

Schnellnachweis von technologisch wichtigen Bakterien durch FTIR-Spektroskopie zur Qualitätssicherung in milchverarbeitenden Unternehmen

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle:	Technische Universität München Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Institut für Mikrobiologie Prof. Dr. S. Scherer/Dr. H. Seiler
Industriegruppen:	Milch-Industrieverband e.V., Bonn Vereinigung der Förderer und Freunde des Forschungszentrums für Milch und Lebensmittel e.V., Weihenstephan Projektkoordinatoren: Dr. W. Jung, Fa. Hochland, Reich, Summer & Co., Heimenkirch Dipl.-Ing. R. Beduhn, Fa. J. Bauer KG., Wasserburg/Inn
Laufzeit:	1998 - 2000
Zuwendungssumme:	€ 169.570,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Die Identifizierung von Mikroorganismen mit klassischen Methoden der Bestimmung von Reaktionsmustern ist aufwändig und zeitintensiv. Ergebnisse liegen erst nach einigen Tagen Bebrütung der Versuchsansätze vor. Die Auswertungen der Reaktionsmuster ergeben oft keine eindeutigen Ergebnisse, beispielsweise weil die Reaktionen nicht klar ablesbar sind oder weil in den entsprechenden Referenzlisten nur die wichtigsten - meist medizinisch relevanten - Taxa berücksichtigt sind. In dem Vorläuferprojekt AiF-FV 10768 N wurde insbesondere für Hefen gezeigt, dass die FTIR-Spektroskopie eine vorzügliche Methode für die schnelle, kostengünstige und ausreichend genaue Identifizierung ist. In einer Validierungsanalyse der Spektrenbibliothek mit 730 Stämmen wurden 97 % der Isolate richtig identifiziert.

Ziel des Forschungsvorhabens war es deshalb, für weitere Mikroorganismengruppen, die in Lebensmitteln von Bedeutung sind, Spektrenbibliotheken zu erstellen. Der Schwerpunkt der Untersuchung sollte bei den coryneformen Bakterien liegen. Zusätzlich sollten auch Essigsäurebak-

terien (*Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Frateuria*), *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, *Flavobacterium*), *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Serratia* u.a.), *Micrococcaceae* (*Micrococcus*, *Staphylococcus*), Propionsäurebakterien, Streptokokken (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*), Listerien, Lactobazillen (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*), Pediokokken und Bifidobakterien in der Untersuchung Berücksichtigung finden.

Forschungsergebnis:

Die Spektrenbibliotheken wurden erweitert und vertieft. Zusätzliche Keimgruppen wurden bearbeitet. Die Datenbanken umfassten am 01.10.2000 Hefen (915 Spektren, davon 151 Species), Coryneforme (730, 220), mesophile Bazillen (207, 43), thermophile Bazillen (44, 5), Milchsäurebakterien (385, 109), Bifidobakterien (105, 32), *Enterobacteriaceae* (230, 112), *Pseudomonadaceae* (93, 28), Mikrokokken, (85, 43), *Pasteurella* (18, 10), Essigsäurebakterien (79, 19) und Listerien (158, 6).

Die Identität vieler Stämme musste geprüft werden. Hierzu wurden konventionelle Methoden sowie 16S-rDNA-Sequenzierungen verwendet. Allein bei den Coryneformen wurden 352 Stämme sequenziert. Dies führte bei 224 Stämmen zu einer Umbenennung, d.h. 228 Stämme waren ursprünglich falsch oder nicht gültig benannt worden. Die Namen der Neuidentifizierungen zeigten deutlich höhere Korrelationen mit der FTIR-Spektroskopie als dies mit den originären Artnamen der Fall war. Bei einigen Keimgruppen kann vorerst nur mit einer Vorsortierung des Materials identifiziert werden. Diese Taxa müssen noch deutlich breiter als dies bisher der Fall ist, bearbeitet werden. Propionsäurebakterien und Pediokokken wurden nicht untersucht.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Datenbanken mit Referenzspektren konnten so weit entwickelt werden, dass in der Laborpraxis eine Identifizierung fast ausschließlich mit dieser Methode möglich ist. Nur selten muss ein Stamm aufgrund unzureichender Identifizierungsgüte zusätzlich mit konventionellen physiologischen Reaktionen bearbeitet werden. Zumeist zeigt es sich dann, dass es sich um einen Vertreter einer selten vorkommenden oder unzureichend dokumentierten Art handelt, so dass erst eine Sequenzanalyse der 16S-rDNA Klarheit über die Spezieszugehörigkeit erbringen kann.

Die Datenbanken stehen damit Industrieunternehmen zur weiteren Verwendung zur Verfügung. Alternativ erlauben sie für den Dienstleistungsbereich einen Identifizierungsservice mit bisher nicht gekannter Effizienz. Das Verfahren wurde bereits in einem milchverarbeitenden Unternehmen etabliert. Es gibt derzeit keine Methode, die vergleichbar schnell, präzise, einfach, flexibel, materialsparend und kostengünstig wäre.

Mit der chemisch-physikalischen Identifizierung von molkereiwirtschaftlichen Mikroorganismen steht ein Qualitätsmanagementverfahren zur Verfügung, dessen Anwendung kein hochspezialisiertes Personal voraussetzt. Die neue Methode der Keimidentifizierung hat mehrfache wirtschaftliche Perspektiven für die Unternehmen z.B. durch

- a) erhöhte Produktsicherheit und Qualitätsverbesserung
- b) präventives Qualitätsmanagement
- c) schnelle Problemfallanalyse.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2000.
2. Oberreuter, H., Mertens, F., Seiler, H., Scherer, S.: Quantification of microorganisms in binary mixed populations by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Lett. App. Microbiol.* 30, 85-89 (2000).
3. Oberreuter H., Seiler, H., Scherer, S.: Identifizierung coryneformer Bakterien durch Fourier-transformierte Infrarot (FT-IR)-Spektroskopie. *Info-Bulletin „Forum FT-IR-Diagnostik“* Mai 2000, RKI Berlin (2000).
4. Paramithiotis, S., Müller, M. R. A., Ehrmann, M. A., Tsakalidou, E., Seiler, H., Vogel, R., Kalantzopoulos, G.: Polyphasic identification of wild yeast strains isolated from Greek sourdoughs. *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 156-164 (2000).
5. Foierl, M., Scherer, S. und Seiler, H.: Identifizierung von Milchsäurebakterien aus Milchprodukten. *Jahresbericht Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel, Freising*, 99-100 (2000).
6. Scherer, S. und Seiler, H.: Computergestütztes Identifizierungssystem (FTIR-Technologie) für Starterkulturen und Verderbsorganismen in der Lebensmittelindustrie. *Tagungsband 60. Diskussionstagung des Forschungskreises der Ernährungsindustrie*, 49-54 (2002).

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel
Institut für Mikrobiologie
Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising
Tel.: 08161/713516, Fax: 08161/714512
E-Mail: siegfried.scherer@wzw.tum.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: 0228/372031, Fax: 0228/376150
E-Mail: fei@fei-bonn.de