

Diagnostik von Mikroorganismen durch mikroskopunterstützte FTIR-Spektroskopie: Schnelle mikrobielle Populationsanalysen bei Lebensmitteln

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle:	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- u. Lebensmittelforschung Abt. Mikrobiologie, Freising-Weihenstephan Prof. Dr. S. Scherer
Industriegruppe:	Milchindustrie-Verband e. V., Bonn
Projektkoordinatoren:	Dipl.-Ing. R. Beduhn, Bauer KG, Wasserburg Dr. W. Jung, Hochland AG, Heimenkirch
Laufzeit:	2000 – 2003
Zuwendungssumme:	€ 242.220,-- (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. Mit der FTIR-Mikrospektroskopie werden Mikrokolonien von ca. 200 µm Durchmesser, wie sie nach einer Inkubation von etwa 24 Stunden vorliegen, über ein Abklatschverfahren von der Agarplatte auf das Trägermaterial überführt. Die einzelnen Mikrokolonien auf dem Probenfenster werden unter dem Lichtmikroskop detektiert, markiert und dann im Infrarotmodus des Mikroskops automatisiert gemessen. Die Summe der Absorptionen aller Zellbestandteile ergibt unter standardisierten Bedingungen sehr gut reproduzierbare und hoch charakteristische Spektren, die unter Zuhilfenahme von Referenzdatenbanken für eine Identifizierung genutzt werden.

Ziel des Vorhabens war es, aufbauend auf den Ergebnissen der AiF/FEI-Vorhaben 10768 N und 11627 N das FTIR-Mikrospektroskopie-Verfahren für die Lebensmittelindustrie zur Anwendungsreife zu bringen, um damit die automatische, schnelle und vor allem kostengünstige Analyse von komplexen mikrobiellen Hausflora zu ermöglichen. Hierzu sollten die FTIR-

Datenbanken für lebensmittelmikrobiologisch relevante Keime an die automatisierte FTIR-Mikroskopie angepasst und Arbeitsroutinen für Dienstleistungslabors (z. B. milchwirtschaftliche Untersuchungsanstalten) und lebensmittelverarbeitende Betriebe erstellt werden. Bestandteile des Projektes waren neben der Entwicklung der allgemeinen Methodik die Wahl der Mess- und Auswerteparameter, der Aufbau von Referenzdatenbanken für unterschiedliche Organismengruppen sowie die Anwendung der Ergebnisse unter Praxisbedingungen.

Forschungsergebnis:

Die Entwicklung der allgemeinen Methode wurde am Beispiel der Hefen durchgeführt. Bevor mit dem Aufbau einer Datenbank begonnen werden konnte, mussten die Parameter der Probenaufbereitung festgelegt werden. Hierzu gehörten das Wachstumsmedium und die Inkubationstemperatur, die die stoffliche Zusammensetzung der Zellen maßgeblich beeinflussen, sowie die Inkubationsdauer, die den Durchmesser und damit auch die Dicke der Kolonien nach dem Transfer auf das Probenfenster determiniert. Die Korrelation zwischen Inkubationsdauer, Koloniedurchmesser und Reproduzierbarkeit der Messungen ergab einen optimalen Koloniedurchmesser für gut reproduzierbare Messungen von mindestens

70 μm , was für Hefen eine Inkubation von ca. 24 Stunden bei 25 °C erfordert. Ein Vergleich des Identifizierungserfolges von Mikrospektroskopie und Spektroskopie am Beispiel einer Modelldatenbank ergab äquivalente Ergebnisse für beide Systeme. Die Spezifität der Mikrospektroskopie geht zudem bis auf Stammniveau hinunter. Insgesamt wurden für Hefen, coryneforme Bakterien und Milchsäurebakterien Referenzdatenbanken erstellt. Für Hefen war es möglich, alle Arten mit einem einzigen Zeitpunkt für die Probenahme, also den Transfer der Kolonien von der Agarplatte auf das ZnSe-Probenfenster, zu erfassen. Die Datenbank umfasste 84 Spektren von 13 Arten und erzielte nach Optimierung der Auswerteparameter 80 % richtige Identifizierungen auf Speziesebene. Die Coryneformen konnten nicht alle mit einem Probenahmezeitpunkt erfasst werden, da die Wachstumsgeschwindigkeiten zu stark variierten; hier wurden insgesamt drei verschiedene Zeitpunkte festgelegt. In die Bibliothek wurden 85 Spektren von 18 Spezies aufgenommen, von denen mit dem erarbeiteten Identifizierungsmodus 64 % richtig klassifiziert wurden. Für die Milchsäurebakterien wurden ebenfalls drei Zeitpunkte für den Kolonietransfer festgelegt. Die Referenzbibliothek umfasste 44 Spektren von 10 Spezies und erzielte 68 % richtige Identifizierungen. Dies ist umso höher einzuschätzen, als es im Gegensatz zur FTIR-Spektroskopie keine zusätzlichen Zuckertests für die Vorauswahl einer Subbibliothek gab, sondern alle Arten in einer Datenbank zusammengefasst waren.

Bei der Bewertung der Ergebnisse muss beachtet werden, dass der Erfolg stark von der Zusammensetzung der jeweiligen Datenbank abhängt. So fallen die Identifizierungsraten bei kleinen Datensätzen nicht so gut aus, wie man es sich wünschen würde, da die einzelnen Spezies mit drei bis fünf Vertretern in der Datenbank unterrepräsentiert und in ihrer Variabilität keinesfalls abgedeckt sind. Eine beispielhafte Erweiterung der Spektrenzahl von *D. hansenii* in der Hefenbibliothek von drei auf 21 verbesserte den Identifizierungserfolg für diese spektroskopisch gesehen sehr heterogene Art von 37 % auf 81 %. Die Erfassung möglichst vieler Formen einer Art in der Referenzdatenbank wirkt sich also außerordentlich positiv auf den Identifizierungserfolg aus und zeigt, dass die erzielten Identifizierungsraten für die hier vorgestellten Datensätze sehr positiv zu bewerten sind.

Als praktische Anwendung der FTIR-Mikrospektroskopie wurde das Vorgehen für Populationsanalysen erarbeitet und die Floren von

Molkereiabwasser nach der Klärung und für zwei Rotschmierekäse untersucht. Um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass erwartungsgemäß nicht alle detektierten Keime auch ihre Entsprechung in der Datenbank finden, wurde die Methode dahingehend optimiert, dass die Organismen nach der Messung vom Probenfenster isoliert werden können. So wird eine mögliche Identifizierung dieser Isolate mit alternativen Methoden sichergestellt und eine Beschränkung des Systems auf bestimmte Floren vermieden. Bei der Analyse beider Käsekonsortien wurden jeweils ca. 1.000 Spektren aufgenommen. Die Ergebnisse zeigen, dass mit FTIR-Mikrospektroskopie die Zusammensetzung derartiger Populationen in vergleichsweise kurzer Zeit detailliert erfasst werden kann. Damit ist erstmals eine Methode beschrieben, die eine einfache und schnelle Identifizierung von Mikroorganismen direkt aus der Probe gestattet, ohne molekularbiologische Kenntnisse zu erfordern. Es empfiehlt sich jedoch, die Methode nicht zu stark zu generalisieren, sondern auf spezifische Problemstellungen anzuwenden, um das Potential des Systems voll ausschöpfen zu können.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Mikrospektroskopie kann und soll die herkömmliche FTIR-Spektroskopie nicht ersetzen, sondern ergänzen. Ihre Vorteile liegen in der Identifizierung von Mikroorganismen unter Zeitdruck und in der Analyse ganzer Populationen. Ausgehend von einer Produkt- oder Umfeldprobe können schnell wachsende Organismen bereits nach 15 Stunden, durchschnittlich wachsende nach ca. 24 Stunden und sehr langsam wachsende nach 48 Stunden gemessen und identifiziert werden. Dies bedeutet im Vergleich zu bisherigen Identifizierungsmethoden, für die reine Kulturen vorliegen müssen, einen Zeitvorteil von mehreren Tagen, der besonders bei der Identifizierung pathogener Organismen in Lebensmitteln entscheidend zum Tragen kommen kann. Ferner kann eine Probe auf das Vorhandensein eines bestimmten Keims getestet werden, wie es häufig bei Kontaminationsrouten-Analysen der Fall ist. Auch können ausgewählte Floren wie Reifungsfloren bei Käse, aber auch die Hausflora, Keime im Abwasser oder ähnliches untersucht werden. Unternehmen der Milchverarbeitenden Industrie haben somit ein wichtiges Instrument zur Kontrolle des mikrobiologischen Status der Produktionsstätte an der Hand. Durch Monitoring technologisch wichtiger Konsortien kann zudem die gleichbleibende Zusammensetzung dieser Kultu-

ren und damit eine stabile Produktqualität gewährleistet werden. Bei der Entwicklung neuer Starter oder Kulturen kann mit dem vorgestellten System der Erfolg der Entwicklung in der praktischen Anwendung auf einfache Weise kontrolliert werden.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2003.
2. Wenning, M., Seiler, H. und Scherer, S.: Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy, a Novel and Rapid Tool for Identification of Yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4717-4721 (2002).
3. Scherer S. und Seiler H.: Computergestütztes Identifizierungssystem (FTIR-Technologie) für Starterkulturen und Verderbsorganismen in der Lebensmittelindustrie. Tagungsband 60. Diskusstagung des Forschungskreises der Ernährungsindustrie, 49-54 (2002).

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
Zentralinstitut für Ernährungs- u. Lebensmittel-
forschung
Abt. Mikrobiologie
Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising-
Weihenstephan
Tel.: 08161/71-3516, Fax: 08161/71-4512
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