Abbildung 6) können ACB bereits nach zwei bis vier Tagen nachgewiesen werden. Das Soleris-Vial enthält eine für ACB geeignete Bouillon und einen CO₂-Indikator. Wenn Mikroorganismen wie ACB sich vermehren und CO₂ ausscheiden, kommt es zu einer Farbänderung, die durch optische Sensoren des Soleris Instruments nachgewiesen werden.

Anhand von eigenen Untersuchungen wurden die Vergleichsuntersuchungen zwischen dem Referenz- und dem

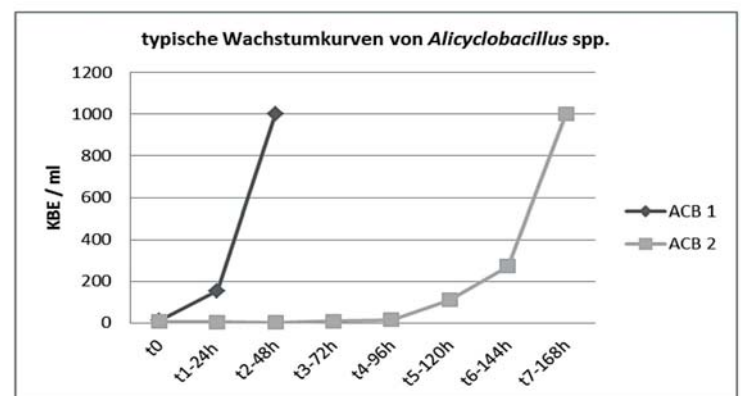


Abb. 5: typische Wachstumskurven von *Alicyclobacillus* spp., schnell wachsend ACB 1, langsam wachsend ACB 2 (Ellenberger, 2009)



Abb. 6:
Soleris – ACB Vial 109

Alternativverfahren gemäß DIN EN ISO 16140 der NEOGEN GmbH bestätigt und erweitert. Im Soleris Vial können auch einige Nicht-ACB wachsen. Bei den durchgeführten Vergleichsuntersuchungen von Routineproben haben beispielsweise *Bacillus ginsengihumi* und *Bacillus fumarioli* im Soleris-ACB System zu positiven Ergebnissen geführt.

Tab. 2: Übereinstimmungsraten Referenzverfahren vs Alternativverfahren

	Referenzverfahren positiv	Referenzverfahren negativ
Alternativverfahren positiv	94,9 %	5,1 %
Alternativverfahren negativ	2,2 %	97,8 %

Positive Ergebnisse müssen demzufolge, wie es bei mikrobiologischen Tests üblich ist, bestätigt werden. Entweder nach IFU 12 (siehe Tabelle 1, Abbildung 2, 3) oder mit anderen gleichwertigen Verfahren. Der molekularbiologische Schnelltest der Milenia Biotec GmbH (Abbildung 7) ist zur Bestätigung von ACB aus BAT-Anreicherungen geeignet.

Auch bei der zweistufigen Anreicherung gilt zu beachten, dass die Generationszeiten und die Anzahl der ACB in der Probe einen Einfluss auf die Nachweisbarkeit haben. Nach 48 h Anreicherung in BAT-Bouillon muss sich bei der Überführung von 1 ml aus dieser Bouillon mindestens ein Bakterium ACB befinden, das in das Soleris ACB-Vial überführt wird. Ansonsten besteht die Möglichkeit falsch negativer Ergebnisse. Durch den Medienwechsel werden ACB zum Wachstum angeregt. Ein Vorteil der zweistufigen Anreicherung.

ACB Lateral-Flow-Bestätigungsverfahren

Hier bietet die molekularbiologische Bestätigung von Milenia Biotec die umfangreichsten Informationen. Die Bestätigung von im Soleris System positiven Proben erfolgt direkt aus dem ACB-Vial. Danach liegen binnen weniger Stunden die differenzierten Ergebnisse vor:

Aus der Anreicherungslösung des Soleris ACB-Vials wird zuerst die DNA extrahiert. Anschließend wird die PCR durchgeführt und via Lateral Flow auf die Anwesenheit von *Alicyclobacillus* spp., *Alicyclobacillus acidoterrestris* und die Fähigkeit der Guajacolbildung überprüft. Das Nachweissystem der Milenia Biotec GmbH für *Alicyclobacillus* kombiniert die PCR mit dem Nachweis der spezifischen PCR-Produkte durch einen Lateral Flow Teststreifen. Spezifisch markierte Primer werden zur Vervielfältigung von ACB spezifischen DNA-Fragmenten genutzt. Die dann gegebenenfalls vermehrte DNA des Zielorganismus kann über die spezifischen Teststreifen (Lateral Flow) nachgewiesen werden. Die markierten PCR Produkte binden an spezifische Antikörper der Teststreifen. Mit dem zweiten kolloidal-Gold markierten Antikörpern entsteht ein molekulares Sandwich, das an der entsprechenden Linie des Teststreifens sichtbar wird. Zudem wird eine Kontrolle mitgeführt, die anzeigt, ob die PCR durch z. B. Produktbestandteile inhibiert wurde.

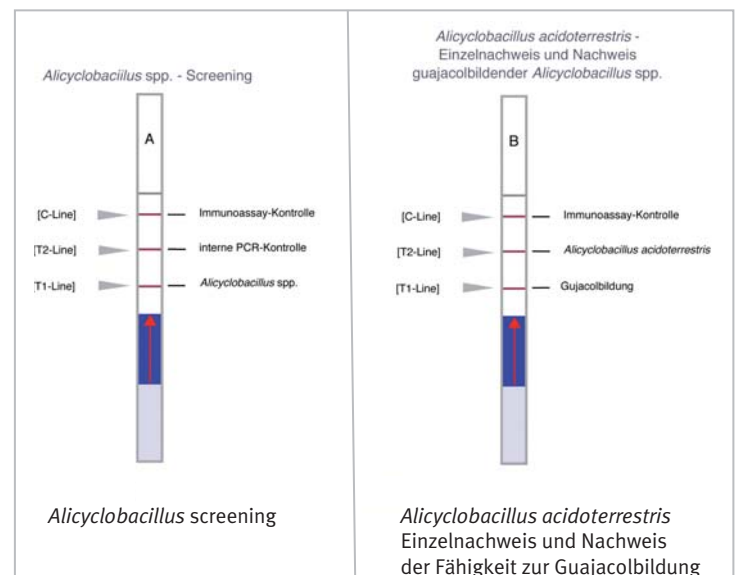


Abb. 7: Milenia Biotec Teststreifen für den ACB-PCR Nachweis

Durch das zweistufige Anreicherungsverfahren liegen negative Ergebnisse nach vier Tagen vor, positive Ergebnisse bereits nach zwei bis vier Tagen. Mittels PCR-Teststreifen werden ACB und/oder *Alicyclobacillus acidoterrestris*, die zur Guajacolbildung befähigt sind, zuverlässig detektiert. Mögliche falsch positive Ergebnisse können damit sicher ausgeschlossen werden. Die Bestätigungen von ACB durch die zeitaufwändige Kultivierung auf BAT- und PC-Agar entfällt, ebenso wie der Guajacol-Test.

Bei 75 % der Proben, die mittels Soleris ACB-System als positiv ausgewiesen wurden, lag das molekularbiologisch bestätigte Ergebnis bereits nach 3 Tagen vor.

Tab. 3: ACB Untersuchungen – Zeit bis zum Ergebnis

Untersuchungsverfahren	Zeit bis zum Ergebnis
Referenzverfahren - IFU 12 Variante C Ergebnis NEGATIV	10-15 d
Referenzverfahren - IFU 12 Variante C Ergebnis POSITIV	12-15 d
Alternativverfahren -SOLERIS Ergebnis NEGATIV	4 d
Alternativverfahren - SOLERIS - MILENIA Ergebnis POSITIV	3-4 d

Laborroutine

Im Labor werden ca. zwei Drittel der auf ACB zu untersuchenden Proben entsprechend Variante C (IFU 12, 2019) untersucht, also auf die An-/Abwesenheit von *Alicyclo-*

bacillus in 10 g Produkt. Die Positivrate liegt dort bei ca. 20 % (Abbildung 8). Bei 80 % der Proben, die auf ACB untersucht werden, ist das Ergebnis dementsprechend negativ. Hier sind weitere Untersuchungen nicht nötig.

Fazit

Die Ergebnisse des Alternativverfahrens sind mit dem Referenzverfahren vergleichbar.

Zum Nachweis von ACB mittels zweistufiger Anreicherung und anschließender molekularbiologischer Bestätigung positiver Ergebnisse (siehe Tabelle 3) liegen die Resultate im Vergleich zum Referenzverfahren IFU 12 Variante C mindestens 10 Tage früher vor. Für einen Großteil der zu untersuchenden Proben kann folglich das Alternativverfahren zur Untersuchung auf ACB eingesetzt werden.

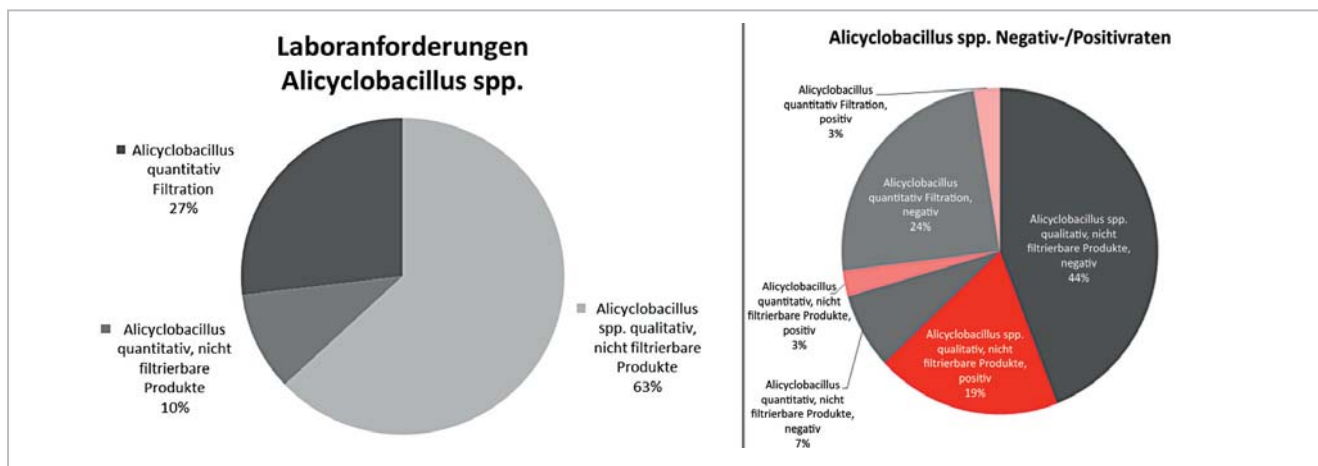


Abbildung 8: Laborroutine: Anforderungshäufigkeit und Positivrate (n=3000)

Labor-Anforderung	Produkt	Methode	Ergebnis	t _{max} d, bei positiven Proben
<i>Alicyclobacillus</i> spp. quantitativ	Nicht filtrierbar	IFU 12 A	x KBE / g	10 d
<i>Alicyclobacillus</i> spp. quantitativ	Filtrierbar*	IFU 12 B	x KBE / 10 g	10 d
<i>Alicyclobacillus</i> spp. qualitativ	Nicht filtrierbar	IFU 12 C	positiv, negativ / 10 g	13 d
<i>Alicyclobacillus</i> spp. qualitativ	Nicht filtrierbar	Soleris	positiv, negativ / 10 g	4 d

*die Anreicherung von filtrierbaren Produkten ist ebenso möglich

Bestätigungen	zu untersuchen	Methode	Ergebnis
Guajacol-Test	auffällige Kolonien	enzymatisch	neg./pos.
Identifizierung	auffällige Kolonien	MALDI TOF MS	Spezies
Identifizierung PCR	Anreicherung aus Soleris ACB 109	PCR	<i>Alicyclobacillus</i> spp., <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> Guajacolbildung

Literatur

- Hippchen B, Röhl A, Poralla K (1981) Occurrence in soil of thermophilic bacilli possessing ω -cyclohexane fatty acids and hopanoids. Arch Microbiol 129:53-55.
- Uchino F, Doi S (1967) Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. Agric Biol Chem 31:817-822.
- Darland G, Brock TD (1971) *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. J Gen Microbiol 67:9-15
- Cerny G, Hennlich W, Poralla K (1984). Fruchtsaftverderb durch Bacillen: Isolierung und Charakterisierung des Verderbserregers. Z Lebens Unters Forsch 179:224-227.
- Pettipher GL, Osmundson ME, Murphy JM (1997) Method for the detection and enumeration of *Alicyclo-bacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juices and fruit juice-containing drinks. Lett Appl Microbiol 24:185-189.
- FU Handbook Microbiological Methods (2004), Method on the Detection of taint producing *Alicyclobacillus* in Fruit Juices
- Ellenberger A, (2009) Validierung des mikrobiologischen Nachweises von *Alicyclobacillus* spp. IFU-Methode Nr. 12 versus real time PCR.

Autoren:

Burkhard Schütze

LADR GmbH MVZ Dr. Kramer & Kollegen, Geesthacht

Mikko Hofsommer

GfL Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung mbH, Berlin
www.gfl-berlin.com

GfL Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung mbH

Die GfL ist ein privates Service- und Beratungsunternehmen, das über 30 Jahre selbstständig und unabhängig für die gesamte Lebensmittelwirtschaft tätig ist. Ziel ist es, eine umfassende Dienstleistung anzubieten, die über den analytischen Bereich hinausgeht und die für angrenzende Fragestellungen kompetente Lösungen bietet.

Mit jährlich mehr als 15.000 Proben gehört die GfL heute zu den führenden Laboratorien im Bereich Fruchtsaft und verwandte Erzeugnisse. Schwerpunkte dabei sind Untersuchungen zur Qualität und Authentizität. Ein weiterer Fokus ist die Untersuchung von Rückständen und Kontaminanten wie Pestizide und Schwermetalle.

Die GfL betreut Süßmoster, Abfüller, Grundstoffhändler, Zwischenhändler und Lieferanten aus diversen Fruchtsaft exportierenden Ländern: von Brasilien/Argentinien über Florida bis hin zum Nahen Osten nach Vietnam und Thailand. Darüber hinaus werden die Dienstleistungen auch vom Einzelhandel und NGOs in Anspruch genommen.

Experts in Beverage Processing

CIBUS TEC

22.-25. Oktober 2019
Parma, Italien
Halle 5 / Stand G024

BrauBeviale

12.-14. November 2019
Nürnberg, Deutschland
Halle 9 / Stand 9-320



Modernste Prozesstechnologie für die Getränke- und Lebensmittelindustrie

Bucher Unipektin AG
Murzenstrasse 80
CH-8166 Niederweningen
Tel. +41 44 857 23 00
info@bucherunipektin.com
www.bucherunipektin.com

Bucher Unipektin AG
Competence Center Filtration
Moosmühlestrasse 8
CH-9000 St.Gallen
Tel. +41 44 857 29 00
info.ccf@bucherunipektin.com

BUCHER
unipektin