

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Nachweis von *Alicyclobacillus acidoterrestris* Sporen in
Fruchtsäften: Entwicklung und Charakterisierung von
poly- und monoklonalen Antikörpern

von

Sophia Barbara Mast

aus Filderstadt

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. E. Märtlbauer

Mitbetreuung durch

Dr. R. Dietrich

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin P. Märtlbauer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Tag der Promotion: 06. Februar 2016

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Historischer Überblick und Taxonomie	3
2.2	Charakteristika von <i>Alicyclobacillus</i> spp.	5
2.3	Verderb von Fruchtsäften durch <i>Alicyclobacillus</i> spp.	9
2.4	Nachweisverfahren	13
2.4.1	Klassisch-mikrobiologische Methoden	13
2.4.2.	Alternative Nachweisverfahren	20
2.4.2.1.	Nachweis der Bildung von Guajacol	21
2.4.2.2.	Molekularbiologische Methoden	22
2.4.2.3.	Immunchemische Methoden	24
III.	MATERIAL UND METHODEN.....	29
3.1	Materialien und Geräte.....	29
3.1.1	Reagenzien	29
3.1.2	Lösungen und Puffer	30
3.1.3.	Nährmedien	32
3.1.4	Immunoreagenzien	33
3.1.5	Geräte	33
3.1.6	Sonstige Materialien	33
3.2	Methodik	34
3.2.1	Immunchemische Verfahren	34
3.2.1.1	Indirekte EIA-Verfahren	34
3.2.1.2	Sandwich EIA-Verfahren	35
3.2.1.3	Immunfluoreszenz	35
3.2.1.4	Immunoblot	36
3.2.2	SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.....	37
3.2.3	Generierung und Selektion von Hybridomzelllinien.....	37
3.2.4	Peroxidase-Test	38
3.2.5	RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	38
IV.	ERGEBNISSE	40

4.1	Etablierung und Charakterisierung einer Stammbibliothek.....	40
4.1.1	Etablierung einer <i>Alicyclobacillus</i> -Stammbibliothek.....	40
4.1.2	Charakterisierung der <i>Alicyclobacillus</i> -Stammbibliothek.....	43
4.1.2.1	Mikrobiologische Untersuchungen	43
4.1.2.2	Real-Time Multiplex PCR.....	45
4.1.2.3	Guajacol-Produktion	46
4.1.2.4	RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	47
4.2	Generierung von <i>Alicyclobacillus</i> Sporen.....	50
4.2.1	Orientierende Versuche	51
4.2.2	Optimiertes Verfahren	54
4.3	Generierung von polyklonalen Antikörpern	56
4.3.1	Herstellung des Immunogens	56
4.3.2	Immunisierung von Mäusen	58
4.3.3	Immunisierung von Kaninchen	59
4.4	Charakterisierung der polyklonalen Antiseren.....	60
4.4.1	Bestimmung der Antikörper-Titer	60
4.4.2	Apparente Avidität	64
4.4.3	Indirekte Immunfluoreszenz.....	67
4.4.4	Immunoblots.....	70
4.5	Anwendungsstudien zu den polyklonalen Kaninchenantiseren.....	72
4.5.1	Etablierung eines Sandwich EIA.....	73
4.5.1.1	Inklusivität & Exklusivität des Sandwich EIA.....	75
4.5.1.2	Detektion von Sporen in Fruchtsäften.....	80
4.6	Generierung monoklonaler Antikörper	85
4.7	Charakterisierung der monoklonalen Antikörper	85
4.7.1	Indirekter Enzymimmuntest	85
4.7.2	Sandwich EIA.....	87
4.7.3	Indirekte Immunfluoreszenz.....	89
4.7.4	Immunoblots.....	89
4.8	Anwendung der monoklonalen Antikörper	90
4.8.1	Massenproduktion	90
4.8.2	Herstellung Peroxidase-markierter mAK.....	91

4.8.3	Etablierung von mAK-basierten Sandwich EIAs.....	91
4.8.3.1	Intra- und Intergenus-Spezifität.....	92
V.	DISKUSSION	95
5.1	Generierung der Antikörper	96
5.2	Charakterisierung der Antikörper & Etablierung von EIAs	98
5.3	Nachweis von <i>A. acidoterrestris</i> in Fruchtsäften	104
VI.	ZUSAMMENFASSUNG.....	108
VII.	SUMMARY	109
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	110
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	128
X.	TABELLENVERZEICHNIS	131
XI.	DANKSAGUNG	133

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A. dest.	Aqua destillata
A.	<i>Alicyclobacillus</i>
AAM	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> Medium
ALI	<i>Alicyclobacillus</i> Medium
ATCC	American Type Culture Collection
B.	<i>Bacillus</i>
BAM	<i>Bacillus acidocaldarius</i> Medium
BAT	<i>Bacillus acidoterrestris</i> thermophilus Medium
BSA	Bovines Serumalbumin
C.	<i>Clostridium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPA	Dipicolinsäure (dipicolinic acid)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
D-Wert	Dezimale Reduktionszeit
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmuntest (enzyme immunoassay)
HT-Medium	Hypoxanthin-Thymidin-Medium
HAT-Medium	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium
HRP	Meerrettich Peroxidase (horseradish peroxidase)
HSA	Humanes Serumalbumin
IFU	International Federation of Fruit Juice Producers
i. p.	intraperitoneal
KbE	koloniebildende Einheiten
kDa	Kilodalton
MAk/mAk	monoklonale(r) Antikörper
MHI	Präfix für Stämme aus der Sammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch
NWG	Nachweisgrenze
OSA	Orangenserum-Agar
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese

PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PC	Plate Count
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDA	Kartoffelextrakt-Glukose-Agar (potato dextrose agar)
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
s. c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
YSG	Hefe-Stärke-Glukose Medium (Yeast Starch Glucose)
ZKÜ	Zellkulturüberstand

I. EINLEITUNG

Alicyclobacillus spp. sind grampositive, sporenbildende, apathogene Bakterien, die als Verderbserreger bei Fruchtsäften und anderen sauren Produkten von großer wirtschaftlicher Bedeutung für die Fruchtsaftindustrie sind (WALKER & PHILLIPS, 2008). Die extrem widerstandsfähigen, thermo-acidophilen Keime können als Sporen den Pasteurisierungsprozess von Säften überleben. Schon eine geringe Kontamination von weniger als 1 Spore/ml kann dazu führen, dass nach Auskeimung und Vermehrung der vegetativen Zellen ein Verderb des Produktes durch Bildung von Fehlgeruch auftritt (WALLS & CHUYATE, 2000a; CHANG & KANG, 2004). Dieser Fehlgeruch bzw. -geschmack wird hauptsächlich durch mikrobiell gebildetes Guajacol verursacht und wird häufig als medizinisch, desinfektionsmittelartig oder rauchig beschrieben (WASSERMAN, 1966; GOCMEN et al., 2005). Nicht alle Alicyclobazillen können Guajacol bilden, diese Fähigkeit wurde insbesondere bei *A. acidoterrestris*, aber auch bei anderen Spezies wie beispielsweise *A. acidiphilus* und *A. herbarius* nachgewiesen (SMIT et al., 2011). Sowohl im Hinblick auf die Vorkommenshäufigkeit als auch die Fähigkeit zur Fehlgeruch-Bildung kommt jedoch *A. acidoterrestris* die weitaus größte Bedeutung zu (YAMAZAKI et al., 1996; WALKER & PHILLIPS, 2008; YUE et al., 2014).

Rasche Nachweisverfahren wären wünschenswert, um finanzielle Verluste der Fruchtsaftproduzenten zu minimieren. Die von der IFU (International Federation of Fruit Juice Producers) und anderen Verbänden empfohlene Standardmethode basiert auf konventionellen mikrobiologischen Methoden und ist sehr zeitaufwändig. Bis zum Nachweis von Alicyclobazillen vergehen in der Regel mindestens 3 - 5 Tage. Alternative, auf molekularbiologischen bzw. immunchemischen Prinzipien beruhende Nachweisverfahren wurden zwar beschrieben, konnten sich allerdings bisher nicht in der Routineanalytik durchsetzen, da ihr Einsatz zu aufwändig bzw. kostenintensiv wäre oder weil die Zuverlässigkeit der Verfahren nicht gegeben ist.

Diese Arbeit wurde im Programm zur Förderung der „Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)“ unter der Projektnummer AiF 17245 N vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (via AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert.

Ziel dieser Arbeit war es, spezifische poly- und monoklonale Antikörper gegen Sporen von *A. acidoterrestris* zu generieren und umfassend zu charakterisieren. Die entwickelten Antikörper sollten zur Etablierung immunchemischer Verfahren eingesetzt werden, die den hochsensitiven, selektiven und zuverlässigen Nachweis von Sporen in verschiedenen Fruchtsaftsorten ermöglichen. Die Verfügbarkeit von robusten und selektiven Antikörpern gegen Sporen von Alicyclobazillen bietet zudem mittelfristig die Möglichkeit, eine Affinitätsanreicherung von Sporen aus pasteurisierten Säften zu realisieren, mit der ein zeitnaher Nachweis der Keime in kontaminierten Proben möglich ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch durchgeführten Eingriffe und Behandlungen an Tieren wurden der Regierung von Oberbayern gemäß §10a des Tierschutzgesetzes angezeigt und unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54.2532.6-2-12 genehmigt.

II. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Historischer Überblick und Taxonomie

Thermo-acidophile, sporenbildende Bakterien wurden erstmals von UCHINO und DOI (1967) aus heißen Quellen in Japan isoliert. Die Stämme wurden jedoch zunächst fälschlicherweise der ebenfalls thermophilen Spezies *Bacillus coagulans* zugeordnet. Phänotypisch ähnliche Mikroorganismen konnten vier Jahre später aus sauren Böden und Gewässern in Nationalparks der USA und Italien isoliert werden (DARLAND & BROCK, 1971; DE ROSA et al., 1971). Vor allem hinsichtlich des pH-Optimums und der DNA Basenzusammensetzung unterschieden sich die neu entdeckten Stämme noch deutlicher von *B. coagulans* als die zuvor beschriebenen Isolate, außerdem konnten DE ROSA et al. (1971) zeigen, dass die Cytoplasmamembranen der Isolate ω -Cyclohexan Fettsäuren als Hauptbestandteil der verseifbaren Lipidfraktion enthielten – ein charakteristisches und für Bakterien außergewöhnliches Merkmal. Aufgrund dieser fundamentalen Unterschiede schlugen DARLAND und BROCK (1971) daher vor, die Isolate einer neuen Spezies, nämlich *Bacillus acidocaldarius*, zuzuordnen.

CERNY et al. (1984) gelang es, einen thermo-acidophilen Stamm aus verdorbenem Apfelsaft zu isolieren, wodurch zum ersten Mal die potentielle Bedeutung dieser Bakterien als Lebensmittelverderbserreger dokumentiert wurde. In den Jahren zuvor waren weitere thermo-acidophile Stämme aus verschiedenen Umweltquellen von HIPPCHEN et al. (1981) isoliert worden, die allerdings, ebenso wie der aus Apfelsaft isolierte Stamm, trotz des Vorkommens von ω -Cyclohexan Fettsäuren in der Cytoplasmamembran nicht eindeutig *B. acidocaldarius* zugeordnet werden konnten und daher später als neue Spezies *B. acidoterrestris* klassifiziert wurden (DEINHARD et al., 1987a). Eine dritte thermo-acidophile Art, die allerdings im Unterschied zu *B. acidocaldarius* und *B. acidoterrestris* v. a. ω -Cycloheptan Fettsäuren in der Membran enthielt, wurde 1983 von PORALLA und KONIG (1983) beschrieben und schließlich 1987 ebenfalls von DEINHARD et al. (1987b) taxonomisch einer weiteren, neuen Spezies, *B. cycloheptanicus*, zugeordnet. Durch vergleichende Sequenzanalysen der 16S ribosomalen RNA (rRNA) konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass sich die drei thermo-acidophilen *Bacillus* Arten deutlich von allen anderen *Bacillus* spp. unterschieden. Daher wurde 1992 von WISOTZKEY et al. (1992) die Gründung eines neuen Genus *Alicyclobacillus* und die Einordnung von *B. acidocaldarius*, *B. acidoterrestris* und *B. cycloheptanicus* in diese Gattung vorgeschlagen.

Tabelle 2.1. Übersicht zu den derzeit dem Genus *Alicyclobacillus* zugeordneten Spezies (Stand August 2015).

Spezies	Herkunft	Referenz
Lebensmittelrelevante Spezies		
<i>A. acidiphilus</i>	saures Getränk	MATSUBARA et al. (2002)
<i>A. acidocaldarius</i>	Wasser aus sauren, heißen Quellen, Japan	UCHINO und DOI (1967); DARLAND und BROCK (1971); WISOTZKEY et al. (1992)
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i>	Wasser aus sauren, heißen Quellen, Japan	DARLAND und BROCK (1971); NICOLAUS et al. (2002)
<i>A. acidoterrestris</i>	Erdboden, Apfelsaft	HIPPCHEN et al. (1981); DEINHARD et al. (1987a); WISOTZKEY et al. (1992)
<i>A. cycloheptanicus</i>	Erdboden	PORALLA und KONIG (1983); DEINHARD et al. (1987b); WISOTZKEY et al. (1992)
<i>A. dauci</i>	Gemüse- und Fruchtsaftmischgetränk	NAKANO et al. (2015)
<i>A. fastidiosus</i>	Apfelsaft	GOTO et al. (2007)
<i>A. herbarius</i>	Kräutertee	GOTO et al. (2002a)
<i>A. hesperidum</i>	solfatarischer Boden	ALBUQUERQUE et al. (2000)
<i>A. pomorum</i>	gemischter Fruchtsaft	GOTO et al. (2003)
<i>A. sacchari</i>	flüssiger Zucker	GOTO et al. (2007)
Umwelt-assoziierte Spezies		
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmannii</i>	geothermischer Erdboden, Antarktis	NICOLAUS et al. (2002)
<i>A. aeris</i>	Kupfermine, China	GUO et al. (2009)
<i>A. cellulolyticus</i>	Sägespäne von Zedernholz, Japan	KUSUBE et al. (2014)
<i>A. contaminans</i>	Erdboden von Getreidefeld	GOTO et al. (2007)
<i>A. disulfidooxidans</i>	Klärschlamm	DUFRESNE et al. (1996); KARAVAIKO et al. (2005)
<i>A. ferrooxydans</i>	solfatarischer Boden	JIANG et al. (2008)
<i>A. kakegawensis</i>	Erdboden von Getreidefeld	GOTO et al. (2007)
<i>A. macrosporangiidus</i>	Erdboden von Getreidefeld	GOTO et al. (2007)
<i>A. pohliae</i>	geothermischer Boden, Antarktis	IMPERIO et al. (2008)
<i>A. sendaiensis</i>	Erdboden	TSURUOKA et al. (2003)
<i>A. shizuokensis</i>	Erdboden von Getreidefeld	GOTO et al. (2007)
<i>A. tolerans</i>	oxidierbares Blei-Zink Erz	KARAVAIKO et al. (2005)
<i>A. vulcanalis</i>	geothermische Quelle	SIMBAHAN et al. (2004)
Klinische Spezies		
<i>A. consociatus</i>	Blutprobe eines Menschen, Deutschland	GLAESER et al. (2013)

Die Gattung *Alicyclobacillus* wurde taxonomisch der Familie der *Alicyclobacillaceae* innerhalb der Ordnung der *Bacillales* zugeordnet, welche wiederum in die Klasse der *Bacilli* im Stamm der *Firmicutes* eingeordnet werden. In den folgenden Jahren bis heute wurden etliche neue *Alicyclobacillus* Spezies beschrieben. Zur Zeit werden, wie in Tab. 2.1 dargestellt, 25 Arten inklusive Unterarten dem Genus *Alicyclobacillus* zugeordnet (DSMZ Prokaryotic Nomenclature Up-To-Date).

2.2 Charakteristika von *Alicyclobacillus* spp.

Die Gattung *Alicyclobacillus* beinhaltet grampositive, thermo-acidophile, zumeist motile, stäbchenförmige und zur Bildung von Endosporen befähigte Bakterien (YUE et al., 2014). Natürliches Habitat ist der Erdboden, dementsprechend wurden die Bakterien aus verschiedenen Bodenproben, aber auch aus geothermischen Quellen isoliert (Tab. 2.1). Eine Kontamination von Frucht- und Gemüsesaftprodukten erfolgt vermutlich u. a. durch mit Erde verschmutzte Früchte oder belastetes Wasser (MERLE & MONTVILLE, 2014).

Die ovalen Sporen liegen im mikroskopischen Bild terminal bis subterminal, Sporangien können je nach Spezies geschwollen oder nicht geschwollen sein (CHANG & KANG, 2004). Auf festen Nährböden bildet der lebensmittelhygienisch bedeutsamste Verderbserreger *A. acidoterrestris* runde, cremig weiße und durchscheinende bis opake Kolonien (WISOTZKEY et al., 1992). Die meisten Arten von *Alicyclobacillus* wachsen unter aeroben Bedingungen und können verschiedene Zucker, u. a. Fructose und Glucose metabolisieren (SPLITTSTOESSER et al., 1994; MERLE & MONTVILLE, 2014).

Alicyclobazillen sind außergewöhnlich temperatur- und säureresistent, das Wachstum der vegetativen Zellen erfolgt bei Temperaturen von 20 – 70 °C (WISOTZKEY et al., 1992; GOTO et al., 2007). Darüber hinaus können einzelne Arten wie *A. disulfidooxydans*, *A. tolerans*, *A. ferrooxydans* und *A. consociatus* aber auch bei Temperaturen von weniger als 20 °C wachsen (KARAVAIKO et al., 2005; JIANG et al., 2008; GLAESER et al., 2013). Die pH-Toleranz von *Alicyclobacillus* spp. liegt prinzipiell zwischen Werten von 2,0 – 6,0 (WISOTZKEY et al., 1992), wobei die Spezies *A. disulfidooxydans* und *A. tolerans* auch noch bei extrem sauren pH-Werten von < 1,5 wachsen können (KARAVAIKO et al., 2005) bzw. *A. consociatus* eine pH-Toleranz bis pH 10,5 aufweist (GLAESER et al., 2013). Die optimalen Wachstumsbedingungen für den Verderbserreger *A. acidoterrestris* liegen bei Temperaturen von 36 – 53 °C sowie einem pH von 4,5 – 5,0 (SMIT et al., 2011).

Das Wachstum der Bakterien in Lebensmitteln wird auch von der relativen Dichte, d. h. dem Zuckergehalt von Fruchtsäften, beeinflusst, wobei in Saftkonzentraten mit hoher

relativer Dichte das Wachstum gehemmt wird. Dies ist beispielsweise laut SPLITTSTOESSER et al. (1994) in Riesling-Traubensaft bei einer relativen Dichte von 21,6 °Brix (entspricht der Dichte einer 21,6 % Saccharose-Lösung in Wasser) der Fall. Werden entsprechende Konzentrate jedoch z. B. bei der Herstellung von Fruchtsaft-Mixgetränken verdünnt, können darin enthaltene Endosporen auskeimen, sich vermehren und letztlich zum Verderb des Produkts führen (PETTIPHER & OSMUNDSON, 2000).

Das charakteristischste Merkmal, dem die Gattung *Alicyclobacillus* auch ihren Namen verdankt, ist die einzigartige Zusammensetzung der Cytoplasmamembran. Hauptkomponenten der Cytoplasmamembran sind ω -alicyclische Fettsäuren, bei den meisten Gattungsgliedern handelt es sich dabei um ω -Cyclohexan Fettsäuren: die Membran bei *A. acidocaldarius* besteht beispielsweise zu 70 – 93 % (DE ROSA et al., 1971; OSHIMA & ARIGA, 1975) bzw. bei *A. acidoterrestris* zu 15 – 91 % aus ω -Cyclohexan Fettsäuren (HIPPCHEM et al., 1981). Im Gegensatz dazu enthalten die Lebensmittel-relevanten Spezies *A. cycloheptanicus* und *A. herbarius* sowie die Umwelt-assoziierten Keime *A. kakegawensis* und *A. shizuokensis* ω -Cycloheptan Fettsäuren (PORALLA & KONIG, 1983; DEINHARD et al., 1987a; DEINHARD et al., 1987b; WISOTZKEY et al., 1992; GOTO et al., 2002a; GOTO et al., 2007). Mit der Entdeckung von *A. pomorum* wurde die Gattungsbeschreibung modifiziert, denn die Cytoplasmamembranen dieser Spezies beinhalten keine ω -alicyclischen, sondern geradkettige bzw. verzweigtkettige gesättigte Fettsäuren (GOTO et al., 2003). Ein ähnliches Fettsäurenmuster wurde später auch bei anderen, Umwelt-assoziierten Spezies, wie z. B. *A. macrosporangiidus* sowie *A. pohliae* nachgewiesen. Aufgrund phylogenetischer Analysen konnten diese Arten dennoch der Gattung *Alicyclobacillus* zugeordnet werden (GOTO et al., 2003; GOTO et al., 2007; IMPERIO et al., 2008; JIANG et al., 2008; GLAESER et al., 2013). Zusätzlich zu ω -alicyclischen Fettsäuren kommen bei einigen Spezies Hopanoide in der Cytoplasmamembran vor. Diese natürlicherweise v. a. in Bakterien vorkommenden Derivate des pentazyklischen Triterpens Hopan ähneln strukturell dem in Membranen eukaryotischer Organismen vorkommenden Cholesterin (PORALLA et al., 1980).

Die einzigartige Hitze- und Säuretoleranz der Alicyclobazillen, die es den vegetativen Zellen ermöglicht, unter widrigen Bedingungen zu überleben und sich zu vermehren, wird vor allem mit dem hohen Anteil an ω -alicyclischen Fettsäuren und Hopanoiden in der Cytoplasmamembran erklärt, da diese die Membran stabilisieren und deren Permeabilität sowie Fluidität reduzieren. Dies trägt wahrscheinlich zur Erhaltung der Barrierefunktion der

Tabelle 2.2. Charakteristika einiger Lebensmittelhygienisch-relevanter *Alicyclobacillus* spp. Basierend auf Daten von DARLAND und BROCK (1971), DEINHARD et al. (1987a), DEINHARD et al. (1987b), GOTO et al. (2002a), MATSUBARA et al. (2002) sowie GOTO et al. (2003).

	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>A. acidocaldarius</i>	<i>A. acidiphilus</i>	<i>A. herbarius</i>	<i>A. cycloheptanicus</i>	<i>A. pomorum</i>
Wachstum						
Temperaturbereich (°C) (Optimum)	20 - 70 (36 - 53)	45 - 71 (53 - 65)	20 - 55 (50)	35 - 65 (55 - 60)	40 - 53 (48)	30 - 60 (45 - 50)
pH Bereich (Optimum)	2,5 - 5,8 (4,5 - 5,0)	2,0 - 6,0 (3,5 - 4,0)	2,5 - 5,5 (3,0)	3,5 - 6,0 (4,5 - 5,0)	3,0 - 5,5 (3,5 - 4,5)	3,0 - 6,0 (4,0 - 4,5)
Koloniemerkmale						
Farbe	cremig weiß bis gelblich, durchscheinend bis opak	unpigmentiert, cremig gelb	cremig weiß, opak	nicht pigmentiert	cremig weiß, opak	nicht pigmentiert
Form	rund	rund oder konvex	rund, glatt	rund	rund, klein, glatt	rund
Größe (ø mm)	3,0 - 5,0	1,0 - 2,0	1,0 - 4,0	2,0 - 3,0	-	3,0 - 4,0
Morphologie						
Gram-Färbung	+ bis variabel	+ bis variabel	+	+	+	+ bis variabel
Größe der Stäbchen (Länge x Breite in µm)	2,9 - 4,3 x 0,6 - 0,8	1,5 - 3,0 x 0,5 - 0,8	0,9 - 1,1 x 4,8 - 6,3	-	2,5 - 4,5 x 0,35 - 0,55	2,0 - 4,0 x 0,8 - 1,0
Sporenform & -größe (Länge x Breite in µm)	oval, 1,5 - 1,8 x 0,9 - 1,0	oval oder ellipsoid, 1,0 - 1,1 x 0,7 - 0,8	ellipsoid bis oval	oval	oval, 1,0 x 0,75	oval
Sporenbildung	terminal, subterminal und zentral	terminal bis subterminal	terminal bis subterminal	subterminal	subterminal	subterminal
Sporangium geschwollen	nein bis wenig	nein bis wenig	ja	ja	wenig	ja
Chemische Merkmale						
Fettsäuren	ω-Cyclohexan	ω-Cyclohexan	ω-Cyclohexan	ω-Cycloheptan	ω-Cycloheptan	geradkettige und verzweigt-kettige gesättigte Fettsäuren

Membran und damit zur Aufrechterhaltung eines physiologischen cytoplasmatischen pH-Wertes in Umgebungen mit niedrigen pH-Werten und/oder hohen Temperaturen bei (KANNENBERG et al., 1984; KRISCHKE & PORALLA, 1990; WISOTZKEY et al., 1992). In Tab. 2.2 sind die Charakteristika einiger Lebensmittelhygienisch-relevanter *Alicyclobacillus* spp. zusammengefasst, eine Übersicht zu mikrobiologisch bedeutsamen Eigenschaften anderer Vertreter dieses Genus findet sich bei YUE et al. (2014).

Die Sporen von Alicyclobazillen sind extrem hitzeresistent und können, wie dies auch von anderen aeroben und anaeroben Sporenbildnern bekannt ist, als Dauerform Pasteurisierungsprozesse überleben (SMIT et al., 2011). Grundsätzlich stellt die Mineralisierung mit divalenten Kationen wie Ca^{2+} und Mn^{2+} einen der wesentlichen Faktoren für die hohe Hitzestabilität von bakteriellen Dauerformen dar (BENDER & MARQUIS, 1985). Calcium bildet hierbei mit Dipicolinsäure (DPA) Komplexe (Ca-DPA), welche die Sporen unter Hitzeeinwirkung stabilisieren können (YAMAZAKI et al., 1997a). Sporen von *A. acidoterrestris* weisen bei niedrigen pH-Werten eine stärkere Bindungsneigung für divalente Kationen (Ca^{2+} und Mn^{2+}) auf als andere untersuchte *Bacillus* spp. (YAMAZAKI et al., 1997a). Dies erklärt, weshalb der pH-Wert eines Sporulationsmediums, insbesondere bei niedrigeren Prozesstemperaturen, einen gewissen Einfluss auf die Hitzeresistenz (üblicherweise angegeben als dezimale Reduktionszeit, D-Wert) der sich darin bildenden Sporen hat (PONTIUS et al., 1998; SILVA et al., 1999).

Neben dem pH-Wert gibt es weitere intrinsische Faktoren, die die Hitzebeständigkeit der Sporen in Fruchtsäften beeinflussen können, u. a. hängt der D-Wert vom Zuckergehalt, d. h. der relativen Dichte, sowie der Wasseraktivität (a_w -Wert) ab, wobei in Fruchtsaftkonzentraten mit hoher relativer Dichte und geringerer Wasseraktivität die Hitzeresistenz höher ist als in einfachen Fruchtsäften (SPLITTSTOESSER et al., 1994; SILVA et al., 1999). Die während der Sporenbildung herrschende Umgebungstemperatur beeinflusst als extrinsischer Faktor auch unabhängig vom pH-Wert die Hitzeresistenz der Sporen. Dabei gilt, dass die Hitzeresistenz der Sporen steigt, je höher die Temperatur während der Versporung war.

Zudem hängt der D-Wert der bakteriellen Dauerformen auch maßgeblich von der Spezieszugehörigkeit innerhalb der Gattung *Alicyclobacillus* ab, die Sporen von *A. acidocaldarius* sind beispielsweise 30-fach hitzeresistenter als Sporen von *A. acidoterrestris* (PALOP et al., 2000), aber auch innerhalb einer Spezies weist die Hitzeresistenz der jeweiligen Stämme eine große Variationsbreite auf.

Alicyclobazillen sind, soweit bisher bekannt, apathogen. WALLS und CHUYATE (2000a) untersuchten die Pathogenität mehrerer Stämme von *A. acidoterrestriis* und eines Stammes von *A. acidocaldarius* in Tierversuchen. Dabei wurden Mäusen intraperitoneal Sporen verabreicht, außerdem wurden Fütterungsversuche mit verdorbenem Apfelsaft an Meerschweinchen durchgeführt. Bei einer applizierten Dosis von $5,0 \times 10^6$ KBE/ml Saft konnten keine Erkrankungen beobachtet werden.

Vor kurzem wurde mit *A. consociatus* jedoch erstmals eine Spezies beschrieben, die aus der Blutprobe eines Menschen isoliert worden war. Es blieb aber unklar, ob der isolierte Stamm Verursacher einer Infektion war oder ob es sich dabei um einen Zufallsbefund handelte (GLAESER et al., 2013). Prinzipiell konnte bislang in keiner Untersuchung der Verzehr von Produkten, bei denen ein *Alicyclobacillus*-verursachter Verderb festgestellt worden war, mit dem Auftreten von Erkrankungen beim Menschen in Zusammenhang gebracht werden. Der Verderb von Lebensmitteln durch *A. acidoterrestriis* scheint somit eher ein wirtschaftliches Problem, insbesondere für die Fruchtsaftindustrie, zu sein, als dass er ein Sicherheitsrisiko für den Verbraucher darstellt (CHANG & KANG, 2004).

2.3 Verderb von Fruchtsäften durch *Alicyclobacillus* spp.

Wie eingangs erwähnt, konnte *Alicyclobacillus* erstmals von CERNY et al. (1984) mit dem Verderb von Lebensmitteln in Verbindung gebracht werden, *A. acidoterrestriis* wurde dabei aus verdorbenem pasteurisiertem Apfelsaft isoliert. Bis zu diesem Zeitpunkt war das Interesse an diesem Bakterium eher akademischer Natur gewesen, in den Folgejahren änderte sich dies jedoch, da weltweit immer mehr Fälle eines durch Alicyclobazillen verursachten Verderbs von Fruchtsäften beobachtet wurden, die mit massiven wirtschaftlichen Verlusten für betroffene Unternehmen einhergingen (WALKER & PHILLIPS, 2008). So konnten die Mikroorganismen im Laufe der Jahre u. a. in Japan, Europa, den USA und Australien (WALLS & CHUYATE, 2000b; CHANG & KANG, 2004) als ursächliche Kontaminanten für den Verderb einer breiten Palette von verschiedensten Säften und Saftprodukten nachgewiesen werden (SPLITTSTOESSER et al., 1994; YAMAZAKI et al., 1996; GOTO et al., 2003; JENSEN & WHITFIELD, 2003). *A. acidoterrestriis* wurde u. a. aus verdorbenem Apfel-, Tomaten-, Orangen-, Grapefruit-, Mango-, Birnen-, Maracuja- und weißem Traubensaft isoliert (MOLVA & BAYSAL, 2014), weitere saure Produkte wie isotonisches Wasser und Limonade (YAMAZAKI et al., 1996), kohlensäurehaltige Fruchtsaftgetränke (PETTIPHER et al., 1997), Fruchtmark und haltbarer Eistee (DUONG & JENSEN, 2000), gehackte Dosentomaten (MERLE & MONTVILLE, 2014) sowie natürliche Apfel- und

Birnenaromen (OTEIZA et al., 2014) waren ebenfalls betroffen.

Dass der Verderb durch *Alicyclobacillus* spp. nicht nur ein sporadisches Geschehen darstellt, sondern vielmehr regelmäßig bei vielen Unternehmen der Fruchtsaftindustrie auftrat, zeigte sich bei einer Umfrage, die 1998 von der National Food Processors Association bei Fruchtsaftherstellern in den USA durchgeführt wurde. Dabei gaben 35 % der Hersteller an, schon einmal Fälle von Verderb durch acidophile Sporenbildner gehabt zu haben (SMIT et al., 2011). Dieses Bild konnte später durch eine weitere Umfrage, die 2005 von der European Fruit Juice Association erhoben wurde, bestätigt werden (YUE et al., 2014). Viele der befragten Unternehmen berichteten von z. T. wiederholt auftretenden, massiven Verderbsfällen. Die weite Verbreitung von Alicyclobazillen zeigte sich auch in Inzidenz-Studien. PETTIPHER et al. (1997) gelang der Nachweis von *A. acidoterrestris* in 5 von 18 untersuchten frischen Saftprodukten sowie in 5 von 8 Apfelsaftproben bzw. Apfelsaftkonzentraten. CHANG und KANG (2005) konnten in 29,5 % der untersuchten Apfelsaftproben (n = 44), bzw. 4 von 6 Apfelsaftkonzentraten *Alicyclobacillus* spp. nachweisen. Des Weiteren konnten Alicyclobazillen u. a. in natürlichem Birnenaroma (8 von 14 Proben positiv), Pfirsichsaft (29,4 % positive Proben, n = 309), Mangosaft (29 % positive Proben, n = 31), Erdbeersaft (5 von 6 Proben positiv) bzw. Bananensaft (2 von 6 Proben positiv) detektiert werden (OTEIZA et al., 2011; OTEIZA et al., 2014). Diese Beispiele belegen die hohe Vorkommenshäufigkeit von Alicyclobazillen und untermauern deren Bedeutung für die Fruchtsaftindustrie.

Der Verderb von sauren Produkten durch Alicyclobazillen macht sich vor allem durch einen Fehlgeruch bzw. Fehlgeschmack bemerkbar, zusätzlich kann eine leichte Sedimentbildung erfolgen, außerdem ist manchmal eine abnorme Färbung bzw. leichte Trübung ohne Gasbildung erkennbar. Diese Veränderungen treten in der Regel auf, sobald sich die Alicyclobazillen auf Keimgehalte von $> 10^4 - 10^5$ KBE/ml vermehrt haben (PETTIPHER et al., 1997; BAHCECI et al., 2005). Da in den Rückstellproben keine offensichtlichen Anzeichen von Verderb wie Aufblähen der Packung, starke Trübung oder substantielle Veränderungen des pH-Wertes auftreten, werden Firmen häufig erst durch Verbraucherbeschwerden auf verdorbene Produkte aufmerksam (SPLITTSTOESSER et al., 1994; DUONG & JENSEN, 2000).

Als Hauptverursacher des Fehleromas in den durch *Alicyclobacillus* verdorbenen Produkten wurde Guajacol (2-Methoxyphenol) identifiziert (Abb. 2.1; YAMAZAKI et al., 1996). Der Geruch dieser Verbindung wird als medizinisch, desinfektionsmittelähnlich, antiseptisch, phenolisch oder rauchig beschrieben (WASSERMAN, 1966; DUONG &

JENSEN, 2000; PETTIPHER & OSMUNDSON, 2000; GOCMEN et al., 2005). Außerdem wurden die Halophenole 2,6-Dichlorphenol und 2,6-Dibromphenol (Abb. 2.1) als Mitverursacher von Fehlgerüchen beschrieben (GOCMEN et al., 2005).

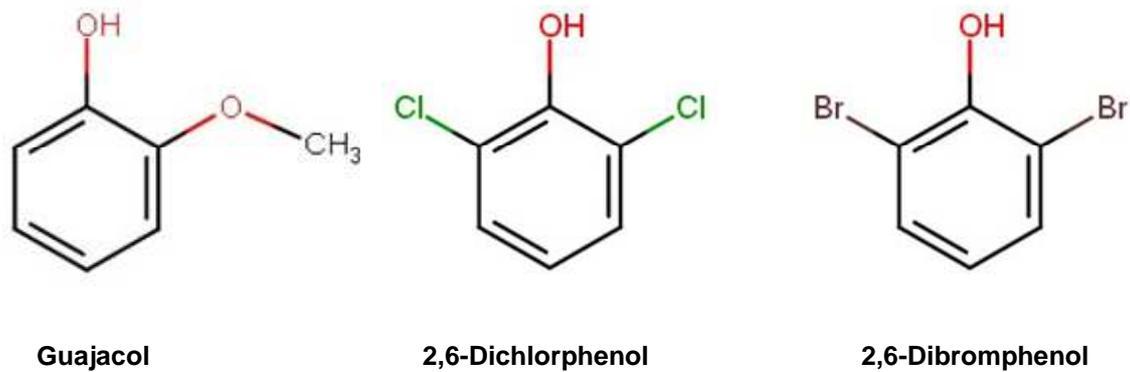


Abbildung 2.1. Strukturformeln von Verbindungen, die für das Fehlgeruch bei mit *Alicyclobacillus* spp. kontaminierten Produkten verantwortlich gemacht werden.

Guajacol ist ein Produkt des mikrobiellen Stoffwechsels, es kann von einigen *Alicyclobacillus* spp. enzymatisch aus in Säften enthaltener Vanillinsäure bzw. u. a. aus dessen Vorläufermolekül Vanillin gebildet werden (CAI et al., 2015b). Diese werden wiederum in mehreren Schritten aus Ferulasäure gebildet (Abb. 2.2), welche natürlicherweise in Obst vorkommt. Vanillin wird von den Bakterien durch eine NADPH-abhängige Vanillin-Reduktase zu Vanillylalkohol reduziert und dann durch eine NAD(P)⁺-abhängige Vanillin-Dehydrogenase zu Vanillinsäure oxidiert, die Umwandlung in Guajacol erfolgt letztlich durch eine nicht-oxidative Decarboxylierung (CAI et al., 2015a).

Vanillinsäure wurde Getränken früher auch zugesetzt, mittlerweile haben jedoch viele Hersteller die Rezeptur ihrer Produkte verändert und vermeiden den Zusatz dieser Verbindung, um das Risiko der mikrobiellen Synthese von Guajacol zu verringern (MERLE & MONTVILLE, 2014).

Nicht alle Alicyclobazillen produzieren Fehlgerüche und sind damit für den Verderb von Fruchtsäften und anderen sauren Produkten verantwortlich. Wie eingangs erwähnt, besitzt *A. acidoterrestris* hierbei die größte Bedeutung, allerdings wurden mittlerweile auch andere Spezies aus verdorbenen Proben isoliert oder als potentielle Produzenten von Fehlgerüchen identifiziert. Neben *A. acidoterrestris* wurde eine lebensmittelhygienische Relevanz für *A. acidiphilus*, *A. acidocaldarius*, *A. cycloheptanicus*, *A. herbarius*, *A. hesperidum* sowie

A. pomorum postuliert (MATSUBARA et al., 2002; GOTO et al., 2003; GOCMEN et al., 2005; GOUWS et al., 2005; GOTO et al., 2008; WITTHUHN et al., 2013).

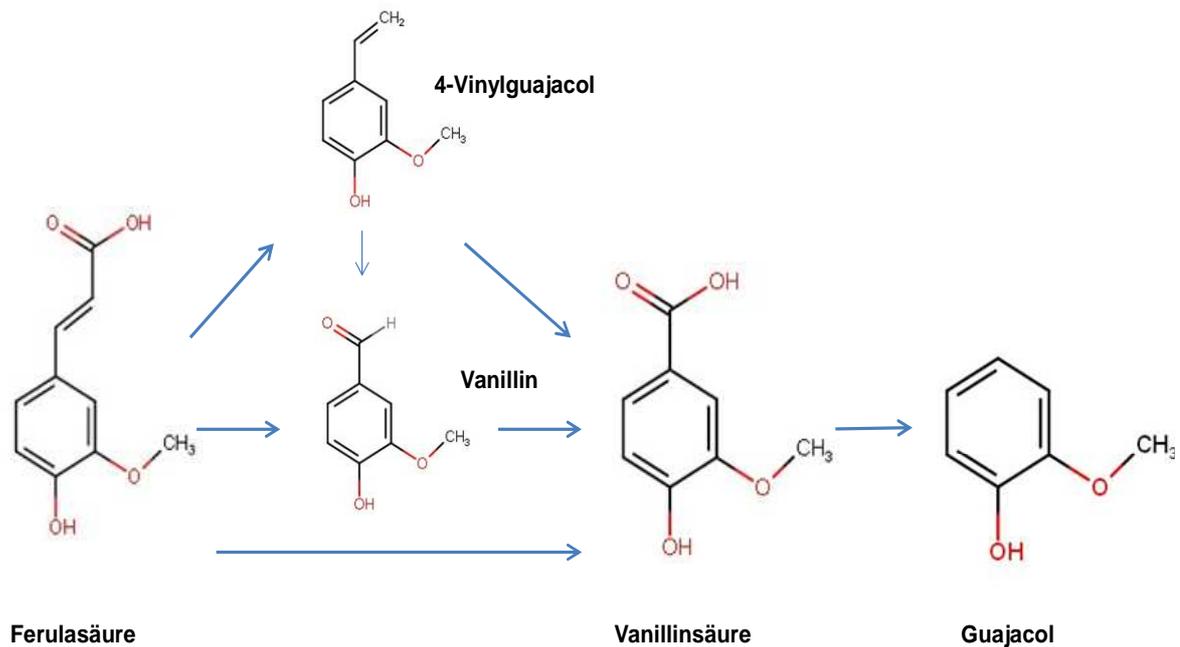


Abbildung 2.2 Bildung von Guajacol im mikrobiellen Stoffwechsel aus Vanillinsäure und dessen Vorläufern (modifiziert nach YOKOTA (2007)).

Die Haltbarkeit von Fruchtsaftprodukten wird bedingt durch intrinsische Faktoren (u. a. niedriger produkteigener pH) und thermische Aufbereitung (Prozess-Faktoren). Durch den geringen pH-Wert wird das Wachstum vieler Bakterien natürlicherweise gehemmt, während säureresistente, jedoch hitzeempfindliche mikrobielle Verderbserreger wie beispielsweise Milchsäurebakterien, Hefen und einige Schimmelpilze durch die Pasteurisierung inaktiviert werden (SPLITTSTOESSER et al., 1994; CHANG & KANG, 2004). Bei dem typischerweise in der Fruchtsaftindustrie zur Pasteurisierung verwendeten hot-fill-hold Prozess wird das Produkt für 15 – 20 sek auf 90 – 95 °C erhitzt und nach Abkühlung auf 82 – 84 °C in die entsprechenden Verpackungen abgefüllt. Diese Temperatur wird für weitere 2 min aufrecht erhalten, bevor die Produkte verschlossen und abgekühlt werden (SMIT et al., 2011).

Wie in 2.2 beschrieben, sind die Sporen der thermo-acidophilen Alicyclobazillen jedoch so hitzeresistent, dass sie nicht durch die bei der Pasteurisierung von Fruchtsäften eingesetzten Zeit-/Temperatur-Kombinationen abgetötet werden. Abhängig vom untersuchten Fruchtsaft und Isolat wurden für *A. acidoterrestris* D₉₅-Werte von 1,0 – 9,9 min bzw. D₉₀-Werte von 5,9 – 23,1 min beschrieben (SPLITTSTOESSER et al., 1994; MCINTYRE et al., 1995; KOMITOPOULOU et al., 1999; YAMAZAKI et al., 2000; MALDONADO et al.,

2008). Diese Werte verdeutlichen, dass die Dauer der Pasteurisierung um ein Vielfaches erhöht werden müsste, um tatsächlich eine vollständige Inaktivierung der Verderbserreger zu erreichen. Ein weiteres Problem besteht darin, dass die hohen Temperaturen bei der Pasteurisierung die Auskeimung von Sporen von *A. acidoterrestris* sogar anregen, da diese wie eine Hitzeschockbehandlung (siehe 2.4.1) auf die Sporen wirken (JENSEN, 1999). Die hohe Säureresistenz der Sporen trägt dazu bei, dass die Sporenzahl in kontaminierten Säften auch bei längerer Lagerung (> 40 d) konstant bleibt (OTEIZA et al., 2015), eine Beeinträchtigung der Vitalität der Dauerformen durch den produktbedingt niedrigen pH-Wert tritt somit nicht auf.

Nach Auskeimung der Sporen kommt es in ungekühlt gelagerten Produkten, v. a. bei höheren Umgebungstemperaturen, zu einem raschen Wachstum der Keime (GOCMEN et al., 2005). Bereits äußerst geringe Ausgangskeimgehalte können hierbei ausreichen, um letztlich den Verderb der betroffenen Produkte zu verursachen. So wurde beispielsweise von WALLS und CHUYATE (2000a) berichtet, dass die Kontamination mit nur einer Spore *A. acidoterrestris* je 10 ml genügte, um Apfel- bzw. weißen Traubensaft zu verderben.

2.4 Nachweisverfahren

Für den Nachweis von *Alicyclobacillus* spp. bzw. *A. acidoterrestris* im Speziellen wurden eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden beschrieben. Unterschieden werden kann hierbei zwischen klassisch-mikrobiologischen, kulturbasierten Anreicherungs- und Nachweismethoden sowie verschiedenen alternativen Verfahren.

2.4.1 Klassisch-mikrobiologische Methoden

In der Routineanalyse von Fruchtsaftprodukten werden bisher vor allem klassisch-mikrobiologische, kulturbasierte Methoden zur Isolierung und zum Nachweis von Alicyclobazillen eingesetzt. Vorteil dieser Verfahren ist, dass sie in der Praxis leicht anwendbar, verlässlich und wenig kostenintensiv sind, außerdem ist der Geräteaufwand gering. Andererseits ist der mikrobiologische Nachweis zeitaufwändig, zur Bestätigung sind zudem oft weitere Verfahren nötig (STEYN et al., 2011).

Da kontaminierte Produkte oft nur wenige Sporen/ml enthalten (2.3), bedingt der Einsatz konventionell-mikrobiologischer Methoden prinzipiell eine selektive Anreicherung der Keime in flüssigen oder auf festen Nährmedien, gefolgt von Bestätigungsverfahren, die auf mikrobiologischen Parametern oder anderen Detektionsprinzipien basieren.

Im Gegensatz zu anderen lebensmittelrelevanten Keimen wie Salmonellen oder Listerien, bei denen durch den Einsatz von Selektivstoffen in den jeweiligen Nährmedien das Wachstum der Begleitflora unterdrückt wird, beruht die Selektivität der Anreicherung von Alicyclobazillen im Prinzip auf den besonderen Wachstumsanforderungen, die dem thermo-acidophilen Charakter der Bakterien geschuldet sind. Es kommen beispielsweise angesäuerte Nährmedien (pH 4 oder weniger) zum Einsatz, zudem erfolgt die Inkubation bei Temperaturen um die 45 °C oder höher (bis zu 65 °C). Bei diesen Bedingungen wird das Wachstum anderer, nicht thermo-acidophiler Mikroorganismen gehemmt, der Einsatz von Selektivstoffen ist daher nicht nötig. Die Kulturen werden 2 – 5 Tage inkubiert, eine relativ lange Zeitspanne im Vergleich zu den bei anderen Lebensmittelhygienisch-relevanten Bakterien verwendeten Inkubationszeiten von 24 – 48 h (STEYN et al., 2011).

Um den Nachweis von *Alicyclobacillus* Sporen in Fruchtsaftprodukten zu erleichtern, wird eine Probenvorbereitung in Form von Hitzeschockverfahren eingesetzt, damit werden ruhende Endosporen aktiviert und deren Aussprossung gefördert. Es konnte gezeigt werden, dass ein Verzicht auf diesen Arbeitsschritt in einer deutlichen Unterschätzung der tatsächlichen Sporenzahl in kontaminierten Produkten resultiert, bedingt dadurch, dass eventuell nicht alle Sporen zur Keimung gebracht werden können (CHANG & KANG, 2004). Eine Vielzahl unterschiedlicher Temperatur-Zeit-Kombinationen wurde getestet: Beschrieben wurde z. B. die Erhitzung der Proben auf 80 °C für 10 Minuten (PETTIPHER et al., 1997; PETTIPHER & OSMUNDSON, 2000; WALLS & CHUYATE, 2000b), auf 70 °C für 10 Minuten (JENSEN, 2000) oder auf 70 °C für 20 Minuten (EIROA et al., 1999). Nach Durchführung der Hitzebehandlung wird eine Voranreicherung des Produkts vorgenommen, um sicherzustellen, dass auch eine geringe Ausgangsbelastung der Probe zuverlässig detektiert werden kann (WALKER & PHILLIPS, 2008; SMIT et al., 2011).

Generell gibt es zwei grundsätzlich verschiedene Verfahren für die Anreicherung von Alicyclobazillen auf festen Nährmedien: zum einen können Plattenverfahren eingesetzt werden – wobei die Verwendung des Oberflächenverfahrens bei den meisten Autoren bessere Ergebnisse liefert als das Gussplattenverfahren (PETTIPHER et al., 1997; PETTIPHER & OSMUNDSON, 2000; MURRAY et al., 2007) – zum anderen kann vorab eine Aufkonzentrierung der Keime mittels Membranfiltration erfolgen. Beim Oberflächenverfahren wird die Probe direkt auf einen Nährboden ausplattiert, der Vorteil dieser Methode ist, dass sie wenig aufwändig und für alle Arten von Proben durchführbar ist. Bei der Membranfiltration werden Proben hingegen durch einen Filter mit einer Porengröße von

0,45 µm filtriert, größere Partikel, u. a. Bakterien, werden zurückgehalten. Die Filtermembran wird anschließend auf einen festen Nährboden verbracht und inkubiert. Da große Volumina einer Probe durch eine Membran filtriert werden können, ist die Sensitivität dieser Methode höher als die des Oberflächenverfahrens, bei dem methodenbedingt auf einen festen Nährboden nur jeweils einige wenige ml Probe aufgetragen werden können. Allerdings ist das Membranfiltrations-Verfahren für viele Produkte, wie z. B. Fruchtfleisch enthaltende Säfte, aufgrund der spezifischen Produkteigenschaften nicht geeignet (CHANG & KANG, 2004; SMIT et al., 2011).

Wie eingangs erwähnt, kommt dem Nährmedium eine bedeutende Rolle beim selektiven Nachweis von Alicyclobazillen zu. Um das Wachstum der acidophilen Bakterien zu ermöglichen, müssen die eingesetzten Nährmedien einen niedrigen pH-Wert aufweisen. Die Ansäuerung der Medien erfolgt meist mit Salzsäure, Schwefelsäure oder Äpfelsäure auf pH-Werte von 3,5 – 4,0 (CHANG & KANG, 2004). Trotz der hohen Widerstandsfähigkeit, die es *Alicyclobacillus* spp. ermöglicht, auch unter extremen Bedingungen zu überleben, zeigen die Bakterien aber kein Wachstum auf Standardnährmedien wie Standard-Nähragar, Trypton-Soja-Agar, Hirn-Herz-Agar und Standard Plate Count Agar, selbst wenn diese Medien auf einen niedrigen pH-Wert von 3,5 eingestellt werden (SPLITTSTOESSER et al., 1994; PETTIPHER et al., 1997). Aus diesem Grund wurde seit der Isolierung der ersten Alicyclobazillen aus sauren heißen Quellen von UCHINO und DOI (1967), eine Vielzahl an Medien speziell zum Nachweis von *Alicyclobacillus* spp. entwickelt (Tabelle 2.3). Unter anderem beschrieben DARLAND und BROCK (1971) ein synthetisches Salzmedium, aus welchem die vier sehr ähnlich zusammengesetzten Nährmedien *Alicyclobacillus acidocaldarius* Medium (AAM), *Alicyclobacillus* Medium (ALI), *Bacillus acidocaldarius* Medium (BAM), sowie *Bacillus acidoterrestris* (thermophilus) Medium (BAT) hervorgingen. Des Weiteren kommen häufig Nährmedien wie Kartoffelextrakt-Glukose-Agar (Potato Dextrose Agar, PDA) oder Orangenserum-Agar (OSA) zum Einsatz, die ursprünglich für den Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen entwickelt worden waren.

Es wurden viele Studien zur Nachweiseffizienz der verschiedenen Medien durchgeführt, bisher konnte sich allerdings kein einheitliches Verfahren durchsetzen. Zwei Studien (PETTIPHER et al., 1997; PETTIPHER & OSMUNDSON, 2000) bescheinigten sowohl BAM, als auch PDA sowie vor allem dem OSA hohe Effektivität bei der Isolierung von Sporen aus Orangensaft. ORR und BEUCHAT (2000) hingegen ermittelten für den K Agar eine höhere Nachweiseffizienz bei chemisch behandelten Sporen, als für die parallel getesteten PDA und OSA. Hingegen konnte mit dem ALI-Medium bei

Tabelle 2.3. Zusammensetzung einiger Nährmedien, die zur Isolierung von *Alicyclobacillus* spp. aus Fruchtsäften eingesetzt werden.
Soweit nicht anders angegeben beziehen sich alle Angaben auf 1 l A. dest.

Name (Abkürzung)	Zusammensetzung	Referenz
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> Medium (AAM)	0,25 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O; 0,5 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 0,2 g (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,6 g KH ₂ PO ₄ ; 1,0 g Hefeextrakt; 1,0 g Glucose; pH 4 Als Sporulationsmedium zusätzlich 0,05 % (g/v) MnCl ₂ x 4 H ₂ O	YAMAZAKI et al. (1996); MURAKAMI et al. (1998)
<i>Alicyclobacillus</i> Medium (ALI)	0,25 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O; 0,5 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 0,2 g (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 3,0 g KH ₂ PO ₄ ; 2,0 g Hefeextrakt; 1,0 g Glucose; 2,0 g lösliche Stärke; pH 3,5 (mit 0,5 M H ₂ SO ₄ vor dem Autoklavieren einstellen) Für ALI-Agar ALI-Bouillon in doppelter Konzentration herstellen und mit dem gleichen Volumen an 3,5 % (g/v) Agar nach dem Autoklavieren vermischen	WISSE (1998)
<i>Bacillus acidocaldarius</i> Medium (BAM)	0,25 g CaCl ₂ x 2H ₂ O; 0,5 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 0,2 g (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 3,0 g KH ₂ PO ₄ ; 1,0 g Hefeextrakt; 1,0 g Glucose; 1,0 ml Spurenelementlösung; pH 4 (mit 0,5 M H ₂ SO ₄ einstellen) Spurenelementlösung: 0,66 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O; 0,18 g ZnSO ₄ x 7 H ₂ O; 0,16 g CuSO ₄ x 5 H ₂ SO ₄ ; 0,15 g MnSO ₄ x 4 H ₂ O; 0,18 g CoCl ₂ x 6 H ₂ O; 0,1 g H ₃ BO ₃ ; 0,3 g Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O; Für BAM-Agar Bouillon in doppelter Konzentration herstellen und mit gleichem Volumen an Agar (15 - 20 g Agar/l) nach dem Autoklavieren mischen	DEINHARD et al. (1987a)
<i>Bacillus acidoterrestris</i> (thermophilus) Medium (BAT)	Wie BAM außer: 2,0 g Hefeextrakt	DEINHARD et al. (1987a)
Enzyme Substrate <i>A. acidoterrestris</i> Selective Media (EAATSM)	2,0 g Hefeextrakt; 2,0 g lösliche Stärke; 1,0 g Glucose; 15,0 g Agar; 0,1 g 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-beta-D-cellobioside; 1,0 g Polyoxyethylen (20) Sorbitan Monopalmitat; pH 3,7 (mit 1 M HCl nach Autoklavieren einstellen)	UCHIDA et al. (2013)

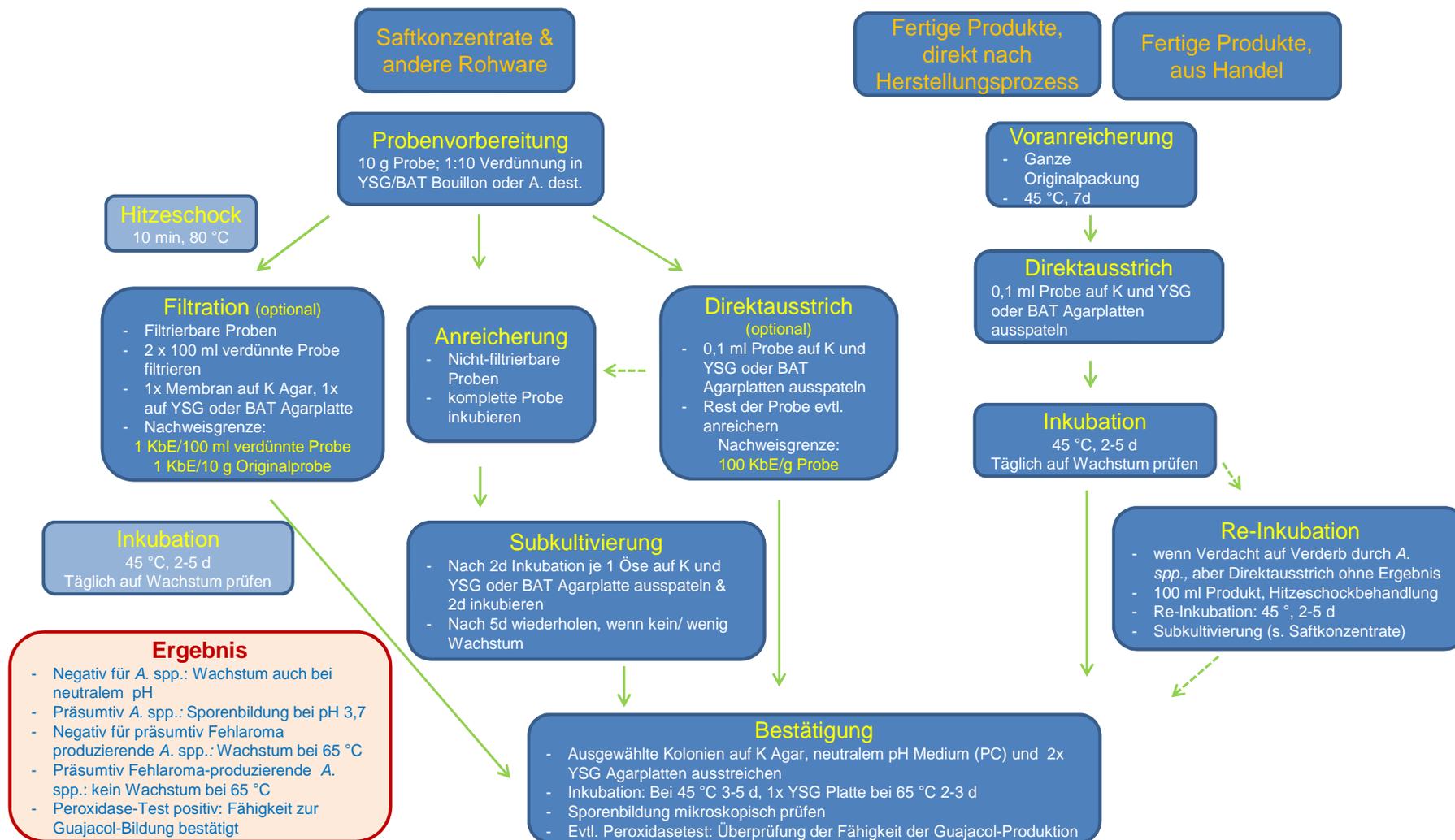
Fortsetzung Tabelle 2.3

Name (Abkürzung)	Zusammensetzung	Referenz
Hiraishi Glucose Yeast Extract Medium (HGYE)	0,4 % (g/v) Glucose; 0,3 % (g/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,1 % (g/v) Trypticase Soy Bouillon; 0,05 % (g/v) Hefeextrakt; 0,05 % (g/v) MgSO ₄ x 7H ₂ O; 0,01 % (g/v) K ₂ HPO ₄ ; 0,01 % (g/v) K ₂ SO ₄ ; 3 % (g/v) Agar; pH 3,0 (mit H ₂ SO ₄ einstellen)	HIRAISHI et al. (1997)
K Agar	2,5 g Hefeextrakt; 5,0 g Pepton; 1,0 g Glucose; 1,0 g Tween 80; 15,0 g Agar; pH 3,7 [mit 25 % (g/v) Äpfelsäure einstellen]	WALLS (1998)
Malt Extract Sporulation Medium (MSM)	30,0 g Malzextrakt; 5,0 g mykologischer Pepton; 15,0 g Agar; pH 4,0 [mit 10 % (g/v) Weinsäure einstellen]	PALOP et al. (2000)
Orange Serum Agar (modifiziert) (OSA)	10,0 g Trypton; 3,0 g Hefeextrakt; 4,0 g Glucose; 2,5 g K ₂ HPO ₄ ; 200 ml Orangensaft; 14,0 g Agar; pH 3,5 [mit 25 % (g/v) Äpfelsäure einstellen]	BEVILACQUA et al. (2008)
Potato Dextrose Agar (PDA)	4,0 g Kartoffeleextrakt; 20,0 g Glucose; 15,0 g Agar; pH 3,5 mit [10 % (g/v) Weinsäure einstellen] Als Sporulationsmedium zusätzlich 3 mg/l MnSO ₄	MURRAY et al. (2007); MOLVA und BAYSAL (2014)
SK Agar	2,5 g Hefeextrakt; 5,0 g Pepton; 1,0 g Glucose; 1,0 ml Tween 80; 15,0 g Agar; 10 % (g/v) CaCl ₂ nach Autoklavieren hinzufügen; pH 4,0 [mit 10 % (g/v) Weinsäure einstellen]	CHANG und KANG (2005)
SK Agar 2	5,0 g Pepton; 2,5 g Hefeextrakt; 1,0 g Glucose; 1,0 ml Tween 80; 0,5 g CaCl ₂ ; 0,01 % Chromazurolblau S; 70 ppm Vanillinsäure; pH 4,0 [mit 10 % (g/v) Äpfelsäure einstellen]	CHANG et al. (2013)
Yeast Starch Glucose Medium (YSG)	2,0 g Hefeextrakt; 2,0 g lösliche Stärke; 1,0 g Glucose; 15,0 g Agar; pH 3,7 [mit 1 M H ₂ SO ₄ , HCl oder 10 % (g/v) Weinsäure einstellen]	GOTO et al. (2002a); GOUWS et al. (2005); GROENEWALD et al. (2008); IFU (2007)

PARISH und GOODRICH (2005) eine höhere Anzahl an Sporen von der Oberfläche kontaminierter Orangen isoliert werden, PDA und K Agar zeigten eine geringere Nachweisrate. MURRAY et al. (2007) setzte in einer großangelegten Studie 10 verschiedene Nährmedien ein, um verschiedene Stämme von *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius* und *A. cycloheptanicus* aus Fruchtsaftproben nachzuweisen. Mit OSA und Hiraishi Glukose-Hefe-Extrakt Medium (HGYE) konnten geringe Keimgehalte in Apfelsaftproben am wenigsten zuverlässig nachgewiesen werden, während sich K Agar, ALI und BAT durch eine hohe Sensitivität auszeichneten. Im Gegensatz dazu kamen WITTHUHN et al. (2007) wiederum zu dem Schluss, dass PDA und OSA eine höhere Nachweiseffizienz für Alicyclobazillen in Birnen- und weißem Traubensaft aufwiesen als K, Hefe-Stärke-Glukose (Yeast Starch Glucose, YSG) und BAM Agar.

In den letzten Jahren wurden neue selektive Nährmedien beschrieben, die im Gegensatz zu den herkömmlichen Nährmedien spezifische Indikatoren enthalten. Mit dem von UCHIDA et al. (2013) publizierten chromogenen Medium EAATSM (Enzyme Substrate *A. acidoterrestris* Selective Media) soll eine Differenzierung zwischen *A. acidoterrestris* und anderen *Alicyclobacillus* spp. möglich sein. Während Kolonien von *A. acidoterrestris* auf diesem Nährboden eine blaue Farbe aufweisen, sind Kolonien anderer Alicyclobazillen weiß oder das Wachstum wird gänzlich inhibiert. Der von CHANG et al. (2013) beschriebene SK2 Agar soll den selektiven Nachweis von Guajacol-produzierenden *Alicyclobacillus* spp. ermöglichen. Kolonien Guajacol-produzierender Keime erscheinen auf diesem mit Chromazurolblau S substituierten Nährmedium violett bis blau. Nicht-Gujacol-Produzenten zeigen dagegen kein Wachstum oder bilden cremefarbene Kolonien aus.

Bislang gibt es keine einheitliche, international anerkannte standardisierte Testmethode zum Nachweis von Alicyclobazillen in Fruchtsäften und anderen sauren Produkten. Mehrere Fruchtsaftverbände haben jedoch eigene Standardverfahren formuliert, die wichtigsten Methoden sind die von der Japan Fruit Juice Association (JFJA) entwickelte „Unified test method for detection of thermo-acidophilic bacilli“ und die „First standard IFU-method on the detection of *Alicyclobacillus* in fruit juices“ der International Federation of Fruit Juice Producers (IFU, 2007).

**Abbildung 2.3.**

Schematische Darstellung der Detektion von Fehleroma-produzierenden *Alicyclobacillus* spp. in Fruchtsäften nach Methode Nr. 12 der IFU (2007).

Im Rahmen der japanischen Methode wird ausschließlich YSG Medium eingesetzt. Je nach Art des zu untersuchenden Produkts werden Proben zunächst entweder in A. dest. oder YSG-Bouillon verdünnt, bevor sie einer Hitzeschockbehandlung (70 °C, 20 Minuten) unterzogen werden, danach werden sie entweder membranfiltriert oder bei 45 °C für 3 – 5 d vorangereichert. Die angereicherten Proben werden dann auf YSG-Agarplatten verbracht und bei 30 °C oder 45 °C für 3 – 5 d inkubiert. Bei 45 °C soll das Wachstum aller bekannter *Alicyclobacillus* spp. möglich sein, bei 30 °C wachsen dagegen nur *A. acidoterrestris*, *A. acidiphilus*, *A. cycloheptanicus*, *A. herbarius*, sowie *A. hesperidum*. Bei Koloniewachstum wird überprüft, ob tatsächlich *A. acidoterrestris* isoliert wurde. Entweder wird dazu die „Differential growth temperature method“ eingesetzt, bei der das Wachstumsverhalten der Isolate bei 45 °C und 65 °C überprüft wird, oder die Peroxidase Methode (2.4.2.1), mit der getestet wird, ob das Isolat zur Bildung des Metabolits Guajacol fähig ist (YOKOTA, 2007).

In Methode Nr. 12 der IFU (2007) wird der Einsatz verschiedener Nährmedien, nämlich BAT (pH 4,0), YSG (pH 3,7) sowie K Agar (pH 3,7) für den Nachweis Fehleroma-produzierender *Alicyclobacillus* spp. empfohlen. BAT und YSG fördern als nicht-selektive Nährböden das Wachstum aller bekannten *Alicyclobacillus* spp., während K Agar vor allem das Wachstum von *A. acidoterrestris* sowie eingeschränkt auch von *A. acidocaldarius* und *A. acidiphilus* zulässt. Auf BAT Agar kann zudem eine Sporenbildung der Bakterien überprüft werden. Auch im Rahmen dieser Methode sind für verschiedene Typen von Produkten unterschiedliche Vorgehensweisen vorgesehen, diese werden in Abbildung 2.3 detailliert dargestellt. Sowohl die Australian Fruit Juice Association (AJA) wie auch südafrikanische Fruchtsafthersteller empfehlen die Anwendung der IFU-Methode – z. T. mit Abwandlungen – zum Nachweis von Alicyclobazillen in Fruchtsäften (SMIT et al., 2011).

2.4.2. Alternative Nachweisverfahren

In der Routineanalytik werden zwar immer noch fast ausschließlich mikrobiologische Verfahren zur Isolierung von Alicyclobazillen aus Fruchtsäften eingesetzt, da sie leicht durchführbar und zuverlässig sind. Allerdings sind sie auch sehr zeitaufwändig: bis zum Nachweis von Sporen in kontaminierten Produkten vergehen, wie in 2.4.1 dargestellt, im Allgemeinen mehrere Tage. Daher besteht ein Bedarf nach alternativen Verfahren zur schnelleren Isolierung sowie Identifizierung der Verderbserreger in Fruchtsäften. Im Folgenden werden einige, auf unterschiedlichen Prinzipien basierende alternative Verfahren beschrieben, die zu diesem Zweck entwickelt wurden.

2.4.2.1. Nachweis der Bildung von Guajacol

Eine Kontamination von Fruchtsäften und anderen sauren Produkten mit Fehl aroma-producing Alicyclobazillen kann indirekt über die Detektion der verantwortlichen Metaboliten Guajacol bzw. 2,6-Dibromphenol und 2,6-Dichlorphenol nachgewiesen werden.

Die meisten Verfahren, die auf diesem Ansatz beruhen, sind relativ schnell durchführbar, allerdings kann die Detektion der Bakterien erst nach Bildung der Fehl aromen und damit dem Verderb des Produktes erfolgen. Solange die Bakterien nur als Sporen vorliegen und noch keine Fehl aromen gebildet haben, ist kein Nachweis der Kontaminanten möglich. Im Prinzip kann Guajacol enzymatisch oder mittels physikalisch-chemischer Nachweisverfahren detektiert werden.

Die Peroxidase-Methode ist ein enzymatisches, colorimetrisches Verfahren zur Bestimmung von Guajacol. Sie beruht auf dem Prinzip, dass vier farblose Guajacol-Moleküle in Anwesenheit von H_2O_2 durch Peroxidase zu braunem Tetraguajacol oxidiert werden (NIWA, 2004). Dieser Farbumschlag ist schon mit bloßem Auge sichtbar, die Absorptionsänderung kann aber auch photometrisch gemessen werden (NIWA, 2004; BAHCECI et al., 2005; BAHCECI & ACAR, 2007), wodurch ein sensitiver quantitativer Nachweis von Guajacol möglich wird. Laut WITTHUHN et al. (2013) liegt die Nachweisgrenze für die Detektion von Guajacol mit der Peroxidase-Methode bei 1 – 2,5 $\mu\text{g/l}$. Zur schnellen und einfachen Detektion von Guajacol in Proben sind auf diesem Testprinzip basierende Kits verfügbar (Guajacol detection kit, Kyokuto Pharmaceutical Industrial Company Ltd.; BAT/Guajacol detection kit, Döhler Group). Neben der Messung von Guajacol in Produkten wird die Peroxidase-Methode als Bestätigungsverfahren für Guajacol-produzierende Alicyclobazillen u. a. auch in der Standardmethode Nr. 12 der IFU (2007) vorgeschlagen (2.4.1).

Der Nachweis von Guajacol mittels physikalisch-chemischer Verfahren erfolgt prinzipiell in mehreren Schritten, dabei können unterschiedliche analytische Methoden kombiniert werden. Im Allgemeinen wird zunächst eine Probenaufbereitung vorgenommen, um Guajacol zu extrahieren, insbesondere die Festphasenmikroextraktion wird häufig zu diesem Zweck eingesetzt. Die Extraktion des Analyts wird bei dieser Methode durch Einsatz von Fasern auf Siliciumbasis erreicht, die mit geeigneten Adsorbentien beschichtet sind (WARDENCKI et al., 2004). Werden diese Fasern in die flüssige oder gasförmige Probe eingebracht, wird der Analyt Guajacol adsorbiert und an der Faser angereichert, andere Komponenten verbleiben dagegen in der Probe. Die spätere Desorption des Analyten von der Faser erfolgt durch thermische Behandlung. Der Nachweis erfolgt dann über verschiedene chromatographische

Verfahren, v. a. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (BAHCECI & ACAR, 2007) sowie Gaschromatographie (GC; GOCMEN et al., 2005) werden hierbei eingesetzt, der Nachweis beruht auf UV- bzw. massenspektrometrischen (MS) Detektoren (ZIERLER et al., 2004; BAHCECI et al., 2005).

Mit Hilfe physikalisch-chemischer Verfahren kann Guajacol in kontaminierten Proben hochsensitiv nachgewiesen werden, beispielsweise konnten laut SIEGMUND und POLLINGER-ZIERLER (2006) nach Headspace-Festphasenmikroextraktion mittels GC-MS Verfahren noch 0,29 µg/l Guajacol in Apfelsaft detektiert werden. Diese Methode war damit um ein Vielfaches sensitiver als der enzymatische Nachweis von Guajacol, bei dem die Nachweisgrenzen in einem Bereich von 1 – 2,5 µg/l liegen (WITTHUHN et al., 2013).

2.4.2.2. Molekularbiologische Methoden

Bei den molekularbiologischen Methoden muss zwischen Verfahren unterschieden werden, die dem Nachweis von Alicyclobazillen in Fruchtsäften dienen und solchen, deren Zweck die Identifizierung bzw. Differenzierung von Isolaten ist.

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an molekularbiologischen Methoden beschrieben, Tabelle 2.4 gibt einen Überblick zu wichtigen Charakteristika einiger bislang beschriebener Verfahren und enthält Angaben mit welchen Fruchtsaftsorten die Methoden auf ihre Praxistauglichkeit überprüft wurden. Vorteile der aufgeführten Methoden zum Nachweis von Alicyclobazillen in Fruchtsäften sind, dass sie oft schnell ausführbar sowie hoch sensitiv sind, zum Teil gibt es mittlerweile auch kommerziell erhältliche Testkits (SHAYANFAR et al., 2015). Trotzdem konnten sich die molekularbiologischen Verfahren bisher nicht in der Routineanalytik durchsetzen, da sie mit hohem apparativem Aufwand verbunden und daher zu teuer oder aber noch nicht ausgereift sind. So wiesen GOBBI et al. (2010) sowie LI et al. (2014) darauf hin, dass vor allem bei PCR-basierten Methoden Probleme mit falsch positiven Ergebnissen auftraten.

Die derzeit zuverlässigste Technik zur Identifizierung von Isolaten von *Alicyclobacillus* auf Spezieslevel ist die 16S rRNA Gensequenzierung. Dabei werden Nukleotidsequenzen der sogenannten hypervariablen Region untersucht, die innerhalb der jeweiligen Spezies hochkonserviert sind, zwischen den verschiedenen Arten der Gattung *Alicyclobacillus* aber stark differieren. Der Zeitaufwand für Sequenzanalysen beträgt bisher mindestens 12 h (WISOTZKEY et al., 1992; GOTO et al., 2002b; GOUWS et al., 2005; GOTO et al., 2008). Die RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ist eine besondere Form der PCR, bei der Oligonukleotide mit einer Länge von 8 – 12 Nukleotiden als Primer verwendet werden.

Tabelle 2.4. Ausgewählte molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Alicyclobazillen in Fruchtsäften bzw. zur Identifizierung und Differenzierung von *Alicyclobacillus* Isolaten.

Methoden	Nachweisgrenze	Zeitaufwand	Einsatzbereich	Produkt	Referenz
Nachweis von Alicyclobazillen in Fruchtsäften					
Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	1 KbE/ml	24 h	Semiquantitativer Nachweis von <i>A. acidoterrestris</i>	Orangensaft	FUNES-HUACCA et al. (2004)
Real-Time PCR	< 10 ² KbE/ml	5 h	Nachweis von <i>Alicyclobacillus</i> spp.	Orangensaft und Limonade	CONNOR et al. (2005)
	< 10 KbE/ml	3 - 5 h	Nachweis von <i>Alicyclobacillus</i> spp.	Apfelsaft	LUO et al. (2004)
Gensondentechnologie VIT®	kurze Anreicherung nötig	3 h	Nachweis und Differenzierung von <i>Alicyclobacillus</i> spp. & <i>A. acidoterrestris</i>	breiter Einsatzbereich	THELEN (2003)
Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)	2,25 x 10 ¹ KbE/ml	2 h	Nachweis von <i>A. acidoterrestris</i>	Apfelsaft	CHEN et al. (2011)
Identifizierung & Differenzierung von Isolaten					
16S rRNA Gensequenzierung	-	-	Identifizierung von Isolaten auf Spezieslevel; Erstellung von phylogenetischen Analysen	-	GOUWS et al. (2005); GOTO et al. (2008)
Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	-	-	Identifizierung von Isolaten auf Spezieslevel; Bestimmung der genetischen Variabilität verschiedener Isolate	-	YAMAZAKI et al. (1997b); GROENEWALD et al. (2009)

Aus der bakteriellen DNA werden damit mehrere Sequenzbereiche amplifiziert, die von den kurzen Primern eingeschlossen werden. Dadurch werden auf Zufallsbasis multiple Fragmente generiert, die dann nach Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese individuelle Bandenmuster ergeben, die für bestimmte Spezies und Stämme spezifisch sind, sogenannte Fingerabdrücke (YOKOTA, 2007). Ein entsprechendes Verfahren wurde von YAMAZAKI et al. (1997b) etabliert, mit dem *A. acidoterrestris* Isolate innerhalb von 6 h identifiziert bzw. differenziert werden können. Es zeigte sich allerdings, dass die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode limitiert ist, schon geringfügige Variationen bei der Reinheit bzw. Konzentration der eingesetzten DNA, aber auch der Einsatz von Biochemikalien unterschiedlicher Hersteller resultierten in abweichenden Ergebnissen (YOKOTA, 2007). Eine weitere Einsatzmöglichkeit der RAPD ist deren Anwendung zur Bestimmung von Verwandtschaftsbeziehungen verschiedener Stämme innerhalb einer Spezies. GROENEWALD et al. (2009) gelang es mit Hilfe der drei von YAMAZAKI et al. (1997b) beschriebenen Primer *A. acidoterrestris* Isolate (n = 16) anhand der RAPD-generierten Bandenmuster in vier Gruppen einzuteilen und konnte so deren genotypischen Verwandtschaftsverhältnisse zeigen.

2.4.2.3. Immunochemische Methoden

Bei immunochemischen Tests werden Analyten durch spezifische Antigen-Antikörperreaktionen nachgewiesen. Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Formen von Enzymimmuntests (enzyme immunoassay, EIA). Hervorzuheben sind hierbei der indirekte EIA sowie der Sandwich EIA. Beim indirekten EIA wird das Antigen an die feste Phase einer Mikrotiterplatte adsorbiert, die Detektion erfolgt dann mit Hilfe von für das Antigen spezifischen Antikörpern. Diese sind als Primärantikörper entweder selbst Enzym-markiert oder aber die Antigen-Antikörperreaktion wird mit Hilfe eines Enzym-markierten Sekundärantikörpers visualisiert, der an den Primärantikörper bindet. Vorteil dieses EIA-Formats ist, dass er auch dann durchgeführt werden kann wenn nur ein spezifischer Antikörper bzw. kein spezifisches Antikörper-Enzymkonjugat zur Verfügung steht. Beim Sandwich EIA wird das Antigen zuerst über an die feste Phase gebundene Fangantikörper in der Mikrotiterplatte immobilisiert und dann in einem weiteren Schritt über spezifische markierte Detektionsantikörper nachgewiesen. Zur Markierung der Antikörper werden meist Enzyme, v. a. Peroxidase, aber auch Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Prinzipiell weist das Verfahren eine sehr hohe Spezifität und Robustheit auf, auch komplexe flüssige Proben können im Gegensatz zum indirekten EIA ohne Aufarbeitung analysiert werden.

Zur Anwendung in EIAs kommen sowohl poly- als auch monoklonale Antikörper. Polyklonale Antiseren beinhalten alle Antikörper eines Versuchstieres und unter diesen auch eine Vielzahl verschiedener gegen unterschiedliche Epitope des Zielantigens gerichtete Antikörper. Monoklonale Antikörper dagegen werden in vitro von sogenannten Hybridomzellen produziert, wobei jede Zelllinie nur einen bestimmten Antikörper mit unveränderbaren Charakteristika sezerniert, der nur mit einem Epitop des Antigens reagiert. Polyklonale Antikörper können vergleichsweise einfach hergestellt werden, die Generierung monoklonaler Antikörper dagegen ist um ein Vielfaches aufwändiger und teurer. Oft wird vor der kostenintensiven Produktion monoklonaler Antikörper daher ein Testsystem mit polyklonalen Antikörpern etabliert, in dem später die polyklonalen durch monoklonale Antikörper substituiert werden können (SCHECKLIES, 1996).

Zur Untersuchung von Lebensmitteln auf Mikroorganismen wurde eine Vielzahl an EIAs beschrieben, z. B. zum Nachweis von Salmonellen in Schweinefleisch, Meeresfrüchten und Hühnereiern (BRIGMON et al., 1995; MOUSING et al., 1997; KUMAR et al., 2008), von *Listeria monocytogenes* (HEARTY et al., 2006; PORTANTI et al., 2011), *E. coli* (PADHYE & DOYLE, 1991; GALIKOWSKA et al., 2011) oder *Vibrio parahaemolyticus* (KUMAR et al., 2011). Speziell für Fruchtsäfte wurden einige EIAs publiziert, u. a. für den Nachweis der Authentizität von Zitrusfruchtsäften (SASS-KISS & SASS, 2000, 2002), für die Detektion von Ochratoxin A in Grapefruitsaft (WANG et al., 2007) sowie des Insektizids Carbofuran in verschiedenen Säften (ABAD et al., 1997). Bei der Identifizierung von Mikroorganismen in Fruchtsaftprodukten standen bisher v. a. Schimmelpilze und Hefen im Fokus, so wurden beispielsweise EIAs zur Detektion der Verderbserreger *Botrytis* in Traubensaft bzw. von *Geotrichum candidum* in Tomatensaft beschrieben (DEWEY et al., 2000; THORNTON et al., 2010).

Für den Nachweis von Alicyclobazillen in Säften wurden in den letzten Jahren von den Arbeitsgruppen um die Autoren Li sowie Wang verschiedene EIAs publiziert. Allen beschriebenen Testverfahren war gemein, dass vegetative Zellen von Alicyclobazillen als Target dienten, sowie dass polyklonale Antiseren eingesetzt wurden. Die Arbeitsgruppe um Li entwickelte zunächst einen indirekten (LI et al., 2013) sowie später einen Sandwich EIA (LI et al., 2014) zur Detektion von *A. acidoterrestris* in Apfelsaft- bzw. Apfelsaftkonzentrat. Zur Generierung der im indirekten EIA eingesetzten Kaninchenantisera wurde der *A. acidoterrestris* Stamm DSM 3922 als Immunogen eingesetzt (Tabelle 2.5). Dazu wurden die Keime auf K Agar angereichert (36 h, 43 °C), mit steriler Kochsalzlösung abgeerntet und mehrmals gewaschen, bevor Kaninchen wiederholt intravenös mit 10^9 bzw. 2×10^9 KBE der

Tabelle 2.5. Bislang beschriebene polyklonale Antiseren für den Nachweis von *Alicyclobacillus* spp.

Referenz	Testprinzip	Zielantigen	Immunogen	Herkunft der Antiseren	Immunisierung
LI et al. (2013)	Indirekter EIA	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>A. acidoterrestris</i> DSM 3922;	Kaninchen	intravenös
LI et al. (2014)	Sandwich EIA		Inaktivierung: k. A. ¹	Kaninchen & Ratten	k. A. ¹
WANG et al. (2012)	Indirekter EIA	<i>Alicyclobacillus</i> spp.	<i>A. acidoterrestris</i> DSM 3922;	Kaninchen	subkutan
WANG et al. (2013a)	IMS-EIA (EIA nach immunomagnetischer Separation)		Inaktivierung: Erhitzung auf 121 °C für 30 min		

¹: k. A. = keine Angabe

Tabelle 2.6. Charakteristika von immunchemischen Verfahren zur Detektion von *Alicyclobacillus* spp.

Referenz	Testprinzip	Nachweisgrenze (KbE/ml)	Anzahl getesteter <i>Alicyclobacillus</i> -Stämme	Anzahl getesteter Nicht- <i>Alicyclobacillus</i> -Stämme
LI et al. (2013)	Indirekter EIA	10 ⁵	1	5
LI et al. (2014)	Sandwich EIA	5 x 10 ³	1	7
WANG et al. (2012)	Indirekter EIA	10 ⁵	12	54
WANG et al. (2013a)	IMS-EIA (EIA nach immunomagnetischer Separation)	10 ³	20	18

Bakteriensuspension immunisiert wurden. Angaben zur Inaktivierung der Keime vor Immunisierung der Tiere konnten der Publikation nicht entnommen werden. Die Detektion der im indirekten EIA gebundenen Antikörper erfolgte mittels Peroxidase-markiertem Protein A. Für den von LI et al. (2014) beschriebenen Sandwich EIA wurden spezifische Kaninchenantiseren als Fangantikörper eingesetzt, zum Nachweis gebundener Keime wurde eine Mischung aus spezifischen Rattenantiseren und Peroxidase-markierten Sekundärantikörpern verwendet. Die Sensitivität der entwickelten immunochemischen Verfahren für *A. acidoterrestris* wurde ausschließlich anhand des als Immunogen verwendeten Stammes DSM 3922 überprüft, die Nachweisgrenzen lagen hierbei bei 10^5 KbE/ml (indirekter EIA) bzw. 5×10^3 KbE/ml (Sandwich EIA). Eine Kreuzreaktivität der eingesetzten Antiseren mit Nicht-*Alicyclobacillus* Spezies konnte nicht festgestellt werden, wobei allerdings nur einige wenige Stämme (Tabelle 2.6) überprüft wurden. Die Einsetzbarkeit des EIA für Apfelsaft- bzw. Apfelsaftkonzentrat wurde ebenfalls getestet. Für Proben, die mit 1 KbE/ml eines *A. acidoterrestris* Stammes inokuliert und unter Schütteln bei 45 °C für 12 h inkubiert worden waren, konnten in beiden EIAs positive Ergebnisse erzielt werden. Allerdings wurden die kontaminierten Proben nicht direkt in die EIAs eingesetzt, sondern zunächst zur Gewinnung der vegetativen Zellen abzentrifugiert, analysiert wurde dann das in Bicarbonatpuffer gelöste Pellet.

Die Arbeitsgruppe um Wang entwickelte ebenfalls einen indirekten EIA (WANG et al., 2012) sowie einen EIA in Kombination mit immunomagnetischer Separation (IMS-EIA; siehe unten) zum Nachweis von *Alicyclobacillus* spp. in Apfelsaft (WANG et al., 2013a). Zur Herstellung des Immunogens wurde ebenfalls wie von der Arbeitsgruppe um Li der *A. acidoterrestris* DSM Stamm 3922 verwendet. Dieser wurde in AAM Medium bei 45 °C für 24 h angereichert und dann durch Erhitzung auf 121 °C für 30 min inaktiviert, bevor Kaninchen mehrmals mit 10^8 KbE der in Kochsalzlösung suspendierten Bakterien subkutan immunisiert wurden (Tabelle 2.5). Die Nachweisgrenzen der etablierten EIA-Verfahren lagen bei 10^5 (indirekter EIA) bzw. 10^3 KbE/ml (IMS-EIA) für Stamm DSM 3922 (Tabelle 2.6). Untersuchungen zur Intra- und Intergenusspezifität der Verfahren unter Verwendung verschiedener Stämme von *Alicyclobacillus* spp. sowie Nicht-*Alicyclobacillus* spp. (Tabelle 2.6) zeigten, dass die EIAs hochselektiv für *Alicyclobacillus* spp. waren und nur geringe Kreuzreaktivitäten mit Nicht-*Alicyclobacillus* spp. aufwiesen. Mit Hilfe des IMS-EIA konnte 1 KbE/ml *A. acidoterrestris* in Apfelsaftproben nach 24 h Anreicherung bei 45 °C nachgewiesen werden (Tabelle 2.6).

Für die Detektion von Sporen von Alicyclobazillen wurden bisher keine Antikörper bzw.

EIAs publiziert. QUINLAN und FOEGEDING (1998) beschrieben jedoch die Etablierung von EIAs für den Nachweis von Sporen verschiedener *Bacillus* und *Clostridium* spp. Des Weiteren wurden von TAMBORRINI et al. (2010) und KUEHN et al. (2009) EIA-Verfahren zur Detektion von Sporen von *B. anthracis*, sowie von LAVILLA et al. (2008) und BERGERE und FAVREAU (1987) Testsysteme für Sporen von *C. tyrobutyricum* entwickelt.

Eine vielversprechende, auf Bioaffinität beruhende Technik ist die Immunomagnetische Separation (IMS). Diese Methode wird eingesetzt, um Mikroorganismen, Zellen und Moleküle wie Protein oder DNA schnell aus Proben zu isolieren und so weit aufzukonzentrieren, dass im Anschluss die Detektion erleichtert oder bei hohen Nachweisgrenzen erst ermöglicht wird. Oft werden im Anschluss PCR-basierte Methoden zur Identifizierung von angereicherten Mikroorganismen durchgeführt, die Kombination mit anderen Methoden wie EIA ist ebenfalls möglich (SAFARIK & SAFARIKOVA, 1999). Da die klassische, zeitintensive, kulturbasierte Anreicherung entfällt, kann ein Nachweis oft innerhalb kürzester Zeit erfolgen. Für die IMS werden magnetische, mit Antikörpern beschichtete Partikel eingesetzt (HORAK et al., 2007). Bei Inkubation dieser Partikel mit einer Probe binden die Antikörper-gekoppelten Partikel an das für den Antikörper spezifische Target (z. B. Bakterien), die Antigen-Antikörper-Komplexe können dann durch Anlegen eines magnetischen Feldes von der Probenmatrix separiert werden. Diese selektive Anreicherung des Analyten erleichtert bzw. ermöglicht erst die anschließende Detektion, falls das eingesetzte Nachweisverfahren nur eine geringe Sensitivität aufweist (OLSVIK et al., 1994; STEVENS & JAYKUS, 2004). Die Methode wurde bereits erfolgreich zur Aufkonzentrierung verschiedener Mikroorganismen in Lebensmitteln eingesetzt, u. a. für Salmonellen, *E. coli*, Shigellen, *S. aureus*, *L. monocytogenes* und *Mycobacterium paratuberculosis* (GRANT et al., 1998; OZALP et al., 2013; MA et al., 2014; SHAN et al., 2014). Zudem wurde die Anwendung der Methode beispielsweise zur Anreicherung von Mikroorganismen wie Salmonellen oder *E. coli* aus verschiedenen Säften (Zitronen- und Apfelsaft) beschrieben (BAKTHAVATHSALAM et al., 2013; NAJAFI et al., 2014). Entsprechende Verfahren ermöglichen auch die Isolierung von *B. anthracis*, *B. stearothermophilus* sowie *C. tyrobutyricum* Sporen aus Lebensmitteln (BLAKE & WEIMER, 1997; LAVILLA et al., 2012; SHIELDS et al., 2012). Speziell für die Anreicherung von vegetativen Zellen von *A. acidoterrestris* aus Apfel- bzw. Kiwisaft wurde, wie oben erwähnt, ein IMS-System etabliert, dessen Anwendung wurde in Kombination mit verschiedenen Detektionsverfahren wie EIA, PCR bzw. Real-Time PCR beschrieben (WANG et al., 2013b; WANG et al., 2013a; WANG et al., 2014).

III. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Reagenzien

Aktivierete Peroxidase (Roche, 11 428 861 001)

Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (Roche, 04693124001)

DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (50) (Qiagen, 69504)

dNTP Mix (Thermo Scientific, #R0192)

Gel Loading Dye Purple (6x) (BioLabs, #B70245)

Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, #SM 0323)

GEN-IAL[®] First-Alicyclobacillus Multiplex PCR Kit (GEN-IAL GmbH, TPABM 0050 R)

Guaiacol Detection Kit (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., LTD, KYO-08921)

L(-)-Äpfelsäure (Carl Roth, 8684)

Lightning-Link[®] Horseradish Peroxidase (Innova Biosciences, 701-0010)

LMW-SDS Marker Kit (GE Healthcare Life Sciences, 17-0446-01)

Magnesium Chloride Solution (Thermo Scientific, AB-0359)

Nycodenz AG (Axis-Shield PoC, 1002424)

O'Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, #SM 1173)

peqGold Universal Agarose (peqlab, 35-1020)

PhastGel Blue R (Sigma-Aldrich, B4921)

PP1T LightCycler[®]480 Colour Compensation Kit (GEN-IAL GmbH, PP1T CC LC480 0005)

Reaction Buffer IV (Thermo Scientific, AB-0289)

Sigma Adjuvant System[®] (Sigma-Aldrich, S6322)

StabilZyme[®] HRP Conjugate Stabilizer (SurModics, SZ02.1000)

SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, 37074)

Syto[®] 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain (Life Technologies, S-34854)

Thermoprime Plus *Taq* DNA Polymerase (Thermo Scientific, AB-0301)

Vanillinsäure, 98 % (Alfa Aesar, A12074)

Alle anderen, nicht eigens aufgeführten Reagenzien wurden in pro analysi-Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich, Merck KGaA bzw. Oxoid bezogen.

3.1.2 Lösungen und Puffer

Coomassie-Proteinfärbung

- Färbelösung: 1 Tablette Coomassie Blue R "PhastGel", 120 ml Methanol, 80 ml A. dest., kurz vor Einsatz 10 % (v/v) Eisessig zusetzen
- Entfärbelösung: 150 ml Methanol, 50 ml Eisessig, 300 ml A. dest.
- Fixierlösung: 50 ml Eisessig, 25 ml Glycerin, 425 ml A. dest.

Enzymimmuntest (Enzyme immunoassay, EIA)

- Bicarbonatpuffer (0,05 M, pH 9,6): 1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃, 1 l A. dest.
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS; pH 7,3): 6,79 g NaCl, 1,47 g Na₂HPO₄, 0,43 g KH₂PO₄, 1 l A. dest.
- Lösung zum Absättigen: PBS mit Zusatz von 3 % (g/v) Casein
- Waschlösung: 8,55 g NaCl, 2,5 ml Tween 20, 10 l A. dest.
- Probenverdünnungspuffer (Sandwich-EIA): PBS mit Zusatz von 0,1 % (v/v) Tween 20
- Lösung zur Verdünnung der Peroxidase-markierten Sekundärantikörper: PBS mit Zusatz von 1 % (g/v) Casein
- Citratpuffer (0,23 M): 44,129 g Citronensäure Monohydrat, 800 ml A. dest., mit 1 M KOH auf pH 3,95 einstellen, danach 336 µl H₂O₂ zusetzen
- Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung: 45 ml Methanol, 5 ml Aceton, 252 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
- Chromogen-/Substratlösung: 20 Teile Citratpuffer, 1 Teil TMB-Lösung
- Lösung zum Abstoppen der Reaktion: 1 M H₂SO₄

Herstellung von HRP-Konjugaten

- Kopplungspuffer: 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8): (A) 8,71 g K₂HPO₄ auf 5 l A. dest., (B) 1,36 g KH₂PO₄ auf 1 l A. dest., B zu A geben bis pH 8,0, danach 50 mM NaCl zusetzen
- Natriumcarbonatpuffer (0,5 M, pH 9,5): (A) 2,1 g NaHCO₃, (B) 2,65 g Na₂CO₃ jeweils auf 50 ml A. dest., B zu A geben bis pH 9,5
- Triethanolaminlösung (2 M, pH 8): 2,66 ml Triethanolamin, 3 ml A. dest., mit 5 M HCl auf pH 8 einstellen, A. dest. ad 10 ml

- Natriumborhydridlösung (200 mM): 8 mg NaBH_4 , 1 ml A. dest., auf Eis
- Glycin-Lösung (1 M, pH 7): 0,75 g Glycin, 6 ml A. dest., mit 0,1 M NaOH auf pH 7 einstellen, A. dest. ad 10 ml

Immunoblot

- Anodenpuffer I: 37,2 g Trizma Base, 200 ml Methanol, A. dest. ad 1 l
- Anodenpuffer II: 3,02 g Trizma Base, 200 ml Methanol, A. dest. ad 1 l
- Kathodenpuffer: 5,24 g 6-Amino-n-Caprinsäure, 3,02 g Trizma Base, 200 ml Methanol, A. dest. ad 1 l
- Lösung zum Absättigen: 3 g Casein, 100 ml PBS, 25 μl Tween 20

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

- Tris/HCl-Puffer: 0,73 g Tris, A. dest. ad 100 ml, mit 1 M HCl auf pH 8,0 einstellen
- SDS-Puffer: 0,2 g EDTA, 15 g SDS, Tris/HCl-Puffer ad 200 ml
- Bromphenolblau-Lösung: 0,3 % (g/v) Bromphenolblau in A. dest.

pH-Wert Einstellung von Fruchtsaftproben

- Sørensen-Phosphatpuffer (1 M, pH 6,5): (A) 14,2 g KH_2PO_4 , (B) 13,6 g Na_2HPO_4 jeweils auf 100 ml A. dest.; B zu A geben bis pH 6,5

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

- TAE-Puffer (50x): 2 M Tris Base, 50 mM EDTA mit H_2SO_4 pH auf 8,0 einstellen, A. dest. ad 1 l
- Ethidiumbromidlösung: 10 mg/ml Ethidiumbromid in A. dest.

3.1.3. Nährmedien

Alicyclobazillen

- BAT (*Bacillus acidoterrestris thermophilus*) Bouillon (Scharlau Microbiology, 02-675): 11 g; A. dest. ad 1 l; nach Autoklavieren mit 0,5 M H₂SO₄ auf pH 4 einstellen
- BAT Agar (Merck, 1.07994.0500): 29 g, modifiziert durch Zusatz von 4 g Agar Bacteriological (Agar No. 1; Oxoid, LP 0011), A. dest. ad 1 l; nach Autoklavieren mit 0,5 M H₂SO₄ auf pH 4 einstellen
- Versporungsagar für *Bacillus cereus* (modifiziert für *Alicyclobacillus*): 3 g Fleischextrakt, 5 g Pepton, 0,05 g MnSO₄, 15 g Agar Bacteriological, A. dest. ad 1 l; nach Autoklavieren mit 0,5 M H₂SO₄ auf pH 4 einstellen
- YSG (Yeast Starch Glucose) Agar: 2 g Hefeextrakt, 1,1 g Glucose-Monohydrat, 2 g lösliche Stärke, 15 g Agar Bacteriological, A. dest. ad 1 l; nach Autoklavieren mit 1 M HCl auf pH 3,7 einstellen
- Vanillin-YSG (VYSG) Bouillon: 2 g Hefeextrakt, 1,1 g Glucose-Monohydrat, 2 g lösliche Stärke, 100 mg Vanillinsäure, A. dest. ad 1 l; nach Autoklavieren mit 1 M HCl auf pH 3,7 einstellen
- K Agar: 5 g Pepton, 2 g Hefeextrakt, 1,1 g Glucose-Monohydrat, 1 g Tween 80, 15 g Agar Bacteriological, A. dest. ad 1 l; nach Autoklavieren mit 25 % (g/v) Äpfelsäure auf pH 3,7 einstellen
- Plate Count (PC) Agar (Oxoid, CM 0325): 17,5 g, modifiziert durch Zusatz von 1 g Magermilchpulver (Oxoid, LP 0031) und 3 g Agar Bacteriological, A. dest. ad 1 l

Hybridomzellen:

- HT-Zellkulturmedium: 500 ml Dulbecco's Medium, 100 ml FCS, 5 ml Natriumpyruvat (100 mM), 10 ml L-Glutamin (200 mM), 5 ml Mercaptoethanol (5 mM), 5 ml Hypoxanthin (10 mM)/Thymidin (1,6 mM);
- HAT-Selektivmedium: HAT-Medium + 0,4 µM Aminopterin

3.1.4 Immunoreagenzien

Alexa Fluor[®] 488 Goat anti-Mouse IgG (H+L) (Invitrogen, A11029)

Alexa Fluor[®] 488 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (Invitrogen, A11034)

Horse anti-Mouse IgG-HRP (H&L) (Cell Signaling, #7076)

Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (Sigma-Aldrich, ISO2)

Polyclonal Rabbit anti-Mouse Immunoglobulins (Dako, Z0259)

Polyclonal Rabbit anti-Mouse Ig-HRP (Dako, P0161)

Polyclonal Swine anti-Rabbit Ig-HRP (Dako, P0217)

3.1.5 Geräte

Immunfluoreszenzmikroskop BZ-8000 (Keyence)

Kamera Geldokumentation Felix (biostep)

Kodak Image Station 200MM (Biostep)

LightCycler[®] 480 (Roche)

Mikrotiterplatten-Lesegerät Sunrise (Tecan)

NovaBlot Multiphor II (GE Healthcare)

PCR Express (Thermo Hybaid)

Perfect Blue Gelsystem Mini M (peqlab, 40-0911)

PhastSystem Separation and Control Unit (Pharmacia)

Photometer Specord 200 Plus (Analytik Jena)

3.1.6 Sonstige Materialien

Electrode Paper Novablot (GE Healthcare, 80-1106-19)

Immobilon-P Transfermembran, 0,45 µm (Millipore, IPVH304F0)

Maus-Myelomzellen X63-Ag8.653 (DSM, ACC-43)

Mikrotiterplatten, 96 Loch (Nunc, 439454)

Mikrotiterplatten, 96 Loch, weiß (Nunc, 436110)

miniPERM Bioreaktor (Sarstedt, 94.6001.059)

PhastGel Probenauftragskämme 8/1 µl (GE Healthcare, 18-1618-01)

PhastGel Gradient 10-15 (GE Healthcare, 17-0540-01)

PhastGel SDS Pufferstreifen (GE Healthcare, 17-0516-01)

3.2 Methodik

3.2.1 Immunochemische Verfahren

3.2.1.1 Indirekte EIA-Verfahren

Die prinzipielle Funktionsweise indirekter EIAs besteht darin, dass spezifische Antikörper (je nach Fragestellung polyklonale Antiseren oder monoklonale Antikörper) an ein Antigen binden, das an die feste Phase einer Mikrotiterplatte gebunden ist. Nach dem Entfernen von nicht gebundenen Antikörpern durch Waschschrte können Antigen-Antikörperreaktionen durch mit Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) markierte Sekundärantikörper nachgewiesen werden. Nach Zugabe der Chromogen/Substratlösung, Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure und Messung der Absorption bei 450 nm kann der Anteil gebundener Antikörper quantifiziert werden.

Die als Antigen eingesetzten Sporenpräparationen wurden abhängig von der Fragestellung entweder in gleichbleibender Konzentration zur Bestimmung der Antikörpertiter oder als serielle Verdünnungsreihen bei der Bestimmung der Antikörper-Affinität in Bicarbonatpuffer (100 µl/well) über Nacht bei 4 °C – um eine Auskeimung zu verhindern – auf Mikrotiterplatten in einer feuchten Kammer inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt, die verschiedenen Inkubationsschritte erfolgten jeweils auf einem Taumelschüttler in einer feuchten Kammer. Nicht gebundenes Material der Sporensuspensionen wurde nach Inkubation über Nacht durch Absaugen entfernt, danach wurden die Mikrotiterplatten mit 3 % (g/v) Casein/PBS-Lösung (150 µl/well) für mindestens 30 min inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurden Reste des Sporenmaterials und Caseins durch dreimaliges Waschen entfernt und die Platten auf einem Zellstoffstapel gründlich ausgeklopft. Dann erfolgte die Zugabe der zu überprüfenden Antiseren bzw. antikörperhaltigen Zellkulturüberstände (ZKÜ) oder monoklonalen Antikörper (mAK) ebenfalls entweder in gleichbleibender Konzentration (Bestimmung der Affinität) oder als Verdünnungsreihe (Bestimmung der Antikörpertiter bzw. Überprüfung der Produktivität der Hybridomzelllinien) in PBS (100 µl/well). Nach einstündiger Inkubationszeit und erneutem Waschschrte (4 x) wurden enzymmarkierte Sekundärantikörper, verdünnt in 1 % (g/v) Casein/PBS-Lösung (100 µl/well), zugesetzt, diese wurden ebenfalls für 1 h inkubiert. Danach wurde 5 x gewaschen, um überschüssige Sekundärantikörper zu entfernen, sowie im Anschluss die Chromogen/Substratlösung appliziert (100 µl/well) und für 20 min inkubiert. Als letzter Schrit wurde die enzymatische

Reaktion durch Zusatz von 1 M Schwefelsäure (100 µl/well) abgestoppt und die Signalintensität des EIA im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 450 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Ridasoft Win-Software (r-biopharm).

3.2.1.2 Sandwich EIA-Verfahren

Im Unterschied zu indirekten EIAs, bei denen das Antigen an die feste Phase einer Mikrotiterplatte gebunden ist, werden bei Sandwich EIAs spezifische Antikörper an die feste Phase gebunden. Das zu detektierende Antigen wird mit diesen Fangantikörpern inkubiert, nicht gebundenes Antigen dann durch mehrmaliges Waschen entfernt. Mit Hilfe von für das Antigen spezifischen Peroxidase-markierten Detektionsantikörpern kann gebundenes Antigen nach Zugabe der Chromogen/Substratlösung nachgewiesen und quantifiziert werden.

Als Fangantikörper wurden spezifische polyklonale Antiseren oder aufgereinigte mAK verdünnt in Bicarbonatpuffer verwendet (100 µl/well), die Beschichtung der Mikrotiterplatten erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Analog zum indirekten EIA wurden freie Bindungsstellen abgesättigt, nach dreimaligem Waschen erfolgte die Zugabe des in PBS mit Zusatz von 0,1 % (v/v) Tween gelösten Sporenmaterials. Nach 1 h wurde nicht gebundenes Antigen durch viermaliges Waschen entfernt. Zur Detektion wurde HRP-markiertes, für Alicyclobazillen spezifisches Kaninchenserum in einer Verdünnung von 1:500 in 1 % (g/v) Casein/PBS eingesetzt. Das weitere Vorgehen erfolgte analog zu dem unter 3.2.1.1 beschriebenen indirekten EIA.

3.2.1.3 Immunfluoreszenz

Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde die Reaktivität der polyklonalen Mäuse- und Kaninchenantiseren bzw. der mAK mit *A. acidoterrestris* überprüft. Zum Einsatz kamen dabei Sporenpräparationen oder vegetative Zellen (ca. 10^8 KbE/ml). Zur Durchführung wurden die keimhaltigen Präparationen bei 4.600 x g für 15 min abzentrifugiert und dann in 245 µl PBS mit Zusatz von 2 % (g/v) BSA (bovines Serumalbumin) und 1 % Tween 20 resuspendiert. Nach Zugabe der spezifischen Antiseren (im Verhältnis 1:50) bzw. antikörperhaltigen ZKÜ (im Verhältnis 1:5) wurden die Sporen- bzw. Zellsuspensionen für 30 min bei Raumtemperatur im Intellimixer (Schwenkradius 60, Geschwindigkeit 27) schwenkend inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden danach durch einen Wasch-Zentrifugationsschritt entfernt (4.600 x g, 15 min), das Pellet entsprechend des ursprünglichen

Volumens in PBS wieder aufgenommen und mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (Alexa Fluor[®] 488 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) bzw. Alexa Fluor[®] 488 Goat anti-Mouse IgG (H+L)) im Verhältnis 1:250 für weitere 30 min lichtgeschützt unter Schwenken inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift zur Entfernung überschüssiger Sekundärantikörper und Resuspension in 250 µl PBS, erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung. Dazu wurden jeweils Aliquote von 5 µl eingesetzt.

3.2.1.4 Immunoblot

Um die Reaktivität der Antikörper mit Sporenprotein-Präparationen zu überprüfen, wurden die über SDS-PAGE (3.2.2) aufgetrennten Proteine mittels Semidry Blotting Verfahren in einer NovaBlot Multiphor II Blottingkammer von den Polyacrylamidgelen luftblasenfrei auf Immobilon P-Membranen transferiert (1 h, 600 V, 17 mA, 30 W).

Zur Überprüfung der Blotting-Effizienz und zur Markierung der Eichproteine wurde die Membran anschließend in Ponceau-S Lösung angefärbt. Um freie Bindungsstellen an den Membranen zu blockieren, wurden diese dann für 1 h bei Raumtemperatur in Absättigungslösung inkubiert. Im Anschluss wurde der Primärantikörper (polyklonales Kaninchen- oder Mäuseantiserum, bzw. ZKÜ oder mAK), verdünnt wiederum in der Absättigungslösung für 1 h auf die Membran aufgetragen. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran dann mehrmals mit PBS mit Zusatz von 0,1 % (v/v) Tween 20 gewaschen, zunächst für 20 – 30 min ohne Schütteln und dann für 3 x 10 min mit Pufferwechsel auf dem Taumelschüttler. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation der Membranen mit Peroxidase-markierten Sekundärantikörpern (Schwein anti-Kaninchen-HRP bzw. Pferd anti-Maus-HRP, 1:2000 verdünnt in Absättigungslösung). Die Membran wurde abschließend erneut gewaschen und zusätzlich für 2 x 10 min mit reinem PBS gespült. Im letzten Schritt wurde die Membran für 3 min im Dunkeln mit SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate inkubiert, bevor die Lumineszenzentwicklung auf der Membran über eine Kodak Image Station 200MM detektiert wurde.

3.2.2 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Die Auftrennung von proteinhaltigen Proben erfolgte mittels Flachbett-Gelelektrophorese (PhastSystem von GE Healthcare) auf Gradienten-Polyacrylamidgelen (10 – 15 %). Die Proben (20 µl) wurden dazu zunächst mit 10 µl SDS-Puffer und 1 µl Bromphenolblau-Lösung versetzt und dann für 10 min im Wasserbad gekocht. Aliquote der Ansätze (1 µl) wurden auf die Gele aufgetragen und dann elektrophoretisch bei 250 V, 10 mA, 3 W, 65 Vh und 15 °C für ca. 25 min aufgetrennt.

Die Färbung der getrennten Proteinbanden mittels Coomassie-Blau Lösung erfolgte für 45 min. Danach wurden die Gele mit Entfärbelösung nach Bedarf behandelt, anschließend gewässert und letztlich für 10 min mit Fixierlösung konserviert.

3.2.3 Generierung und Selektion von Hybridomzelllinien

Mit dem Ziel der Etablierung monoklonaler Antikörper gegen Sporen von *A. acidoterrestris* wurden unter Verwendung der Hybridom-Technik Hybridomzelllinien generiert. Dazu wurden die axillären Lymphknoten und die Milzen von ausgewählten Mäusen steril entnommen und nach der Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde das Zellmaterial unter Einwirkung von Polyethylenglykol 1500 mit murinen Myelomzellen der Linie X63-Ag8.653 fusioniert. Die resultierenden Hybridome wurden in Zellkulturmedium aufgenommen und dann auf mit Maus-Peritonealmakrophagen vorbeschichteten Mikrotiterplatten im CO₂-Brutschrank (7 % CO₂-Atmosphäre) für 10 d bei 37 °C vermehrt bzw. bei -80 °C für eine spätere Verwendung konserviert.

Nach 10 d erfolgte ein Screening der ZKÜ auf Produktion von Antikörpern gegen Alicyclobazillen, zunächst ausschließlich unter Verwendung indirekter EIAs. Nach Etablierung eines Sandwich EIA Systems wurde kryokonserviertes Zellmaterial aufgetaut und zusätzlich auch mit Hilfe dieses Systems auf Antikörperproduktion überprüft. Zelllinien, die positiv reagierten, wurden mindestens dreimal mittels Endpunktverdünnung (Limiting Dilution) kloniert und weiter vermehrt. Im Anschluss an die Charakterisierung der produzierten Antikörper wurden ausgewählte Zelllinien in miniPerm Bioreaktoren massenproduziert. Die so generierten und mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällten antikörperhaltigen Zellkulturüberstände wurden anschließend über Protein A-Agarose affinitätschromatographisch aufgereinigt.

3.2.4 Peroxidase-Test

Grundsätzlich kann mit dem Peroxidase-Test überprüft werden, ob *Alicyclobacillus* Isolate Guajacol aus Vanillinsäure bilden können. Die prinzipielle Funktionsweise der Peroxidase-Methode wurde in 2.4.2.1 erläutert, zur Durchführung des Tests kam das Guaiacol Detection Kit zum Einsatz.

Zunächst wurden die zu untersuchenden Isolate in Vanillin-YSG (VYSG) Bouillon inokuliert. Dazu wurde jeweils eine Öse Koloniematerial der auf YSG-Agarplatten angereicherten Isolate in 1 ml Bouillon verbracht, diese wurde dann für 3 h bei 45 °C im Heizblock inkubiert. Zur Detektion von gebildetem Guajacol wurden im Anschluss je 1 ml von Reagenz 1 (Kaliumhydrogenphthalat-Puffer) des Guaiacol Detection Kits, sowie jeweils 20 µl von Reagenz 2 (H₂O₂-Lösung) und Reagenz 3 (Peroxidase-Phosphorsäure-Puffer) zur Probe hinzugefügt und gründlich gemischt. Nach mindestens 5 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Auswertung unter Vergleich der Proben mit den Positiv- bzw. Negativkontrollen. Als Positivkontrolle wurde zum einen VYSG-Bouillon eingesetzt, die mit einer Guajacol-Lösung versetzt wurde, sowie ein Ansatz der mit dem Guajacol-produzierenden *A. acidoterrestris* Referenzstamm DSM 2498 inokuliert worden war. Neben steriler, nicht inokulierter VYSG-Bouillon wurden mit *A. acidocaldarius* DSM Stamm 446 inokulierte Proben als Negativkontrollen eingesetzt. Die Bildung von Guajacol in einem Ansatz wird durch einen Farbumschlag von hellgelb zu rotbraun angezeigt, der schon mit bloßem Auge sichtbar ist.

3.2.5 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Um die genotypische Diversität der Lebensmittelisolate zu ermitteln, wurden RAPD-Verfahren (Random Amplified Polymorphic DNA) eingesetzt (2.4.2.2). Dazu wurden die für *A. acidoterrestris* spezifischen Primer BA-10 (5'-AAC GCG CAA C-3') und F-64 (5'-GCC GCG CCA GTA-3') verwendet (YAMAZAKI et al., 1997b; GROENEWALD et al., 2009).

Die PCRs wurden in einem Volumen von 25 µl durchgeführt, eingesetzt wurden jeweils 25 ng/µl DNA, 25 mM MgCl₂, 200 nM dNTP, 10 µM Primer, 5 U/µl *Taq* DNA Polymerase sowie 10 x Reaktionspuffer. Die PCR fand unter folgenden Bedingungen statt: initiale Denaturierung bei 95 °C für 10 min, in den nachfolgenden Zyklen für 30 sek. Die Annealingtemperatur (30 sek) betrug bei Verwendung des Primers BA-10 44 °C und bei Primer F-64 45,2 °C, die optimalen Annealingtemperaturen wurden mit Hilfe eines Temperaturgradienten ermittelt. Die Elongation der DNA-Stränge erfolgte bei 72 °C für

1 min, die aus 40 Zyklen resultierenden PCR-Produkte wurden abschließend zur Stabilisierung für 10 min auf 72 °C erhitzt und danach auf 4 °C gekühlt.

Im Anschluss wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese anhand der Fragmentlängen der DNA aufgetrennt. Die Proben wurden zu diesem Zweck mit Gel-Lade-Puffer (6 x) vermischt und in die Taschen von 1,5 % (g/v) Agarose-Gelen appliziert. Die verwendeten Gele wurden folgendermaßen hergestellt: 1,5 % (g/v) Agarose in TAE-Puffer aufkochen, in Gelträger mit eingesetztem Kamm gießen und aushärten lassen, dann in eine Elektrophoresekammer (Perfect Blue Gelsystem Mini M), gefüllt mit TAE-Puffer, legen und Kamm entfernen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 180 V, 400 mA und 80 W für 40 min, danach wurden die Gele zur Anfärbung der DNA in einem Ethidiumbromidbad inkubiert, kurz im Wasserbad geschwenkt und die generierten Bandenmuster schließlich unter UV-Licht ($\lambda=320$ nm) visualisiert und fotografiert. Als Standards wurden Gene Ruler 100 bp plus DNA Ladder und O'Gene Ruler DNA Ladder Mix eingesetzt.

IV. ERGEBNISSE

4.1 Etablierung und Charakterisierung einer Stammbibliothek

4.1.1 Etablierung einer *Alicyclobacillus*-Stammbibliothek

Zur Erstellung einer Stammbibliothek wurden Stämme und Isolate unterschiedlicher Quellen gesammelt. Im Einzelnen wurden zwölf Referenzstämme von Alicyclobazillen (Tab. 4.1) von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Weitere präsumtive *Alicyclobacillus* Isolate aus Fruchtsaftproben wurden von dem spanischen Labor AINIA, der LADR GmbH, der Wild GmbH, der Niederrhein-GOLD Tersteegen GmbH sowie der EMIG GmbH zur Verfügung gestellt bzw. im Rahmen eigener Untersuchungen isoliert. Die etablierte Stammbibliothek umfasste damit insgesamt 61 *Alicyclobacillus* spp., davon waren 12 DSM Referenzstämme sowie 49 Isolate aus verschiedenen Fruchtsäften.

Tabelle 4.1: Im Rahmen der Untersuchungen eingesetzte, von der DSMZ bezogene Stämme des Genus *Alicyclobacillus*.

DSM-Stamm	Spezies	Herkunft
DSM 2498	<i>A. acidoterrestris</i>	Saft
DSM 3922 ^T	<i>A. acidoterrestris</i>	Gartenboden
DSM 3923	<i>A. acidoterrestris</i>	Gartenboden
DSM 3924	<i>A. acidoterrestris</i>	Gartenboden
DSM 4005	<i>A. cycloheptanicus</i>	Gartenboden
DSM 4006	<i>A. cycloheptanicus</i>	Erdboden
DSM 4007	<i>A. cycloheptanicus</i>	
DSM 446	<i>A. acidocaldarius</i>	Saure heiße Quellen
DSM 13609	<i>A. herbarius</i>	Getrocknete Hibiskusblüten
DSM 14558	<i>A. acidiphilus</i>	Saures Getränk
DSM 17974	<i>A. sacchari</i>	Flüssigzucker
DSM 17978	<i>A. fastidiosus</i>	Apfelsaft

^T: Typstamm

Zur mikrobiologischen Charakterisierung wurden die Stämme auf modifiziertem BAT-Agar im 3-Ösen-Ausstrich angereichert (2 d Inkubation bei 45 °C, 55 °C oder 65 °C), die Reinkulturen wurden anschließend bei -80 °C kryokonserviert.

Die im Rahmen der Etablierung der Keime gewonnenen Daten zum Sporulationsvermögen, Wachstumsintensität auf modifizierten BAT-Agarplatten bzw. Wachstums-Temperaturoptimum sind in Tab. 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Eigenschaften und Herkunft der zur Erstellung einer *Alicyclobacillus*-Stammbibliothek eingesetzten Isolate bzw. Referenzstämme.

Bezeichnung	Spezies/Herkunft	Sporulation	Wachstum [#]	Temperatur [*]
Referenzstämme				
DSM 2498	<i>A. acidoterrestris</i>	++	gut	45 °C
DSM 3922 ^T	<i>A. acidoterrestris</i>	+	gering	45 °C
DSM 3923	<i>A. acidoterrestris</i>	++	gut	45 °C
DSM 3924	<i>A. acidoterrestris</i>	++	gut	45 °C
DSM 4005	<i>A. cycloheptanicus</i>	-	mittel	45 °C
DSM 4006	<i>A. cycloheptanicus</i>	+/-	mittel	45 °C
DSM 4007	<i>A. cycloheptanicus</i>	-/(+)	mittel	45 °C
DSM 446	<i>A. acidocaldarius</i>	-	gut	65 °C
DSM 13609	<i>A. herbarius</i>	-/(+)	gering	55 °C
DSM 14558	<i>A. acidiphilus</i>	+/-	gering	45 °C
DSM 17974	<i>A. sacchari</i>	-/(+)	gut	45 °C
DSM 17978	<i>A. fastidiosus</i>	+/-	gering	45 °C
Isolate von präsumtiven <i>Alicyclobacillus</i> spp.				
MHI 10001	AINIA, Spanien	+	mittel	45 °C
MHI 10015		+	gering	45 °C
MHI 10016	LADR GmbH	+	gut	45 °C
MHI 10017		++	mittel	45 °C
MHI 10018		+	gut	45 °C
MHI 10019		+	gut	45 °C
MHI 10020		+	mittel	45 °C
MHI 10021		+	gut	45 °C
MHI 10022		+/-	gut	45 °C
MHI 10023		++	gut	45 °C
MHI 10024		+	gut	45 °C
MHI 10025		++	gut	45 °C
MHI 10026		-/+	gering	45 °C
MHI 10027		++	mittel	45 °C
MHI 10028		+	gut	45 °C
MHI 10029		++	gut	45 °C
MHI 10030		+	gut	45 °C
MHI 10031		++	gut	45 °C

^T: Typstamm; [#]: auf BAT Agar; ^{*}: Optimum

Fortsetzung Tab. 4.2

Bezeichnung	Spezies/Herkunft	Sporulation	Wachstum[#]	Temperatur[*]
MHI 10032		+	gut	45 °C
MHI 10033		+	mittel	45 °C
MHI 10002		+	mittel	45 °C
MHI 10034		+	gering	45 °C
MHI 10035		+	mittel	45 °C
MHI 10036		+/-	gut	45 °C
MHI 10037	LADR GmbH	+	gering	45 °C
MHI 10038		++	mittel	45 °C
MHI 10039		+/-	mittel	45 °C
MHI 10040		-/(+)	gering	45 °C
MHI 10057		-/(+)	gut	65 °C
MHI 10058		-/(+)	mittel	65 °C
MHI 10059		-/(+)	gut	65 °C
MHI 10060		-/(+)	gut	65 °C
MHI 10003		+	gut	45 °C
MHI 10041		++	gut	45 °C
MHI 10042	Wild GmbH	++	gut	45 °C
MHI 10043		+	gering	45 °C
MHI 10044		-/(+)	gut	65 °C
MHI 10045		-/(+)	gering	55 °C
MHI 10047			-/(+)	gut
MHI 10048		++	gut	45 °C
MHI 10049		++	gut	45 °C
MHI 10050	Niederrhein Gold	++	gut	45 °C
MHI 10051		++	gut	45 °C
MHI 10052		++	gut	45 °C
MHI 10053		++	gut	45 °C
MHI 10054		-/(+)	gut	65 °C
MHI 10055	Emig GmbH	-/(+)	gut	65 °C
MHI 10056		-/(+)	gut	65 °C
MHI 10061	MHI	++	gut	45 °C

[#]: auf BAT Agar; ^{*}: Optimum

4.1.2 Charakterisierung der *Alicyclobacillus*-Stammbibliothek

Zur weiteren Differenzierung und eingehenden Charakterisierung der *Alicyclobacillus* Stämme bzw. Isolate wurden mikrobiologische, enzymatisch-chemische und molekularbiologische Verfahren eingesetzt.

4.1.2.1 Mikrobiologische Untersuchungen

Die *Alicyclobacillus* Isolate wurden mittels mikrobiologischer Verfahren, die in der IFU-Methode Nr. 12 als Bestätigungstests (2.4.1, Abb. 2.3) vorgesehen sind, untersucht. Dazu wurden die Stämme auf den sauren, festen Nährmedien BAT, YSG und K Agar, sowie zur Kontrolle auf einem pH-neutralen Medium im 3-Ösen-Ausstrich angereichert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 45 °C bzw. zusätzlich auch bei 65 °C (YSG & BAT) in einer feuchten Kammer für mindestens zwei Tage vor einer Beurteilung des Koloniewachstums. Koloniematerial von BAT-Platten wurde zudem mikroskopisch auf Sporenbildung überprüft.

Tabelle 4.3: Beispielhafte Auflistung von mikrobiologischen Untersuchungsergebnissen für einige *Alicyclobacillus* Isolate (MHI) sowie DSM-Referenzstämme relevanter Spezies in Anlehnung an Methode Nr. 12 IFU (2007): Wachstum auf BAT oder YSG Agar bei 45 °C bzw. 65 °C, auf K Agar sowie PC Agar.

Bezeichnung	Spezies	45 °C	65 °C	K	PC
DSM 2498	<i>A. acidoterrestris</i>	++	-	++	-
MHI 10001	<i>A. acidoterrestris</i>	++	-	++	-
MHI 10002	<i>A. acidoterrestris</i>	++	-	++	-
MHI 10003	<i>A. acidoterrestris</i>	++	-	++	-
MHI 10015	<i>A. acidoterrestris</i>	++	-	+	-
MHI 10031	<i>A. acidoterrestris</i>	++	-	(+)	-
MHI 10033	<i>A. acidoterrestris</i>	++	-	+	-
DSM 446	<i>A. acidocaldarius</i>	+	++	(+)	-
MHI 10044	<i>A. acidocaldarius</i>	(+)	+	-	-
MHI 10055	<i>A. acidocaldarius</i>	(+)	++	-	-
MHI 10060	<i>A. acidocaldarius</i>	+	++	(+)	-
DSM 13609	<i>A. herbarius</i>	+	-	-	-
DSM 14558	<i>A. acidiphilus</i>	++	-	-	-
MHI 10043	<i>Alicyclobacillus</i> spp.	++	-	-	-
MHI 10045	<i>Alicyclobacillus</i> spp.	+	+	+	-
MHI 10040	<i>Alicyclobacillus</i> spp.	+	-	(+)	-

Die Beurteilung der mikrobiologischen Untersuchungen erfolgte generell nach folgendem Prinzip: Bei Koloniewachstum auf sauren Nährböden sowie Sporenbildung liegen präsumtiv *Alicyclobacillus* spp. vor. Präsumtiv Fehl aroma-produzierende Alicyclobazillen (v. a. *A. acidoterrestris*, aber auch *A. acidiphilus*, *A. herbarius*, etc.) können bei einer Inkubationstemperatur von 45 °C angereichert werden, wachsen aber nicht bei 65 °C. Dementsprechend geht man bei Isolaten, die bei 65 °C angereichert werden können, von präsumtiv Nicht-Fehl aroma-produzierenden *Alicyclobacillus* spp. (v. a. *A. acidocaldarius*) aus. K Agar soll vor allem das Wachstum von *A. acidoterrestris*, sowie eingeschränkt *A. acidiphilus* und *A. acidocaldarius* unterstützen. Bei Koloniebildung auf PC Agar (neutraler pH) handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um *Alicyclobacillus* spp.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind beispielhaft für einige Isolate in Tab. 4.3 zusammengefasst. Grundsätzlich konnten alle Isolate der Gattung *Alicyclobacillus* zugeordnet werden, denn alle Isolate zeigten Wachstum und Sporenbildung auf sauren Nährböden, konnten aber nicht auf dem pH-neutralen PC-Agar angezüchtet werden. Alle Isolate wiesen bei einer Inkubationstemperatur von 45 °C Koloniebildung auf, die Wachstumsintensität war hierbei allerdings unterschiedlich, neun Isolate zeigten nur schwaches Wachstum. Bei einer Inkubationstemperatur von 65 °C waren neun Isolate in der Lage Kolonien zu bilden, diese wurden daher als präsumtiv Nicht-Fehl aroma produzierende Alicyclobazillen, die übrigen 40 Isolate hingegen als präsumtiv Fehl aroma-produzierende *Alicyclobacillus* bewertet. Auf K Agar konnten 42 Isolate angereichert werden, davon wiesen fünf nur schwaches Wachstum auf. Obwohl K Agar v. a. das Wachstum von *A. acidoterrestris* sowie eingeschränkt von *A. acidiphilus* und *A. acidocaldarius* ermöglichen sollte, konnte in orientierenden Untersuchungen auch Wachstum der Referenzstämmen von *A. cycloheptanicus* und *A. fastidiosus* sowie schwaches Wachstum von *A. sacchari* nachgewiesen werden. Der Referenzstamm von *A. acidiphilus* ließ sich hingegen, anders als in IFU-Methode Nr. 12 beschrieben, nicht auf K Agar anreichern. Die drei – auch mit Real-Time PCR nicht identifizierbaren (4.1.2.2) – in Tab. 4.3 aufgeführten Isolate MHI 10040, MHI 10043 und MHI 10045 wiesen bei den mikrobiologischen Untersuchungen keine eindeutigen Wachstumsmuster auf: so konnte Isolat MHI 10043 beispielsweise ausschließlich bei 45 °C auf BAT Agar, nicht aber auf K Agar Kolonien ausbilden, während Isolat MHI 10040 auf K Agar schwaches Wachstum zeigte, aber ebenfalls nur bei einer Inkubationstemperatur von 45 °C angereichert werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte bei Isolat MHI 10045 sowohl bei 45 °C wie auch 65 °C und auf K Agar eine Koloniebildung beobachtet werden.

4.1.2.2 Real-Time Multiplex PCR

Zur molekularbiologischen Analyse der Isolate wurde eine Real-Time Multiplex PCR (GEN-IAL[®] First-Alicyclobacillus Multiplex PCR Kit) eingesetzt, die die Unterscheidung von *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius* sowie anderen *Alicyclobacillus* spp. ermöglicht. Dazu wurde, ebenso wie für die RAPD-Analysen DNA verwendet, die mit Hilfe des DNeasy[®] Blood & Tissue Kit aus den Stämmen der Stammbibliothek isoliert worden war (Durchführung jeweils entsprechend der Anleitung der Hersteller). Es konnte gezeigt werden, dass alle 49 untersuchten Isolate der Gattung *Alicyclobacillus* angehören, von diesen konnten 38 Isolate (78 %) der Spezies *A. acidoterrestris*, sowie 8 Isolate (16 %) der Spezies *A. acidocaldarius* zugeordnet werden, 3 Isolate (6 %) konnten nicht weiter differenziert werden und gehörten damit weder der Spezies *A. acidoterrestris* noch *A. acidocaldarius* an (Tab. 4.4).

Tabelle 4.4: Mittels Real-Time PCR bestimmte Spezieszugehörigkeit und Charakteristika (RAPD-Profil und Guajacol-Produktion) der *Alicyclobacillus* Isolate.

Spezies	Stämme/ Isolate	Guajacol	RAPD Gruppe	Spezies	Stämme/ Isolate	Guajacol	RAPD Gruppe
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10001	+	I	<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10037	+	III
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10002	+	I	<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10038	+	III
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10003	+	I	<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10039	+	III
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10015	+	III	<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10041	+	I
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10016	+	III	<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10042	+	IV
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10017	+	III	<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10047	+	0
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10018	+	0	<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10048	+	n. a.
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10019	+	III	<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10049	+	n. a.
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10020	+	III	<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10050	+	n. a.
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10021	+	III	<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10051	+	n. a.
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10022	+	II	<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10052	+	n. a.
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10023	+	IV	<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10053	+	n. a.
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10024	+	II	<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10061	+	n. a.
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10025	+	II	<i>A. acidocaldarius</i>	MHI 10044	-	0
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10026	+	III	<i>A. acidocaldarius</i>	MHI 10054	-	n. a.
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10027	+	III	<i>A. acidocaldarius</i>	MHI 10055	-	n. a.
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10028	+	III	<i>A. acidocaldarius</i>	MHI 10056	-	n. a.
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10029	+	IV	<i>A. acidocaldarius</i>	MHI 10057	-	n. a.
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10030	+	II	<i>A. acidocaldarius</i>	MHI 10058	-	n. a.
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10031	+	III	<i>A. acidocaldarius</i>	MHI 10059	-	n. a.
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10032	+	II	<i>A. acidocaldarius</i>	MHI 10060	-	n. a.
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10033	+	III	<i>Alicyclobacillus</i> spp.	MHI 10040	+	0
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10034	+	III	<i>Alicyclobacillus</i> spp.	MHI 10043	-	0
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10035	+	III	<i>Alicyclobacillus</i> spp.	MHI 10045	-	0
<i>A. acidoterrestris</i>	MHI 10036	+	IV				

RAPD: Gruppen I, II, III, IV; 0: keiner Gruppe zuzuordnen; n. a.: nicht analysiert;

Prinzipiell zeigen die Ergebnisse eine hohe Übereinstimmung mit der in 4.1.2.1 beschriebenen klassisch-mikrobiologischen Untersuchung nach IFU Methode Nr. 12. Beispielsweise zeigten alle *A. acidoterrestris* Isolate deutliches Wachstum bei 45 °C, aber keine Koloniebildung bei einer Inkubationstemperatur von 65 °C. Zudem konnten alle *A. acidoterrestris* Isolate auf K Agar angereichert werden. Im Gegensatz dazu ließen sich alle Isolate von *A. acidocaldarius* bei 65 °C anzüchten.

4.1.2.3 Guajacol-Produktion

Wie in 2.3 beschrieben ist der Metabolit Guajacol – neben 2,6-Dibromphenol und 2,6-Dichlorphenol – hauptsächlich für den Verderb von Fruchtsäften und anderen sauren Produkten verantwortlich. Nicht alle Alicyclobazillen bilden Guajacol, *A. acidoterrestris* wird dabei am häufigsten mit Verderb von Lebensmitteln in Zusammenhang gebracht. Als ebenfalls potentiell Fehl aroma-produzierende Spezies werden inzwischen v. a. auch *A. acidiphilus* und *A. herbarius*, sowie mit Abstrichen auch *A. pomorum*, *A. hesperidum*, *A. cycloheptanicus* sowie *A. acidocaldarius* angesehen.

Alle Isolate und Referenzstämme der etablierten Stammsammlung wurden daher mit Hilfe des Peroxidase-Tests (wie in 3.2.4 beschrieben) auf das Potential für den Verderb von Lebensmitteln, d. h. ihre Fähigkeit zur Guajacol-Produktion untersucht.

In Tab. 4.4 bzw. 4.5 sind die Analysen-Resultate für die *A. acidoterrestris* Isolate bzw. DSM-Stämme zusammengefasst. Alle Referenzstämme und Isolate von *A. acidoterrestris* waren in der Lage, Guajacol zu produzieren. Außerdem konnte für den *A. herbarius* Referenzstamm DSM 13609 sowie ein nicht weiter klassifiziertes *Alicyclobacillus* spp. Isolat (MHI 10040) die Fähigkeit zur Bildung von Guajacol nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu wiesen weder die untersuchten Stämme von *A. acidocaldarius* noch andere Vertreter der Gattung *Alicyclobacillus* diese Eigenschaft auf.

Tabelle 4.5: Charakteristika (RAPD-Profil und Guajacol-Produktion) der *Alicyclobacillus* DSM-Referenzstämme.

Spezies	Stämme/ Isolate	Guajacol	RAPD Gruppe
<i>A. acidoterrestris</i>	DSMZ 2498	+	0
<i>A. acidoterrestris</i> ^T	DSMZ 3922	+	I
<i>A. acidoterrestris</i>	DSMZ 3923	+	I
<i>A. acidoterrestris</i>	DSMZ 3924	+	I
<i>A. acidocaldarius</i>	DSMZ 446	-	0
<i>A. cycloheptanicus</i>	DSMZ 4005	-	0
<i>A. cycloheptanicus</i>	DSMZ 4006	-	0
<i>A. cycloheptanicus</i>	DSMZ 4007	-	0
<i>A. herbarius</i>	DSMZ 13609	+	0
<i>A. acidiphilus</i>	DSMZ 14558	-	0
<i>A. sacchari</i>	DSMZ 17974	-	0
<i>A. fastidiosus</i>	DSMZ 17978	-	0

RAPD: Gruppe I ; 0: keiner Gruppe zuzuordnen; ^T: Typstamm

4.1.2.4 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Um die genotypische Diversität der *Alicyclobacillus* Isolate der etablierten Stammbibliothek zu ermitteln, wurden RAPD-Verfahren eingesetzt (3.2.5). Dafür wurden die Primer BA-10 (5'-AAC GCG CAA C-3') sowie F-64 (5'-GCC GCG CCA GTA-3') verwendet, mit denen anhand spezifischer Bandenmuster Lebensmittelisolate der Spezies *A. acidoterrestris* zugeordnet, sowie basierend auf deren genotypischen Verwandtschaft in Gruppen mit ähnlichen Bandenmustern eingeteilt werden können (YAMAZAKI et al., 1997b; GROENEWALD et al., 2009).

In die RAPD-Untersuchungen wurden 35 Lebensmittelisolate sowie alle DSM-Referenzstämme mit einbezogen. Einige Isolate wurden erst nach Abschluss dieser Analysen in die Stammbibliothek aufgenommen und waren daher nicht Gegenstand der RAPD-PCR Untersuchungen. Prinzipiell zeigen die Ergebnisse der RAPD Analysen, dass die untersuchten Isolate von *A. acidoterrestris* eine breite genetische Diversität aufweisen. Unter Einsatz der genannten Primer konnte DNA von allen untersuchten Isolaten sowie Referenzstämmen amplifiziert werden. Die generierten Bandenmuster ermöglichten die Einteilung von 29 Isolaten und drei *A. acidoterrestris* Referenzstämmen in vier RAPD-Gruppen (Tab. 4.4 & Tab. 4.5). Diese Zuordnung basierte hauptsächlich auf den bei Amplifikation mit Primer BA-10 generierten ähnlichen Bandenmustern (Abb. 4.1). Generell resultierten die mit Primer F-64

durchgeführten RAPD-PCRs in einer höheren Anzahl an Banden wie auch in einer höheren Diversität der Bandenmuster als bei Einsatz von Primer BA-10. So konnten zwar ebenfalls gruppenspezifische Hauptbanden detektiert werden, zusätzlich traten aber weitere, teilweise variierende Banden auf, die eine weitere Einteilung der Isolate in Untergruppen ermöglichen würden und damit die weite genetische Bandbreite der in der Stammsammlung vorhandenen Stämme von *A. acidoterrestris* belegen. Insbesondere Variationen der RAPD-Profile von Gruppe I, der auch drei *A. acidoterrestris* Referenzstämme zugeordnet werden konnten, lassen Rückschlüsse auf einen hohen Grad an genetischer Diversität zu, denn alle sieben Stämme und Isolate zeigten bei Verwendung von Primer BA-10 ähnliche Bandenmuster mit prominenten Banden bei ca. 1400, 1000, sowie 600 Basenpaaren (Bp). Bei Amplifikation mit Primer F-64 hingegen konnte zwar ebenfalls eine gemeinsame prominente Bande bei ca. 1500 Bp identifiziert werden, zusätzlich trat aber eine Vielzahl weiterer, deutlich variierender Nebenbanden auf, die meist auch eine schwächere Intensität aufwiesen.

Es zeigte sich, dass alle 29 Isolate, die in eine der vier RAPD-Gruppen eingeteilt werden konnten, der Spezies *A. acidoterrestris* angehörten. Zwei *A. acidoterrestris* Isolate (MHI 10018 bzw. MHI 10047) und ein DSM-Referenzstamm (DSM 2498) konnten jedoch keiner Gruppe zugeordnet werden. DNA der untersuchten Nicht-*A. acidoterrestris* Isolate und Referenzstämme konnte zwar grundsätzlich unter Einsatz der beschriebenen Primer amplifiziert werden, die generierten Bandenmuster ließen aber keine Einteilung in Gruppen zu (Abb. 4.2).

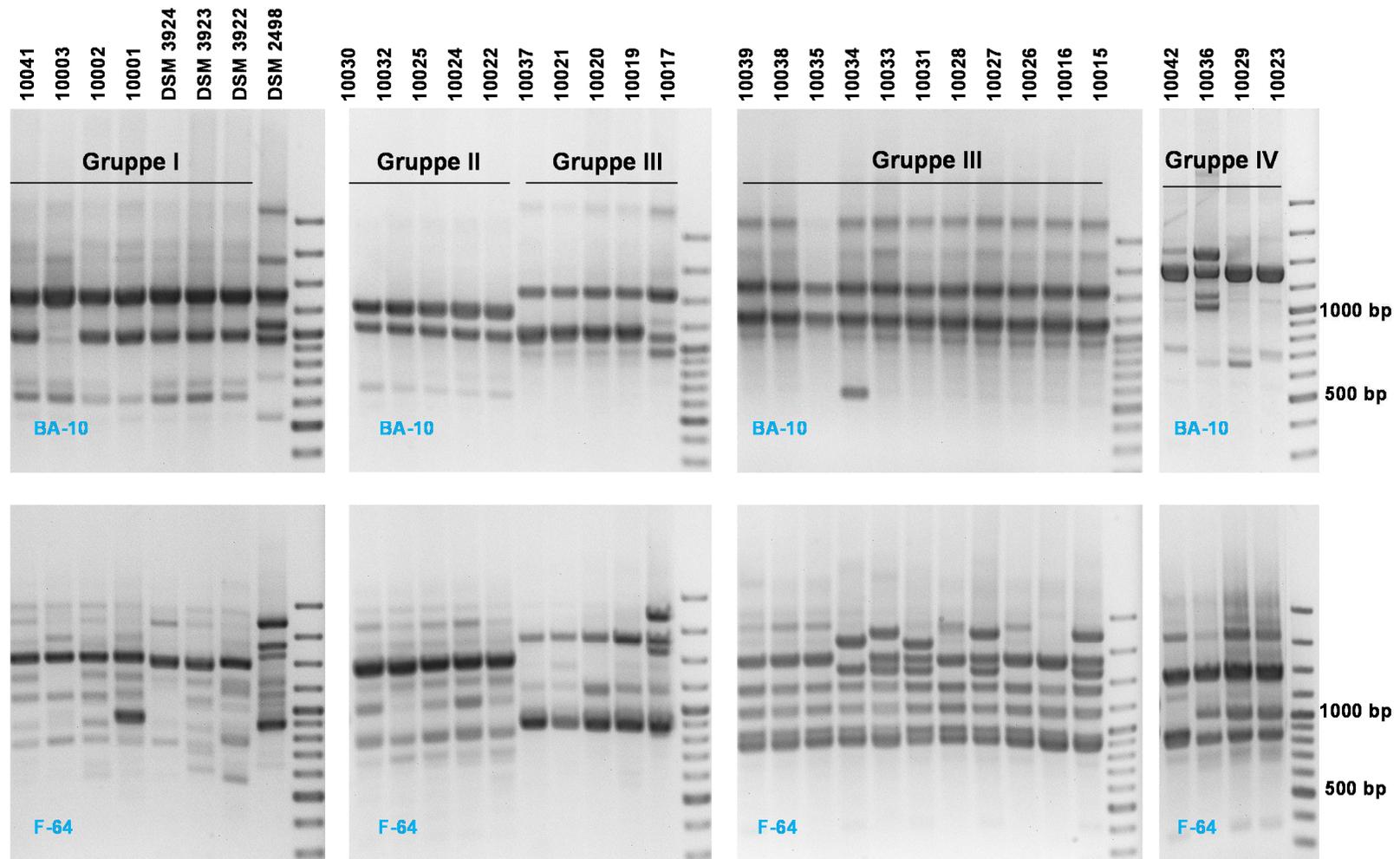


Abbildung 4.1: Genetische Diversität der untersuchten *A. acidoterrestris* Isolate, bzw. der DSM-Referenzstämmen. Zur Durchführung der RAPD-PCRs wurden die Primer BA-10 bzw. F-64 eingesetzt, die Einteilung in vier RAPD-Gruppen erfolgte anhand des generierten Bandenmusters.

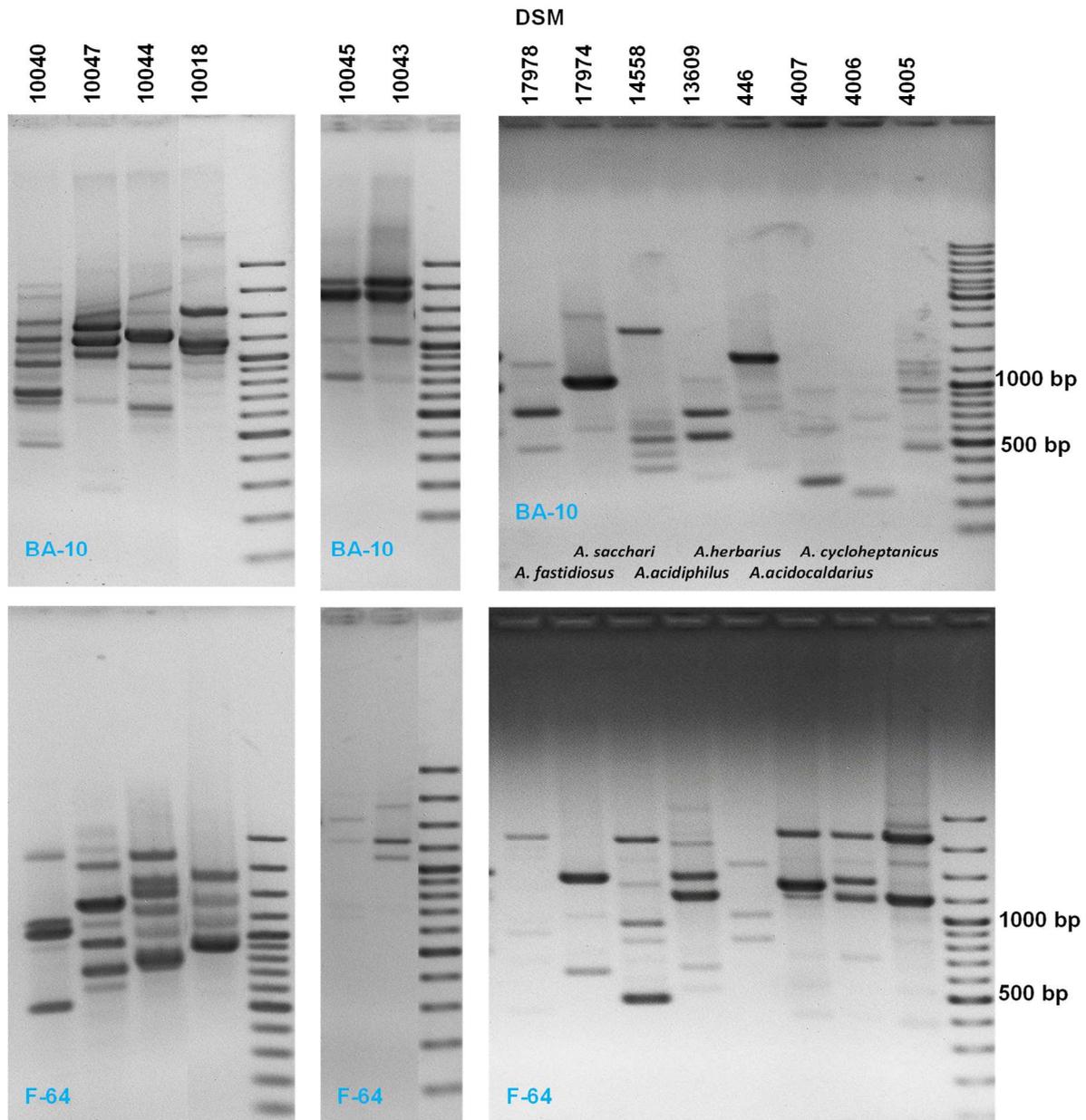


Abbildung 4.2: RAPD-Bandenmuster von Isolaten, die keiner RAPD-Gruppe zugeordnet werden konnten und von DSM-Stämmen, die nicht der Spezies *A. acidoterrestris* angehören.

4.2 Generierung von *Alicyclobacillus* Sporen

Ziel der im Folgenden beschriebenen Versuche war die Etablierung eines effizienten Verfahrens zur Herstellung von hochreinen Sporenpräparationen, die zum Einen als Immunogen zur Generierung poly- und monoklonaler Antikörper und zum Anderen als Antigen für die Charakterisierung immunchemischer Nachweisverfahren (EIA) eingesetzt werden konnten.

4.2.1 Orientierende Versuche

Um ein möglichst effizientes Verfahren zur Sporengewinnung zu etablieren, wurden in Vorversuchen verschiedene Nährmedien und Inkubationsbedingungen zur Anreicherung der vier für die Herstellung des Immunogens ausgewählten Stämme (DSM 2498, MHI 10001, MHI 10002 und MHI 10003) getestet. Im Einzelnen wurden überprüft: (1) Voranreicherung in YSG-Bouillon mit anschließender Anreicherung auf YSG-Agar bzw. BAT-Agar, (2) Sac-Culture mit YSG- bzw. BAT-Bouillon, sowie (3) Anreicherung der Keime auf *B. cereus* Mangan-Versporungsagar.

Die Versuche zeigten, dass bei Anzucht in Bouillon bzw. auf YSG-Agarplatten kaum eine Versporung der Keime induziert werden konnte. Bei Anzucht der Alicyclobazillen auf Mangan-Versporungsagar stellte sich hingegen heraus, dass zwei der untersuchten Stämme (MHI 10002 und MHI 10003) gut versporten, während die beiden anderen Stämme DSM 2498 und MHI 10001 nur eine geringe Sporendichte aufwiesen. Grundsätzlich war allerdings das Wachstum aller vier Stämme auf diesen Platten nur gering. Auf BAT-Agarplatten dagegen war die Anreicherung gut möglich, jedoch zeigte sich im Hinblick auf die Versporung der Stämme ein umgekehrtes Muster: DSM 2498 und MHI 10001 versporten sehr gut, MHI 10002 und MHI 10003 dagegen nicht vollständig (Tab. 4.6).

Tabelle 4.6: Verhalten der zur Immunogen-Herstellung verwendeten *A. acidoterrestris* Stämme auf Mangan-Versporungsagar bzw. BAT-Agar.

Stamm	Versporung auf Mangan-Versporungsagar	Versporung auf BAT-Agar
DSM 2498	-	++
MHI 10001	+/-	++
MHI 10002	++	+
MHI 10003	+	+

Um den Anteil der vegetativen Zellen in den Sporenpräparationen der Stämme MHI 10002 und MHI 10003, die bei Anzucht auf BAT-Agarplatten nicht vollständig versporten, zu reduzieren und somit möglichst hochaufgereinigtes Material zu erhalten, wurden verschiedene Aufreinigungsmethoden überprüft. In den ersten Versuchsreihen wurde u. a. die Hitzeinaktivierung der Ansätze im Wasserbad für 10 min bei 80 °C überprüft. Im Anschluss wurde mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung anhand einer Lebend-Tot-Färbung der Sporenpräparationen mit Syto 9 Green und Propidiumiodid (PI) untersucht, ob vegetative Keime bei dieser Temperatur/Zeit-Kombination tatsächlich abgetötet werden. Dazu wurden

die zu untersuchenden Proben abzentrifugiert (4.600 x g, 10 min, RT) und in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Zur Färbung wurden dann 100 µl des jeweiligen Ansatzes mit 4 µl PI (0,5 µg/ml) und 1 µl einer 0,5 mM Syto 9 Green Lösung (in DMSO) versetzt. Syto 9 Green färbt vitale Zellen grün an, PI kann erst nach Permeabilisierung der Zellmembran in Zellen gelangen und färbt daher nur abgestorbene Zellen rot an. Bei Belichtungszeiten von 1/10 s – 1/50 s (bei Syto 9 Green & PI) konnte das Absterben der Keime durch die Hitzebehandlung gut nachvollzogen werden (Abb. 4.3). Bei der Durchführung einer Hitzeinaktivierung der vegetativen Zellen besteht allerdings auch die Gefahr einer Hitzeaktivierung von Sporen, die durch Erhitzung nicht abgetötet werden und zum Auskeimen angeregt werden können.

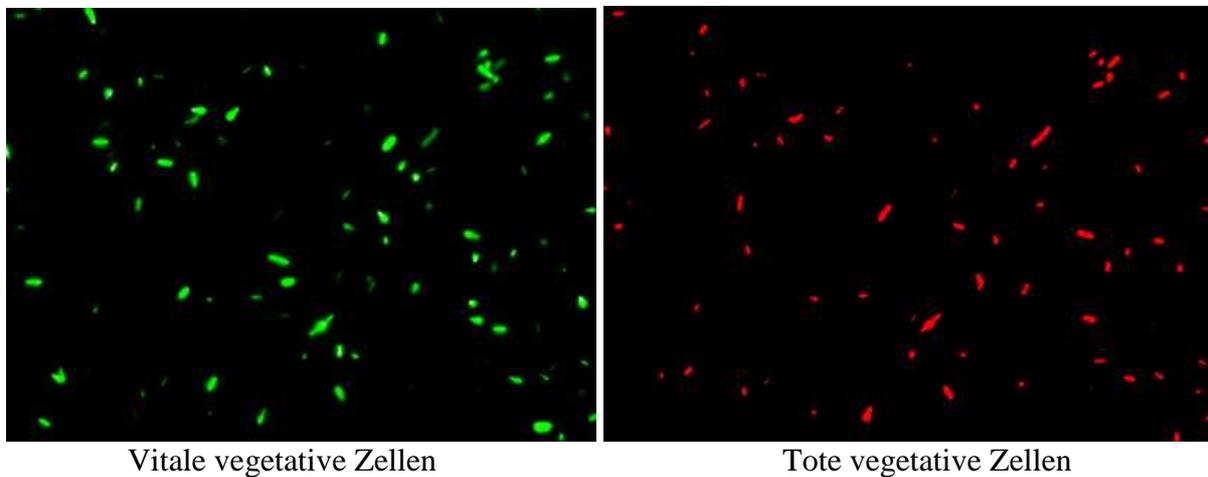


Abbildung 4.3: Lebend-Tot-Färbung von vegetativen Zellen von *Alicyclobacillus* mit Syto 9 Green (links) und nach Hitzebehandlung mit PI (rechts).

Daneben wurde im Hinblick auf eine Aufreinigung der von BAT-Nährböden gewonnenen Sporenpräparationen die Einsetzbarkeit eines Lysozym-Verdau untersucht. Lysozym ist ein Enzym, welches vegetative Bakterien verdaut, indem es die β -1,4-glykosidischen Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure- und N-Acetylglucosaminresten spaltet und somit das Peptidoglycangerüst der bakteriellen Zellwand lysiert. Sporen sind aufgrund ihrer aus Protein bestehenden Sporenhülle weitgehend resistent. Orientierende Versuche wurden mit den Stämmen MHI 10002 und MHI 10003 durchgeführt.

Jeweils zwei Ansätze der beiden Stämme (MHI 10002: 2×10^7 Kbe/ Ansatz, MHI 10003: 3×10^7 Kbe/Ansatz) wurden abzentrifugiert (4.600 x g, 15 min, 4 °C), in 1 ml 30 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7) resuspendiert und anschließend mit 0,5 mg/ml bzw. 0,05 mg

Lysozym/ml versetzt. Nach Inkubation der Ansätze auf dem Magnetrührer bei 37 °C für 1 h wurde von beiden Proben ein Aliquot zur Untersuchung entnommen, der restliche Ansatz wurde noch für weitere 2 h unter Rühren inkubiert. Alle Ansätze wurden lichtmikroskopisch untersucht – wobei kein deutlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Ansätzen erkennbar war – und daneben wurde die Gesamtkeimzahl bestimmt. Dazu wurden Verdünnungen der Proben in Ringerlösung angelegt und auf BAT-Agarplatten ausplattiert. Nach zweitägiger Inkubation bei 45 °C wurden die Keimzahlen ausgewertet. Es zeigte sich, dass die Lysozymbehandlung zu einer deutlichen konzentrations- und zeitabhängigen Reduktion des Keimgehaltes führte. Dieser Effekt war bei beiden Stämmen zu beobachten (Abb. 4.4). Schon bei einem Zusatz von 0,05 mg/ml Lysozym war die relative Keimdichte im Vergleich zur ursprünglichen Präparation z. T. um mehr als 50 % reduziert. Bei Steigerung der Lysozymkonzentration auf 0,5 mg/ml nahmen die Keimzahlen um bis zu zwei Zehnerpotenzen ab. Diese Ergebnisse zeigen, dass neben vegetativen Zellen offensichtlich auch Sporen durch die Lysozymbehandlung angegriffen wurden.

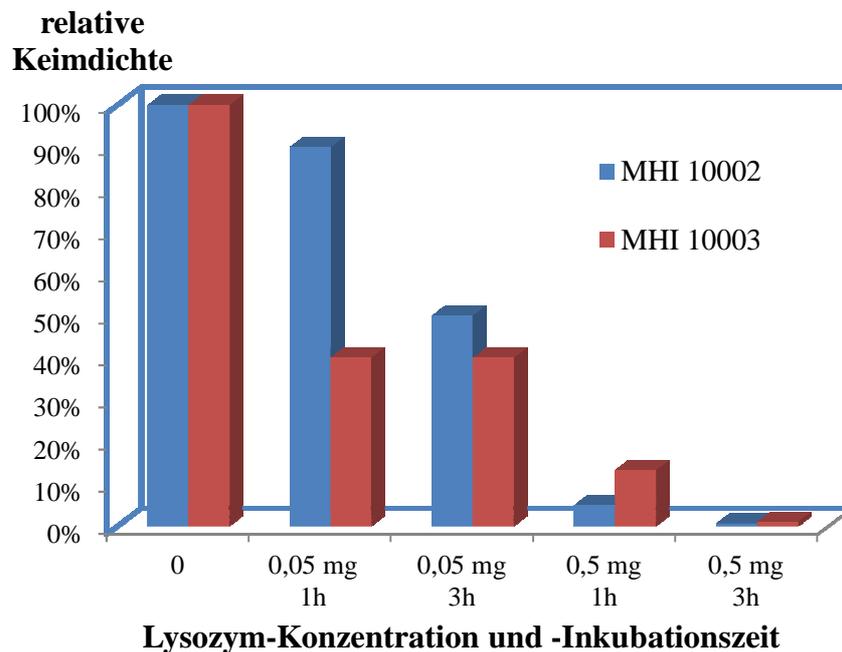


Abbildung 4.4: Einfluss der Lysozymkonzentration sowie -inkubationszeit auf die relative Keimdichte von Isolat MHI 10002 bzw. MHI 10003.

4.2.2 Optimiertes Verfahren

Schlussendlich wurde das im Folgenden beschriebene Verfahren zur Anzucht und Aufreinigung von *Alicyclobacillus* Sporen verwendet. Zunächst erfolgte eine Voranreicherung der Bakterien in BAT-Bouillon (pH 4). Dazu wurden 5 ml Bouillon mit einer Öse Koloniematerial von auf modifizierten BAT-Agarplatten angereicherten Stämmen beimpft und dann bei 45 °C für 2 Tage im Brutschrank in einer feuchten Kammer inkubiert. Die generierte Bakteriensuspension wurde danach 1:10 in Ringerlösung verdünnt und je Stamm 1,25 ml auf jeweils acht mit modifiziertem BAT-Agar (pH 4) beschickte Platten verbracht. Diese wurden bei 45 °C für 5 d in einer feuchten Kammer inkubiert, die produzierten Sporen dann im Anschluss mit ca. 3 ml A. dest. je Platte abgeschwemmt. Die resultierende Sporensuspension wurde 3 x mit A. dest. gewaschen (4.600 x g, 15 min, 4 °C) und im Hinblick auf eine vollständige Lyse der vegetativen Zellen anschließend für mindestens 5 Tage bei 4 °C aufbewahrt. Danach wurden die Sporenpräparationen für 7 min im Wasserbad mit Ultraschall behandelt, bevor sie erneut 5 x mit A. dest. gewaschen wurden.

Nach Bestimmung der Keimzahl und lichtmikroskopischer Kontrolle wurden die Anzuchten zur Gewinnung hochreiner Präparationen für die Generierung des Immunogens mittels Nycodenz-basierter Dichtegradientenzentrifugation nach VYAS et al. (2011) weiter aufgereinigt. Nycodenz ist ein Medium, das bei Zentrifugation einen Dichtegradienten ausbildet, dabei werden auch die Bestandteile einer Probe aufgrund der unterschiedlichen Dichte der Partikel aufgetrennt. Dazu wurde 1 ml Sporensuspension vorsichtig auf 8,5 ml einer 50 % igen Nycodenzlösung (in A. dest.) in 16 ml Zentrifugationsröhrchen geschichtet und zentrifugiert (19.650 x g, 20 min, 20 °C). Die Dichtegradientenzentrifugation resultierte in einer deutlichen Auftrennung der jeweiligen Präparationen in eine trübe Bande im oberen Bereich des Mediums und ein deutlich sichtbares Pellet (Abb. 4.5). Aufgrund der hohen Dichte der Sporen befinden sich diese hauptsächlich im Pellet, die trübe Phase enthält dagegen leichtere Partikel wie vegetative Zellen und Zelldebris. Zur Gewinnung der Sporen wurde der Überstand vollständig abgesaugt und das Pellet zum Entfernen von Nycodenzrückständen erneut 5 x mit A. dest. gewaschen (4.600 x g, 15 min, 4 °C).

Abschließend wurden die Präparate lichtmikroskopisch überprüft und eine Keimzahlbestimmung durchgeführt. Zwar resultierte dieses Vorgehen je nach Stamm teilweise in einer deutlichen Reduktion der Sporengehalte, die Qualität der Sporensuspensionen konnte jedoch im Hinblick auf deren Reinheit deutlich verbessert werden (Abb. 4.6).

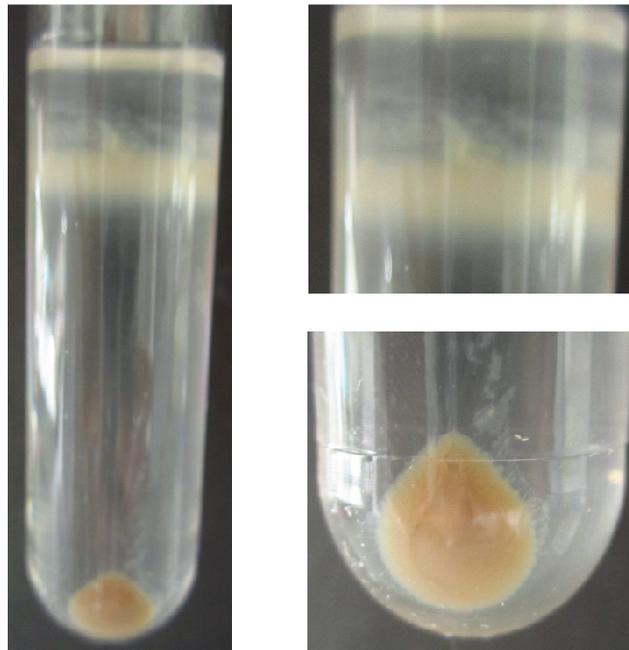


Abbildung 4.5: Dichtegradientenzentrifugation mit Nycodenz: Reinigung von Sporenpräparationen von *A. acidoterrestris*.

Zusammenfassend konnten durch die Kombination einer flüssigen Voranreicherung mit Anreicherung auf BAT-Agarplatten Präparationen mit hoher Sporendichte gewonnen werden. Durch die Dichtegradientenzentrifugation konnte zudem der Anteil an unerwünschten Bestandteilen des ursprünglichen Materials – wie vegetative Keime und Zelltrümmer – deutlich reduziert und somit hochreines Sporenmateriale zur Herstellung des Immunogens produziert werden.

Insgesamt wurden mehr als 20 Sporenanzuchten der vier als Immunogen eingesetzten Stämme (DSM 2498, MHI 10001, MHI 10002 und MHI 10003) hergestellt. Daneben wurden ebenfalls Sporenpräparationen der nicht als Immunogen eingesetzten Stämme der Stammsammlung generiert, dabei wurde jedoch auf den aufwändigen Einsatz der Dichtegradientenzentrifugation verzichtet.

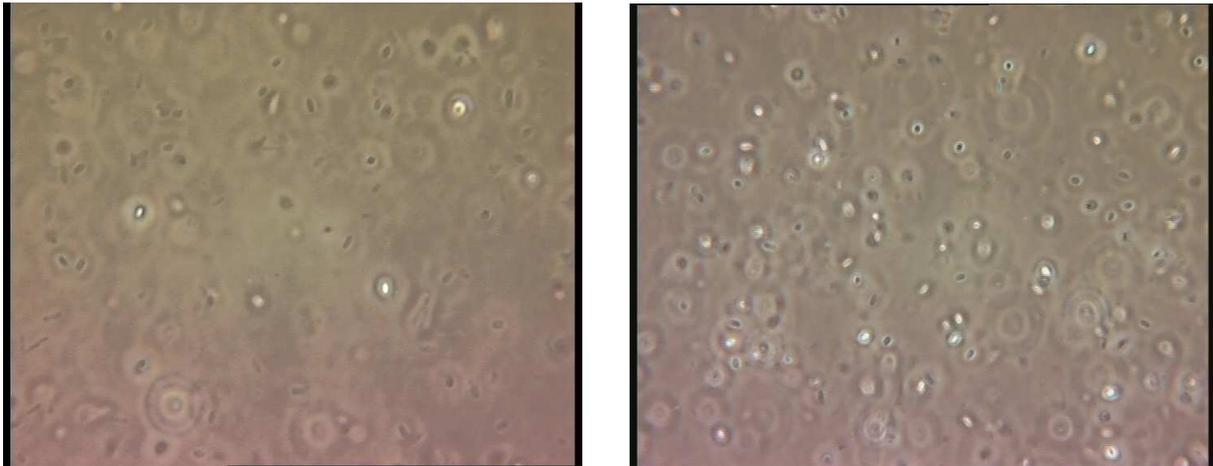


Abbildung 4.6: Sporenpräparationen des auf BAT-Agar nur teilweise versporenden *A. acidoterrestris*-Isolates MHI 10002: vor Dichtegradientenzentrifugation mit relativ vielen vegetativen Keimen (links), nach Dichtegradientenzentrifugation hauptsächlich Sporen (rechts).

4.3 Generierung von polyklonalen Antikörpern

Zur Generierung von poly- sowie monoklonalen Antikörpern wurden die in 4.2.2 beschriebenen hochreinen Sporenpräparate mittels Paraformaldehyd inaktiviert und zur Immunisierung von Mäusen und Kaninchen eingesetzt.

4.3.1 Herstellung des Immunogens

Zur Herstellung des Immunogens wurden im Hinblick auf deren unterschiedliche Provenienz die *A. acidoterrestris* Stämme DSM 2498, MHI 10001, MHI 10002 und MHI 10003 ausgewählt. Um eine Infektion der zu immunisierenden Tiere zu vermeiden, wurden die als Immunogen eingesetzten Sporensuspensionen mit dem Vernetzungsreagenz Paraformaldehyd (PFA) inkubiert, wodurch eine Auskeimung im Organismus verhindert wird. Da dadurch allerdings auch immunogene Oberflächenantigene verändert werden können, sollte die Konzentration des Vernetzungsmittel so gering wie möglich gehalten werden, um diesen Effekt zu minimieren.

Im Rahmen von Vorversuchen wurde die für eine vollständige Inaktivierung der Sporen notwendige PFA-Minimalkonzentration ermittelt. Hierfür wurden die Sporensuspensionen abzentrifugiert (4.600 x g, 15 min, 4 °C) und die Pellets in unterschiedlich hoch konzentrierter PFA-Lösung (in A. dest.) aufgenommen. Die Konzentrationsbereiche lagen dabei zwischen

0,5 % bis 2 % (g/v). Je nach Ausgangssporengelalt wurden die Ansätze dabei in 2 ml (bei $< 10^9$ Sporen/ml) oder 4 ml (bei $> 10^9$ Sporen/ml) der PFA-Lösung resuspendiert. Nach 24 h Inkubation mit leichtem Schwenken im Intellimixer (Schwenkradius 90, Geschwindigkeit 12) wurden die Präparate zum Entfernen des PFA mit sterilem A. dest. gewaschen und die Pellets in 1 ml A. dest. aufgenommen. Zur Bestätigung des Inaktivierungserfolgs wurden 100 μ l der 1:10 in Ringerlösung verdünnten Ansätze auf modifizierten BAT-Agarplatten ausplattiert, zwei Tage bei 45 °C in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend auf Wachstum kontrolliert.

Die in einem ersten Versuch überprüfte PFA-Behandlung der Sporen bei einer Temperatur von 4 °C resultierte nur in einer unzureichenden Inaktivierung des Keimmaterials (Tab. 4.7). Die weiteren Inaktivierungsversuche wurden daher bei Raumtemperatur durchgeführt.

Tabelle 4.7: Inaktivierungseffekt verschiedener Temperatur/Dosis Kombinationen von Paraformaldehyd (PFA) auf *A. acidoterrestris* Sporen.

Stamm	Inaktivierungs- temperatur	KbE/ml vor Inaktivierung	Konzentration des PFA (g/v)	PFA-Volumen	KbE/ml nach Inaktivierung
DSM 2498	4 °C	$3,6 \times 10^8$	2 %	2 ml	$> 10^6$
MHI 10001		3×10^8	1 %	2 ml	$> 10^6$
MHI 10003		9×10^7	0,5 %	2 ml	$> 10^6$
DSM 2498	20 °C	$3,6 \times 10^8$	2 %	2 ml	< 10
MHI 10001		3×10^8	1 %	2 ml	$1,1 \times 10^2$
MHI 10003		9×10^7	0,5 %	2 ml	$> 10^6$
DSM 2498		$1,44 \times 10^9$	1,5 %	4 ml (2x 2 ml)	5×10^2
MHI 10001		$1,2 \times 10^9$	1,5 %	4 ml (2x 2 ml)	1×10^2
DSM 2498		$1,2 \times 10^9$		4 ml (2 x 2 ml)	< 10
MHI 10001	20 °C	$2,76 \times 10^8$	2 %	2 ml	< 10
MHI 10003		$1,14 \times 10^9$		4 ml (2 x 2 ml)	< 10
MHI 10002		$2,16 \times 10^8$		2 ml	< 10
DSM 2498		3×10^9		4 ml (2 x 2 ml)	< 10
MHI 10001		3×10^8		2 ml	< 10
MHI 10003		$1,98 \times 10^9$		4 ml (2 x 2 ml)	< 10
MHI 10002		$8,4 \times 10^8$		2 ml	< 10

Da auch keine der niedrigeren getesteten PFA-Konzentrationen (0,5 %, 1 %, 1,5 %) zu einer vollständigen Inaktivierung der Sporenpräparationen führte (Tab. 4.7), musste zur Herstellung eines sterilen Immunogen-Präparates 2 % ige PFA-Lösung (g/v) verwendet werden. Für die Immunisierung der Mäuse und Kaninchen wurden die so inaktivierten Präparationen aus zwei verschiedenen Anzuchten gepoolt (Tab. 4.8), lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Die Anzahl der eingesetzten Sporen lag zwischen $5,3 \times 10^8$ – 2×10^9 Sporen/ml.

Tabelle 4.8: Für die Herstellung des Immunogens eingesetzte Sporenpräparationen.

Stamm	Herkunft	Inaktivierung	Sporenzahl vor Inaktivierung (\emptyset)	Sporenzahl nach Inaktivierung
DSM 2498	DSM		$2,0 \times 10^9$	< 10
MHI 10001	AINIA, Spanien	2 % PFA	$2,9 \times 10^8$	< 10
MHI 10002	LADR GmbH		$5,3 \times 10^8$	< 10
MHI 10003	Wild GmbH		$1,5 \times 10^9$	< 10

4.3.2 Immunisierung von Mäusen

Zur Generierung von monoklonalen Antikörpern (mAK) wurden vier Mäuse unter Verwendung des in 4.3.1 beschriebenen Immunogens immunisiert (Tab. 4.9). Die Mäuse wurden jeweils mit 4×10^7 Sporen/ml (Grundimmunisierung und 1. Restimulierung) bzw. 5×10^7 Sporen/ml (2. und 3. Restimulierung) immunisiert. Im Immunogen waren die vier eingesetzten Stämme in gleichen Anteilen enthalten [$4 \times (0,5 \times 10^8$ Sporen/ml)].

Tabelle 4.9: Immunisierung von Mäusen mit inaktivierten *A. acidoterrestris* Sporen.

Woche	Maßnahme	Adjuvans/Puffer	Applikation
Woche 0	Grundimmunisierung	Sigma/NaCl ¹	i. p.
Woche 4	1. Restimulierung	-/PBS	s. c.
Woche 9	1. Blutentnahme		
Woche 18	2. Restimulierung	Sigma/NaCl	i. p.
Woche 25	3. Restimulierung	Sigma/NaCl	i. p.
Woche 31	2. Blutentnahme		
Woche 32 / 33	4. Restimulierung & Fusion	-/NaCl	i. p., s. c.

¹: Isotonische Kochsalzlösung

Nach der Grundimmunisierung wurde dreimal restimuliert. Die erste Restimulierung in Woche 4 nach Immunisierungsbeginn wurde subkutan mit in PBS gelöstem Immunogen durchgeführt, vier Wochen später wurde den Tieren dann zur Kontrolle des Immunisierungserfolgs erstmals Blut abgenommen. Die zweite und dritte Restimulierung erfolgte dagegen jeweils intraperitoneal, wie bereits bei der Grundimmunisierung wurden dazu die Sporenpräparate in Sigma-Adjuvans emulgiert. Dabei handelt es sich um eine Öl-in-Wasser-Emulsion, die eine schonendere Alternative zum häufig verwendeten Freundschens Adjuvans (Wasser-in-Öl-Emulsion) darstellt. Nach der dritten Restimulierung wurde erneut Blut entnommen. Den für Zellfusionen ausgewählten Mäusen wurde drei Tage vor der geplanten Fusion nochmals Immunogen, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, appliziert. Zur optimalen Stimulierung der Lymphozyten in Lymphknoten und Milz erfolgte die Applikation hierbei sowohl subkutan als auch intraperitoneal.

4.3.3 Immunisierung von Kaninchen

Zur Generierung polyklonaler Kaninchenantisera wurde ein externes Labor (Charles River Laboratories) beauftragt, zwei Kaninchen mit Sporen von *A. acidoterrestris* zu immunisieren. Tab. 4.10 gibt einen Überblick zum angewandten Immunisierungsregime. Nach der Grundimmunisierung wurden drei Restimulierungen in Woche vier, sechs und neun nach Beginn der Immunisierung vorgenommen. Zur Kontrolle des Immunisierungsverlaufs wurde nach jeder Restimulierung Blut zur Untersuchung entnommen, bzw. nach der dritten Restimulierung das Endserum gewonnen. Für die Immunisierung wurde das unter 4.3.1 beschriebene Immunogen eingesetzt, die Sporenzahlen lagen dabei bei $4,5 \times 10^8$ Sporen/Tier. In dem für die Kaninchen hergestellten Immunogen waren die vier *A. acidoterrestris* Stämme DSM 2498, MHI 10001, MHI 10002 und MHI 10003 in ungleichen Anteilen enthalten, so betragen die Sporenzahlen von DSM 2498 und MHI 10003 im Immunogen $1,5 \times 10^8$, von Stamm MHI 10002 $1,0 \times 10^8$ sowie von MHI 10001 $0,5 \times 10^8$. Die Immunisierungen erfolgten subkutan, appliziert wurden Emulsionen bestehend aus in PBS gelösten Sporen und Freundschem Adjuvans.

Tabelle 4.10: Immunisierung von Kaninchen mit inaktivierten *A. acidoterrestris* Sporen.

Woche	Maßnahme	Adjuvans	Applikation
Woche 0	Grundimmunisierung	Freund-Adjuvans	s. c.
Woche 4	1. Restimulierung	Freund-Adjuvans	s. c.
Woche 5	1. Blutentnahme		
Woche 6	2. Restimulierung	Freund-Adjuvans	s. c.
Woche 7	2. Blutentnahme		
Woche 9	3. Restimulierung	Freund-Adjuvans	s. c.
Woche 11	Gewinnung des Endserums		

4.4 Charakterisierung der polyklonalen Antiseren

Um den Erfolg der Immunisierung zu überprüfen, wurden v. a. indirekte Enzymimmuntests (EIAs) zur Ermittlung der Antikörper-Titer und der apparenten Affinitäten der polyklonalen Antiseren eingesetzt. Basierend auf den dabei erzielten Ergebnissen wurden zum einen Mäuse für die Durchführung von Zellfusionen (Generierung von mAK), bzw. Kaninchenserum für die Herstellung Peroxidase-markierter Antikörper ausgewählt. Zudem wurde mittels Immunfluoreszenz die Reaktivität der Mäuse- und Kaninchenantiseren mit *A. acidoterrestris* Sporen verifiziert, mit Immunoblots wurde die Antigen-Spezifität der Antiseren ermittelt.

4.4.1 Bestimmung der Antikörper-Titer

Mäuseseren

Die zur Überprüfung des Immunisierungsverlaufs von den Versuchstieren entnommenen Blutproben wurden, wie unter 3.2.1.1 beschrieben, mit Hilfe von indirekten EIAs untersucht. Zur Quantifizierung des Gehalts an spezifischen Antikörpern wurden die Titer ermittelt, dazu wurden Verdünnungsreihen der Seren auf den mit konstanten Antigen-Konzentrationen beschichteten Mikrotiterplatten angelegt. Als Titer wurde diejenige Verdünnungsstufe eines Antiserums definiert, die im EIA eine Extinktion von 1,0 erzielte.

Bereits das nach der ersten Restimulierung zur Überprüfung des Immunisierungsverlaufs entnommene Serum wies hohe Titer auf. Die Antikörper-Titer aller vier immunisierten Mäuse waren höher als das zur Kontrolle herangezogene Antiserum eines nicht mit *A. acidoterrestris* Sporen immunisierten Tieres. Nach der dritten Restimulierung konnte eine weitere deutliche

Steigerung der Antikörpertiter bei allen Mäusen festgestellt werden (Abb. 4.7). Dies unterstreicht die Effizienz des verwendeten Adjuvans, sowie die hohe Immunogenität der hergestellten Sporenpräparation.

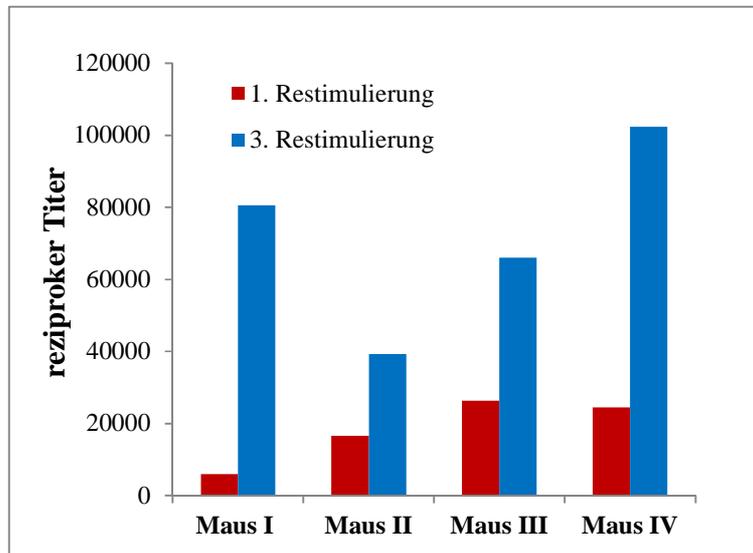


Abbildung 4.7: Entwicklung der in den Mäuseseren nachweisbaren Antikörpertiter im Immunisierungsverlauf. Dargestellt sind die Titer der nach der 1. und 3. Restimulierung entnommenen Seren.

Als Antigen-Beschichtung der Mikrotiterplatten wurden bei der Bestimmung der Antikörpertiter vor allem die 5 x gewaschenen Sporensuspensionen verwendet (4.2.2). Zur Absicherung der dabei erhaltenen Ergebnisse wurden daneben noch weitere, in Tab. 4.11 aufgeführte Sporenpräparationen als Antigen-Beschichtung überprüft. Neben 5 x gewaschenem Material wurden zum einen mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnene hochaufgereinigte Sporen eingesetzt, zum anderen auch PFA-inaktivierte Sporen, wie sie für die Immunisierung der Mäuse verwendet worden waren.

Tabelle 4.11: Als Beschichtungsantigen in den indirekten EIAs verwendete Sporenpräparationen.

Bestimmung des/r	Beschichtungsantigen	Konzentration
Antikörper-Titer	5 x gewaschene Sporen	10^5 Sporen/ml
	Hochaufgereinigte Sporen (Nycodenz)	10^4 Sporen /ml
	PFA-inaktivierte Sporen	10^5 Sporen /ml
Affinität	5 x gewaschene Sporen	10^5 Sporen /ml

Unter Berücksichtigung der eingesetzten Sporenzahlen (Tab. 4.11) konnte, wie in Abb. 4.8 dargestellt, gezeigt werden, dass die so ermittelten Titer sich nicht deutlich unterschieden. Das lässt darauf schließen, dass in den polyklonalen Mäuseseren v. a. Antikörper gegen Sporen von *A. acidoterrestris* vorhanden sind und kaum Antikörper gegen in den nicht hochaufgereinigten Präparationen vorhandene vegetative Zellen oder Zelldebris. Der Umstand, dass bei Verwendung der mittels PFA inaktivierten Sporen keine deutlich höheren Titer bestimmt wurden (Ergebnisse nicht dargestellt), deutet zudem darauf hin, dass in den Seren der Anteil an Antikörpern gegen die durch die Vernetzung entstandenen „künstlichen“ Antigene relativ niedrig war. Zusammenfassend zeigten somit die ersten orientierenden EIA-Untersuchungen, dass mit dem hergestellten Immunogen eine vielversprechende Antikörperantwort induziert werden konnte. Für die praktische Umsetzung bedeuten die Ergebnisse zudem, dass der zeit- und kostenintensive Einsatz von hochaufgereinigten Präparationen als Antigen im indirekten EIA nicht nötig ist.

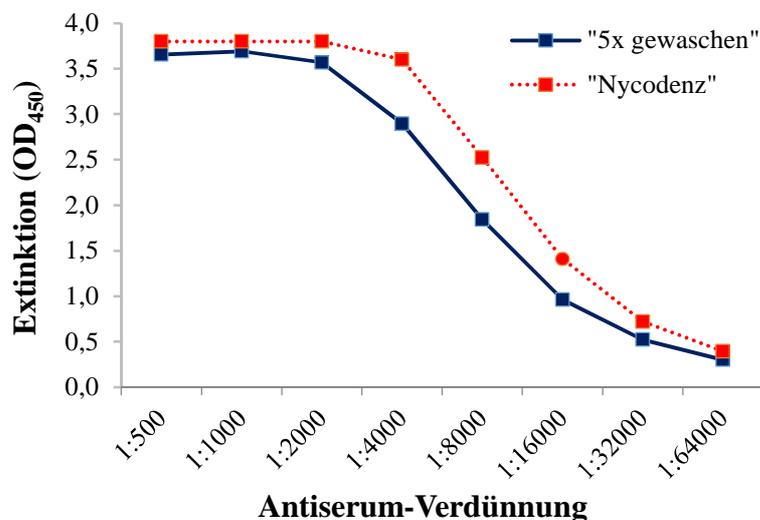


Abbildung 4.8: Nachweisbare Antikörper-Titer eines polyklonalen Mäuseserums (Maus IV, entnommen nach 1. Restimulierung) bei Beschichtung der Mikrotiterplatten mit unterschiedlichen Sporenpräparationen.

Kaninchenserum

Die Seren der immunisierten Kaninchen wurden ebenfalls wie die Mäuseseren mit den unter 3.2.1.1 beschriebenen Methoden zur Überprüfung des Immunisierungsverlaufs untersucht. Nach allen drei Restimulierungen wurde Serum zur Kontrolle entnommen, dabei konnte ebenfalls insgesamt ein deutlicher Anstieg der Antikörper-Titer bei beiden Tieren festgestellt werden (Abb. 4.9). Allerdings nahm der Titer bei Kaninchen I nach der dritten Restimulierung nicht weiter zu, sondern fiel im Gegenteil sogar wieder leicht ab. Es ist möglich, dass die dritte Restimulierung zu früh nach der zweiten Restimulierung erfolgte und somit kein ausreichender Boostereffekt vorhanden war. Bei Kaninchen II hingegen war dieses Phänomen nicht zu beobachten, der Titer stieg bei diesem Tier weiter an. Die Titer beider Tiere lagen dabei nach der letzten Restimulierung bei Gewinnung des Endserums auf dem Antikörper-Titer-Niveau der Mäuseseren.

Als Beschichtung wurden ähnlich wie bei Überprüfung der Mäuseseren vor allem 5 x gewaschene Sporensuspensionen verwendet. Alternativ dazu erfolgte ebenfalls eine Überprüfung der Titer auf mit hochreinen Sporenpräparaten beschichteten Mikrotiterplatten (Ergebnisse nicht dargestellt). Es konnten dabei wiederum keine nennenswerten Unterschiede festgestellt werden.

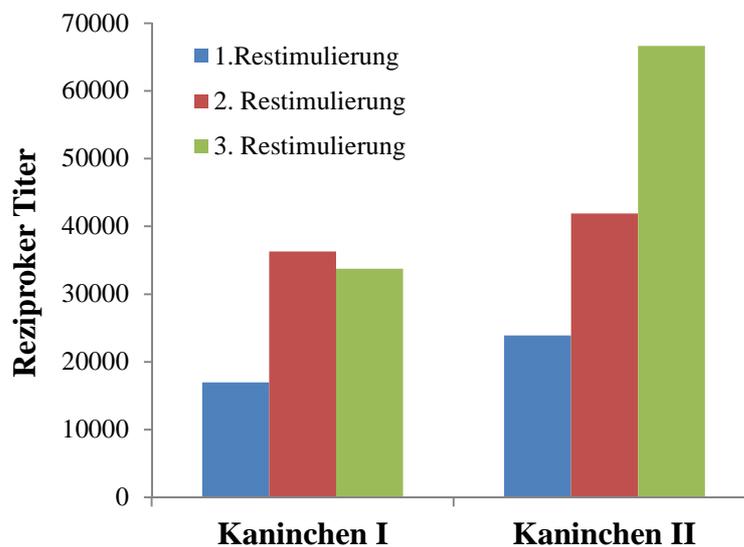


Abbildung 4.9: Nachweisbare Antikörper-Titer in den nach den jeweiligen Restimulierungs-Injektionen gewonnenen Kaninchen-Antiseren.

4.4.2 Apparente Avidität

Mäuseseren

Die Mäuseseren wurden zur Bestimmung der apparenten Avidität ebenfalls mit indirekten EIAs (3.2.1.1) untersucht. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit Verdünnungsreihen des Antigens beschichtet, die zu charakterisierenden Antisera wurden dagegen im Überschuss bei einer konstanten Verdünnung von 1:1000 appliziert. Die Affinität eines spezifischen Serums ist umso besser, je höher die Verdünnungsstufe des Antigens ist, bei der noch eine Extinktion von 1,0 erzielt werden kann. In dieser Weise wurden die Affinitäten der Mäuseseren für die vier als Immunogen verwendeten Stämme (Abb. 4.10), aber auch für verschiedene weitere Stämme der Stammsammlung ermittelt (Tab. 4.12).

Nur zum Teil korrelierte die apparente Avidität der Mäuseseren nach der dritten Restimulierung mit der Höhe der Antikörper-Titer. So zeigte z.B. Maus IV sowohl hohe Antikörper-Titer als auch eine hohe apparente Avidität für die Stämme des Immunogens, Maus III dagegen wies trotz hoher Titer nur eine niedrige apparente Avidität auf (Abb. 4.10). Daneben wurden auch erste orientierende Untersuchungen zur Spezifität der gewonnenen Antisera durchgeführt. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit Sporenpräparationen anderer *Alicyclobacillus* spp. beschichtet und die Reaktivität der jeweiligen Mäuseseren mit diesen Alicyclobazillen bestimmt.

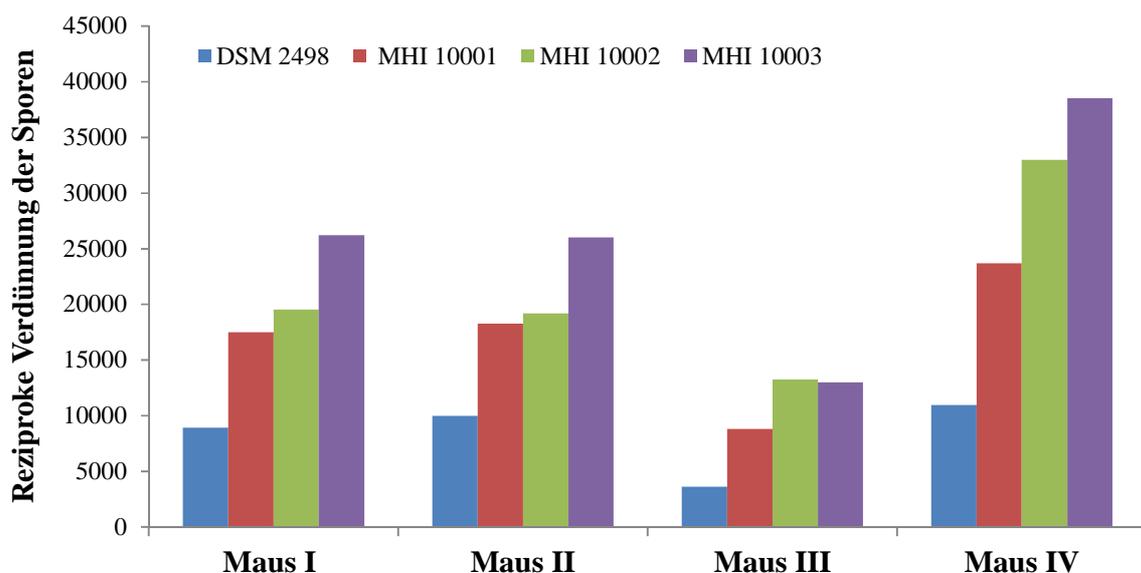


Abbildung 4.10: Apparente Affinität der vier Mäuseseren für die als Immunogen verwendeten *A. acidoterrestris* Stämme.

Tabelle 4.12: Apparente Affinität der Mäuseseren für verschiedene *A. acidoterrestris* Stämme bzw. Isolate: Angegeben sind diejenigen reziproken Verdünnungen der jeweiligen Sporenpräparationen bei denen im indirekten EIA noch eine Extinktion von 1,0 erzielt werden konnte.

Stamm	AS I	AS II	AS III	AS IV
DSM 2498	9000	10000	4000	11000
DSM 3922	6000	5000	3000	9000
DSM 3923	23000	22000	13000	30000
DSM 3924	8000	8000	6000	13000
MHI 10001	18000	19000	13000	33000
MHI 10015	5000	17000	3000	11000
MHI 10016	20000	37000	10000	37000
MHI 10017	8000	17000	5000	17000
MHI 10018	21000	40000	10000	23000
MHI 10019	33000	40000	12000	36000
MHI 10002	21000	20000	13000	33000
MHI 10003	29000	26000	13000	40000
MHI 10041	38000	77000	35000	71000
MHI 10042	37000	98000	20000	68000

Prinzipiell zeigten alle untersuchten Mäuseseren eine breite Reaktivität mit den eingesetzten *A. acidoterrestris* Stämmen, teilweise konnte noch bei Verdünnungen von $> 1:50.000$ (entspricht etwa 5×10^3 Sporen/ml) eine Reaktion im indirekten EIA nachgewiesen werden. Kreuzreaktivität mit anderen *Alicyclobacillus* Spezies wurde v. a. für *A. acidiphilus* und *A. acidocaldarius* beobachtet. (Tab. 4.13). Letztendlich wurden Maus I, Maus II und Maus IV aufgrund ihrer hohen Antikörper-Titer sowie der ausgeprägten Affinität für die Zellfusionen ausgewählt.

Tabelle 4.13: Apparente Affinität der Mäuseseren für verschiedene *Alicyclobacillus* spp.: Angegeben sind diejenigen reziproken Verdünnungen der jeweiligen Sporenpräparationen bei denen im indirekten EIA noch eine Extinktion von 1,0 erzielt werden konnte.

Spezies	Stamm	AS I	AS II	AS III	AS IV
<i>A. cycloheptanicus</i>	DSM 4005	1000	1000	500	2000
<i>A. acidocaldarius</i>	DSM 446	7000	10000	4000	20000
<i>A. acidiphilus</i>	DSM 14558	10000	14000	5000	14000
<i>A. sacchari</i>	DSM 17974	1000	1000	1000	8000

Kaninchenserum

Die apparente Avidität der Kaninchenserum für die verschiedenen *Alicyclobacillus* Stämme der Stammsammlung wurde ebenso wie für die Mäuseseren beschrieben bestimmt. Beide Kaninchen wiesen hohe Affinitäten für die vier zur Immunisierung verwendeten Stämme DSM 2498, MHI 10001, MHI 10002 und MHI 10003 auf (Abb. 4.11), beispielsweise konnte für MHI 10002 ein Antigen-Titer von 10.000 (entspricht $2,0 \times 10^4$ Sporen/ml) bei einer Extinktion von 1,0 bestimmt werden. Grundsätzlich wurden hierbei für das Endserum von Kaninchen II höhere apparente Aviditäten erzielt. Deswegen wurde im Hinblick auf die Etablierung eines sensitiven Sandwich EIAs dieses Antiserum für die Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten ausgewählt. Auch bei der Untersuchung der verschiedenen *A. acidoterrestris* Isolate verhielten sich beide Seren sehr ähnlich. Die Antiseren zeigten eine breite Reaktivität, für 28 der 32 untersuchten Vertreter der Spezies *A. acidoterrestris* konnten im EIA auch bei höheren Verdünnungen der eingesetzten Sporenpräparationen noch positive Resultate erzielt werden. Im Hinblick auf die Intragenus-Spezifität zeigten beide Seren ebenfalls ein sehr ähnliches Verhalten: Während jeweils ein Vertreter der Spezies *A. acidocaldarius*, *A. herbarius* und *A. sacchari* eine starke Reaktivität im EIA zeigte, wurden für *A. cycloheptanicus*, *A. acidiphilus*, *A. fastidiosus*, ein Isolat von *A. acidocaldarius* sowie drei nicht weiter klassifizierte Isolate von *Alicyclobacillus* spp. nur vergleichsweise niedrige Werte erzielt (Ergebnisse nicht dargestellt).

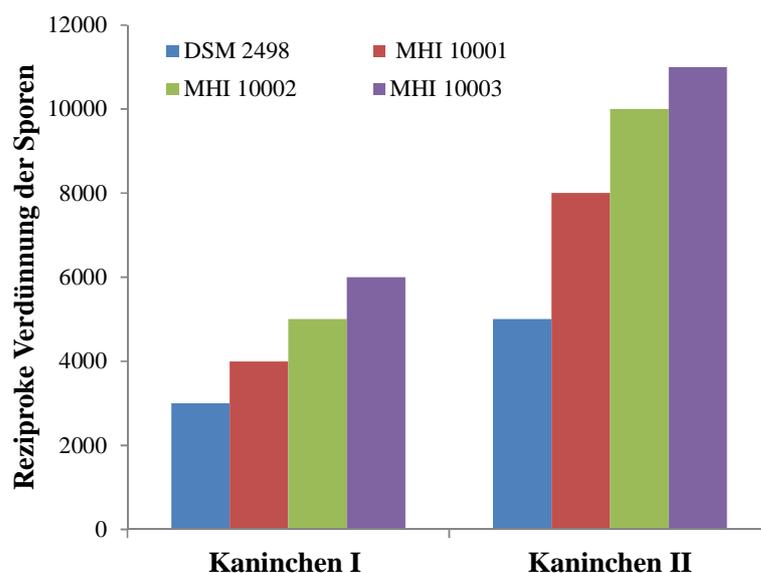


Abbildung 4.11: Apparente Affinität der Kaninchenserum für die als Immunogen verwendeten *A. acidoterrestris* Stämme

4.4.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Mittels Immunfluoreszenz wurde die Reaktivität der Mäuse- und Kaninchenantisera mit Sporen von *A. acidoterrestris* wie unter 3.2.1.4 beschrieben weiter verifiziert. Dabei wurden Sporenpräparationen mit den zu überprüfenden Antisera inkubiert, nach einem Waschschriff, bei dem nicht gebundene Antikörper entfernt wurden, wurden die Ansätze mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (Ziege anti-Maus oder Ziege anti-Kaninchen IgG) inkubiert. Die Reaktivität der Antisera mit den Sporen wurde dann unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

Mäusesera

Die Reaktivität der Mäusesera mit Sporen von *A. acidoterrestris* wurde im Verlaufe der Immunisierung wiederholt mittels Immunfluoreszenz überprüft. Als Sporenpräparationen wurde sowohl 5 x gewaschenes als auch mit Dichtegradientenzentrifugation hochaufgereinigtes Material eingesetzt. In beiden Ansätzen konnte für die untersuchten Mäusesera (entnommen nach 2. bzw. 3. Restimulierung) eine ausgeprägte Reaktivität nachgewiesen werden. Bei Verwendung von nicht hochaufgereinigtem Material konnte zudem gezeigt werden, dass noch vorhandene vegetative Zellen von den Antisera nicht erkannt wurden, ein weiterer Beleg für die hohe Spezifität der induzierten Antikörper gegen *A. acidoterrestris* Sporen. Um unspezifische Reaktionen auszuschließen, wurden Negativkontrollen durchgeführt. Dazu wurden zum einen Sporensuspensionen direkt mit fluoreszenzmarkierten Ziege anti-Maus Sekundärantikörpern inkubiert. Zum anderen wurden verschiedene Antisera von nicht mit *A. acidoterrestris* Sporen immunisierten Mäusen anstatt der spezifischen Mäusesera eingesetzt. Bei beiden Kontrollansätzen konnte unter dem Mikroskop keine Fluoreszenz detektiert werden, die Reaktivität der Antisera der immunisierten Mäuse mit *A. acidoterrestris* Sporen beruht demnach auf dem Vorhandensein von spezifischen Antikörpern.

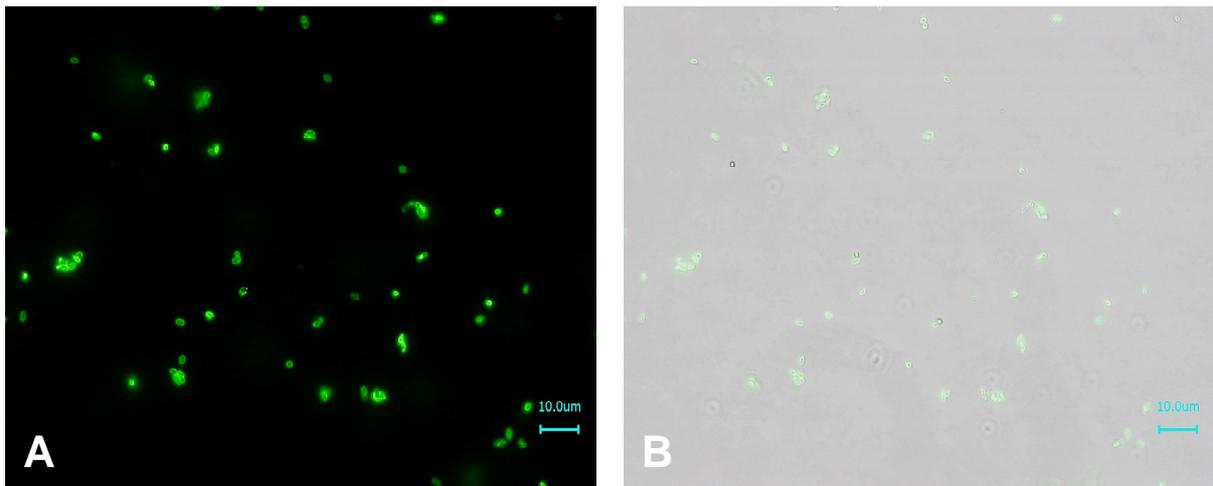


Abbildung 4.12: Reaktivität eines Mäuseserums (Maus IV) mit einer Sporenpräparation von *A. acidoterrestris* (DSM 2498): (A) Immunfluoreszenz (Belichtungszeit 1/10 s), (B) Overlay der Immunfluoreszenzaufnahme und einer Phasenkontrastaufnahme.

Kaninchenserum

Analog zum oben beschriebenen Vorgehen wurde die Reaktivität der Kaninchenserum mit Sporenpräparationen untersucht. Sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Restimulierung wurden die gewonnenen Seren für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen eingesetzt. Auch hier war eine deutliche Reaktivität der Seren beider Kaninchen mit den Sporen nachweisbar (Abb. 4.13), während parallel angesetzte Kontrollansätze unter Verwendung der von den beiden Kaninchen gewonnenen Präimmunsereen negative Ergebnisse erbrachten. Zusätzlich wurden die Kaninchenserum auf Reaktivität mit vegetativen Zellen überprüft. Die dazu eingesetzten Präparate wurden auf folgende Weise hergestellt: 5 ml BAT-Bouillon wurde mit je einer Öse Koloniematerial eines *A. acidoterrestris* Stammes/Isolats inokuliert und dann 2 d bei 45 °C inkubiert. Danach wurde die resultierende Zellsuspension abzentrifugiert und in PBS mit Zusatz von 2 % BSA sowie 1 % Tween 20 resuspendiert. Es konnte dabei keine Reaktivität der Kaninchenserum mit den vegetativen Zellen festgestellt werden, bereits gebildete, in den Präparationen ebenfalls vorhandene Sporen fluoreszierten dagegen deutlich.

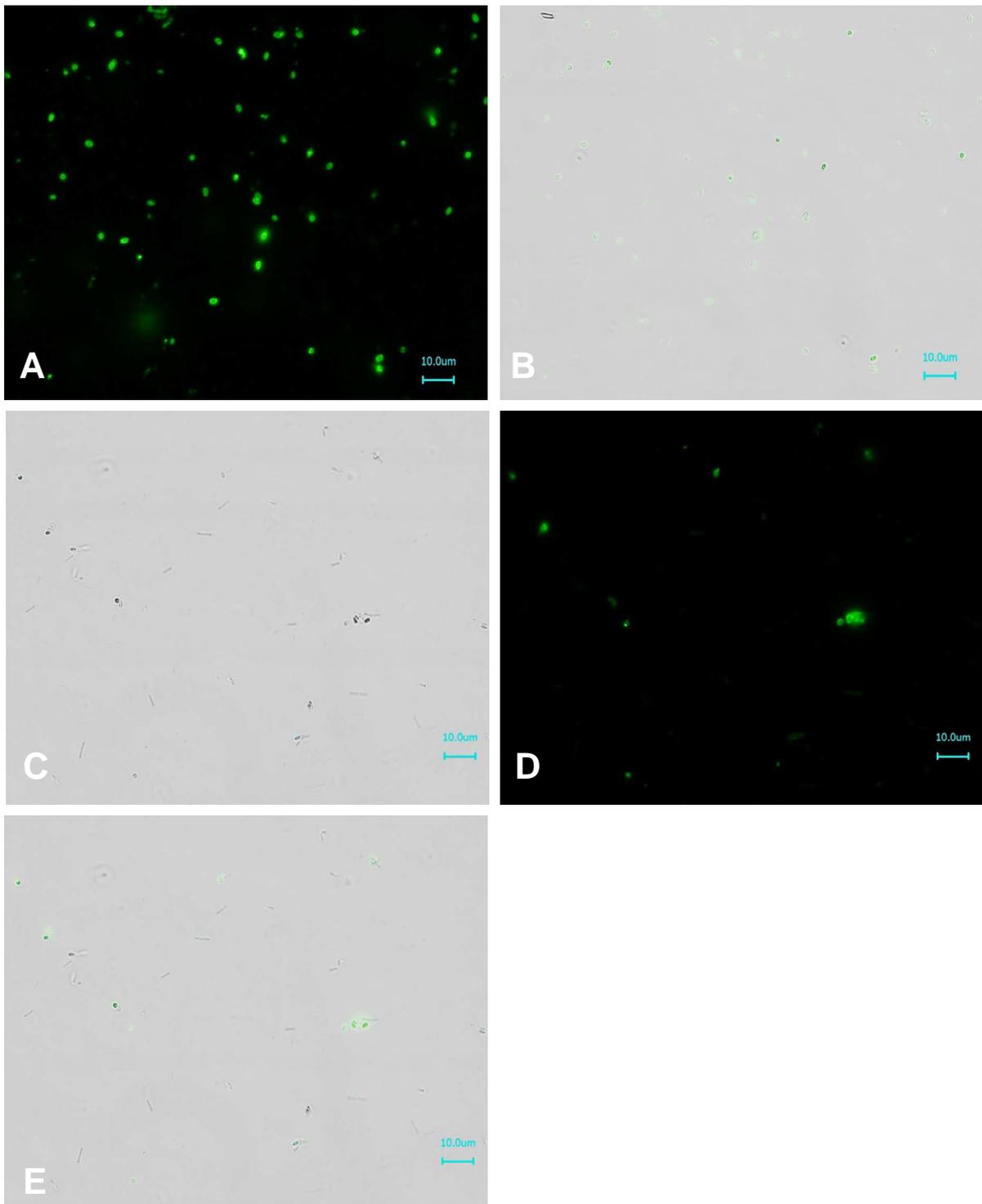


Abbildung 4.13: A/B: Reaktivität eines Kaninchenserums mit einer Sporenpräparation von *A. acidoterrestris* (DSM 2498): (A) Immunfluoreszenz, (B) Overlay mit der zugehörigen Phasenkontrastaufnahme. C-E zeigen die Phasenkontrastaufnahme einer Präparation mit überwiegend vegetativen Zellen (C), die Reaktivität eines Kaninchenserums mit der Präparation in der Immunfluoreszenz (D), sowie das Overlay (E) der beiden Aufnahmen.

4.4.4 Immunoblots

Inwieweit die generierten Antiseren mit proteinhaltigen Sporenpräparationen reagieren, wurde mittels Immunoblot überprüft. Zur Etablierung eines geeigneten Extraktionsverfahrens wurden dazu in Vorversuchen drei verschiedene Verfahren überprüft. Im Einzelnen waren dies: Extraktion von Sporenoberflächenproteinen mit (1) NaOH, (2) SDS-8 M-Harnstoff und (3) SDS.

Für die NaOH-Extraktion (1) nach SANCHEZ et al. (2009) wurden Sporensuspensionen zentrifugiert (4.600 x g, 15 min, RT), die resultierenden Sporenpellets in 1 ml einer 0,01 M NaOH-Lösung (versetzt mit Protease-Inhibitoren) resuspendiert und anschließend 1 h bei 4 °C schüttelnd inkubiert (Intellimixer, 12 rpm, F 90°), gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt. Anschließend wurden die proteinhaltigen Überstände abgenommen, portioniert und bei 4 °C bzw. -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Für den Einsatz in der Gelelektrophorese wurde ein Teil der Proteinüberstände mit SDS-Puffer und Bromphenolblau für 10 min im Wasserbad gekocht (3.2.2).

Bei der Extraktion von Proteinen mit SDS-8 M-Harnstoff (2) wurde ebenfalls ein Sporenpellet hergestellt, einmal in 1 ml PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend in 100 µl SDS-8 M-Harnstoff Probenpuffer resuspendiert (FROM et al., 2012). Die Ansätze wurden dann 10 min im Wasserbad gekocht, abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand für die SDS-PAGE verwendet.

Die dritte getestete Methode (3) basierte darauf, dass Sporensuspensionen direkt mit SDS (7,5 % SDS (g/v) in einem 30 mM Tris-HCl/3 mM EDTA-Puffer) und Bromphenolblau gekocht, anschließend abzentrifugiert und die resultierenden Überstände analysiert wurden.

Die Auftrennung der Proteine in den Präparationen erfolgte mittels SDS-PAGE (3.2.2), zur Anfärbung der getrennten Proteinbanden wurde Coomassie-Blau eingesetzt. Die Analyse der Proteinmuster ergab, dass sich vor allem Proteine mit einem Gewicht von ca. 14 kDa und weniger darstellen ließen (Abb. 4.14).

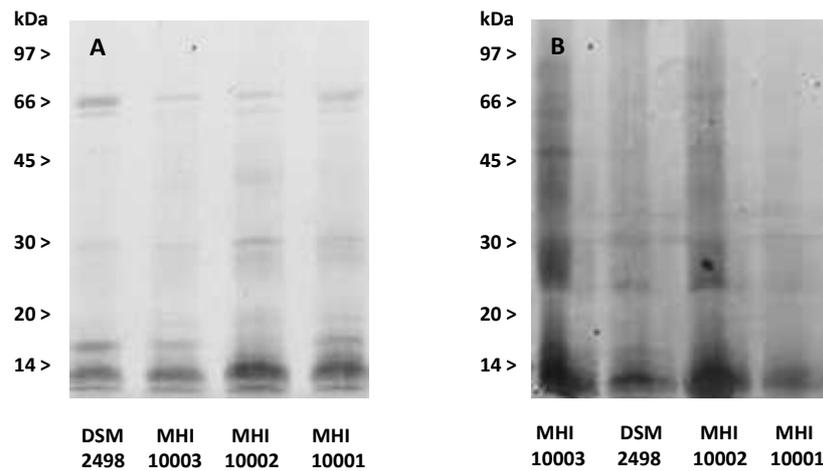


Abbildung 4.14: SDS-PAGE von Protein-Präparationen, die von mit 0,01 M NaOH (A) bzw. SDS-8 M-Harnstoff (B) behandelten *A. acidoterrestris* Sporen gewonnen wurden (Färbung mit Coomassie-Blau).

Basierend auf diesen orientierenden Versuchen wurde die schonendere Extraktionsmethode mit 0,01 M NaOH für den weiteren Einsatz ausgewählt, da die gewonnenen Sporen-Oberflächenproteine bei diesem Verfahren in klar definierte Banden aufgetrennt werden konnten. Außerdem kommt es bei diesem milden Extraktionsverfahren nicht zur Lyse der Sporen und damit zu keiner unerwünschten Freisetzung von intrazellulären Proteinen.

Die Banden der mit SDS-8 M-Harnstoff sowie SDS gewonnenen Proteine waren hingegen nach SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie-Blau undeutlich abgegrenzt und verwaschen und daher nur eingeschränkt geeignet um die Reaktivität von Antikörpern mit Sporen im Immunoblot zu untersuchen. Prinzipiell war bei Einsatz von mit SDS extrahierten Proteinen im Immunoblot aber eine deutlich größere Bandbreite an Proteinbanden zu beobachten als bei mit NaOH behandelten Präparationen. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass bei Extraktion mit SDS nicht nur Oberflächenproteine extrahiert werden, sondern dass daneben auch intrazelluläre Proteine freigesetzt werden.

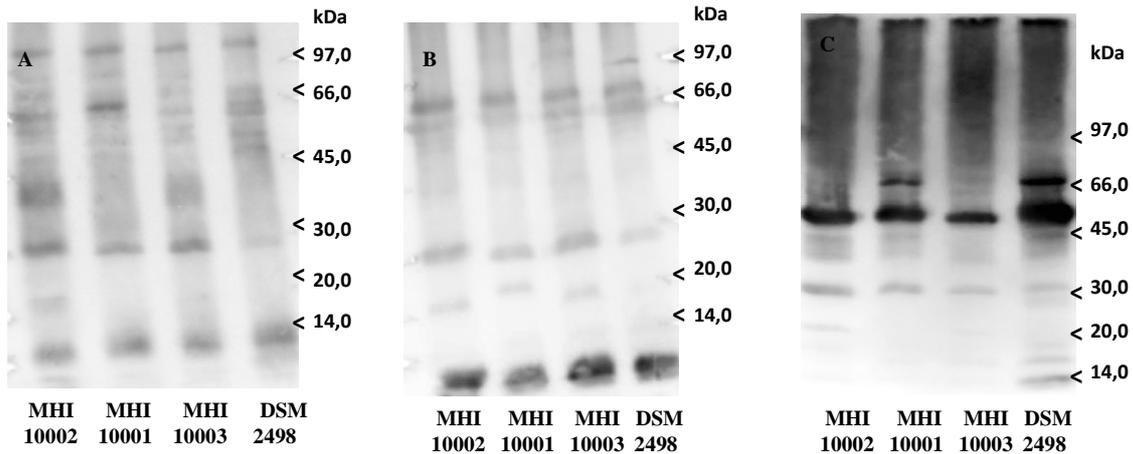


Abbildung 4.15: Immunoblot-Analysen zur Reaktivität von (A) Serum des Kaninchens I, (B) Serum des Kaninchens II sowie (C) Mäuseserum I mit Oberflächenprotein-Präparationen von *A. acidoterrestris* Sporen.

Im Immunoblot (3.2.1.4) zeigten beide Kaninchenantisera (Kaninchen I und II) und alle Mäusesera eine deutliche Reaktivität mit den mittels NaOH extrahierten Oberflächenproteinen von *A. acidoterrestris* Sporen (Abb. 4.15). Während bei den Kaninchensera und Maus II v. a. eine Reaktivität mit Proteinen mit einem apparenten Molekulargewicht von < 14 kDa (insbesondere Kaninchenserum II) bzw. knapp unter 30 kDa, sowie eine Doppelbande bei 66 kDa auftraten, wurden die Immunoblots bei den Sera von Maus III v. a. von einer prominenten Bande bei 30 kDa (nicht dargestellt) bzw. bei den Sera von Maus I und IV bei ca. 50 kDa dominiert, die in den Coomassie-gefärbten Gelen (Abb. 4.14) nur eine untergeordnete Rolle spielte.

4.5 Anwendungsstudien zu den polyklonalen Kaninchenantisera

Um ein Kaninchenserum-basiertes Sandwich EIA System zur Detektion von *A. acidoterrestris* Sporen zu etablieren, wurde basierend auf den Charakterisierungs-Ergebnissen der polyklonalen Antisera das Serum des Kaninchens II für die Herstellung Peroxidase-markierter Antikörper ausgewählt. Dieses Antiserum zeichnete sich wie in 4.4.1 und 4.4.2 dargestellt durch hohe Antikörper-Titer und eine ausgeprägte Affinität für Sporen von *A. acidoterrestris* aus.

Zur Kopplung wurden mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällte Antisera eingesetzt. Diese wurden gegen einen 10 mM Kaliumphosphatpuffer dialysiert und anschließend mit aktivierter Peroxidase in einem molaren Verhältnis von 4,5:1 versetzt. Mit

einem 0,5 M Natriumcarbonatpuffer wurde der pH-Wert der Lösung auf 8,5 eingestellt und der Ansatz für 2 h bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss und leichtem Rühren inkubiert. Nach Zugabe von Triethanolaminlösung sowie Natriumborhydridlösung und einem kurzen Inkubationsschritt (30 min, 4 °C) wurde erneut Triethanolaminlösung zugesetzt. Der Ansatz wurde für weitere 2 h bei 4 °C inkubiert, danach wurde das Konjugat mit Glycin-Lösung versetzt und sofort gegen einen mit Glycin versetzten Phosphatpuffer (0,013 mol/l) dialysiert. Abschließend wurde das Konjugat mit 1 % (g/v) HSA (humanes Serumalbumin) versetzt, sowie zur Konservierung 0,01 % (g/v) Thimerosal bzw. zur zusätzlichen Stabilisierung StabilZyme Conjugate Stabilizer (SurModics) zugefügt. Die Lagerung der Konjugate erfolgte bei 4 °C.

Der Erfolg des Kopplungsansatzes wurde mittels indirekter EIAs überprüft. Dabei zeigte sich, dass durch die Peroxidase-Markierung keine Reduktion der Antikörper-Aktivität induziert wurde, sowohl markierte als auch nicht markierte Seren zeigten identische Titer im EIA. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei Einsatz des Antikörper-HRP Konjugates keine unspezifischen Reaktionen auftraten, die Extinktionswerte antigenfreier Kontrollansätze (Background) lagen unter 0,05. Mit den generierten Kaninchenserum-Enzymkonjugaten war es möglich, verschiedene Sandwich EIA-Varianten zu etablieren, mit deren Hilfe u. a. Hybridomzelllinien selektiert und charakterisiert werden konnten (4.7.2).

4.5.1 Etablierung eines Sandwich EIA

Zur Optimierung des unter 3.2.1.2 beschriebenen Sandwich EIAs wurden verschiedene Verdünnungen der Fangantikörper – mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällte und anschließend gegen PBS dialysierte Kaninchenserum –, bzw. der HRP-Konjugate, eingesetzt und deren Einfluss auf die Sensitivität des Nachweisverfahrens überprüft. Ziel war es, eine hohe Absorption bei antigenhaltigen Ansätzen sowie eine möglichst geringe Absorption bei antigenfreien Ansätzen (Background) zu erhalten. Des Weiteren wurden verschiedene Beschichtungspuffer (Bicarbonatpuffer und PBS) getestet, außerdem wurde untersucht, ob durch Zusatz verschiedener Detergentien zum Probenverdünnungspuffer PBS eine Steigerung der im Sandwich EIA generierten Signalintensitäten erreicht werden konnte. Dazu wurden Tween 20 (0,05 % bis 1 %) oder 0,1 % BSA bzw. eine Kombination beider Reagenzien eingesetzt (Abb. 4.16). Es konnte gezeigt werden, dass durch den Zusatz von 0,1 % Tween 20 zum Probenverdünnungspuffer ein mehr als doppelt so hohes Meßsignal im EIA erreicht wurde als bei Verwendung von PBS oder PBS mit Zusatz von 0,1 % BSA. Auch bei

Verwendung von PBS mit Zusatz von 0,1 % BSA und Tween 20 war die Signalintensität deutlich geringer. Ebenso wurde ein möglicher Effekt des Zusatzes von Tween 20 zum Verdünnungspuffer der HRP-markierten Kaninchenantikörper überprüft, hierbei konnte jedoch keine Verbesserung der EIA-Meßdaten induziert werden.

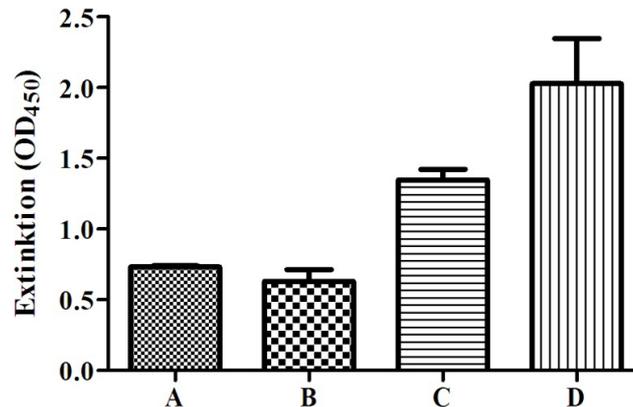


Abbildung 4.16: Effekt von Tween 20 bzw. BSA-Zusätzen zum Probenverdünnungspuffer auf die im Sandwich EIA generierten Signalintensitäten.

Untersucht wurde eine Mischung aus vier Stämmen von *A. acidoterrestris* (DSM 2498, MHI 10001, MHI 10002 und MHI 10003), der Sporengehalt lag bei $6,0 \times 10^5$ Sporen/ml. (A) PBS, (B) PBS/0,1 % BSA, (C) PBS/0,1 % BSA/0,1 % Tween oder (D) PBS/0,1 % Tween.

Nach vergleichender Analyse beider Kaninchenseren im etablierten Sandwich EIA System zum Nachweis von *Alicyclobacillus* Sporen (Abb. 4.17), wurde Serum II aufgrund der etwas höheren Sensitivität im EIA für den weiteren Einsatz als Beschichtungsantikörper ausgewählt.

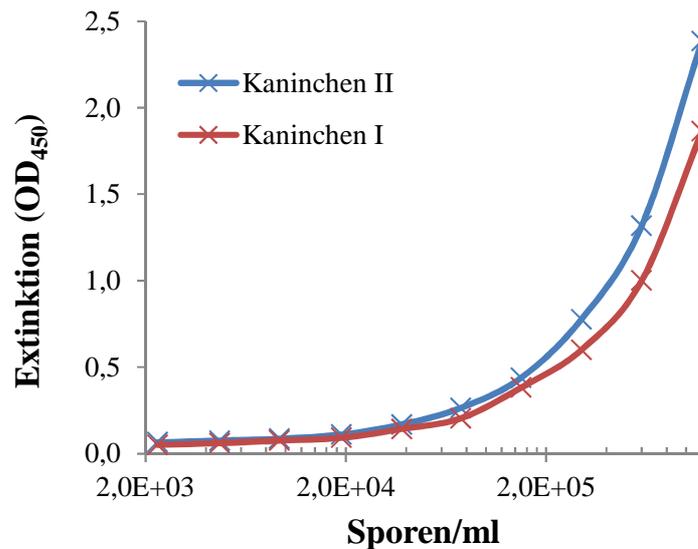


Abbildung 4.17: Bei Verwendung der von Kaninchenserum I bzw. II als Fangantikörper im Sandwich EIA erhaltene Standardkurven. Als Sporenmateriale wurden Präparationen von *A. acidoterrestris* (DSM 2498, MHI 10001, 10002 und 10003) eingesetzt.

4.5.1.1 Inklusivität & Exklusivität des Sandwich EIA

Zur umfassenden Untersuchung der Inklusivität (Anteil der positiv reagierenden *A. acidoterrestris* Stämme) des Kaninchenserum-basierten Sandwich EIA Verfahrens (4.5.1) wurden Sporenpräparationen der in der Stammbibliothek konservierten Stämme von *A. acidoterrestris* (4 DSMZ Referenzstämme und 38 Isolate) eingesetzt. Außerdem wurde die Exklusivität des EIA, d. h. potentielle Kreuzreaktivität, sowohl innerhalb des Genus (Intragenus-Spezifität) unter Einbeziehung von 8 DSMZ Stämmen sowie 11 Isolaten verschiedener *Alicyclobacillus* spp., als auch mit Sporen von 30 Nicht-*Alicyclobacillus* Stämmen (Intergenusspezifität) untersucht. Die dazu eingesetzten *Bacillus* und *Clostridium* spp. stammten aus der hauseigenen Stammsammlung (Tab. 4.14).

Tabelle 4.14: *Bacillus* und *Clostridium* spp., deren Sporen für die Überprüfung der Exklusivität des Sandwich EIA eingesetzt wurden.

Spezies	Stamm	Spezies	Stamm
<i>C. perfringens</i>	DSM 11786	<i>B. weihenstephanensis</i>	MHI 176
<i>C. perfringens</i>	MHI 9014	<i>B. weihenstephanensis</i>	MHI 179
<i>C. perfringens</i>	MHI 9016	<i>B. thuringiensis</i>	ATCC 10792
<i>C. perfringens</i>	MHI 9015	<i>B. thuringiensis</i>	DSM 6029
<i>C. perfringens</i>	MHI 9017	<i>B. mycoides</i>	DSM 299
<i>B. cereus</i>	DSM 2302	<i>B. mycoides</i>	MHI 208
<i>B. cereus</i>	DSM 345	<i>B. licheniformis</i>	DSM 13
<i>B. cereus</i>	ATCC 11778	<i>B. licheniformis</i>	MHI 251
<i>B. cereus</i>	MHI 10	<i>B. subtilis</i>	DSM 2109
<i>B. cereus</i>	MHI 187	<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633
<i>B. cereus</i>	MHI 1304	<i>B. circulans</i>	ATCC 9966
<i>B. cereus</i>	MHI 1607	<i>B. coagulans</i>	ATCC 7050
<i>B. cereus</i>	MHI 1353	<i>B. pumilus</i>	MHI 252
<i>B. cereus</i>	MHI 1732	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	ATCC 245
<i>B. weihenstephanensis</i>	MHI 170	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	ATCC 10401

Die Sandwich EIAs wurden wie unter 3.2.4.3 beschrieben durchgeführt. Das Sporenmaterial wurde in Form von Verdünnungsreihen eingesetzt. Diejenige reziproke Verdünnung der Sporen, bei der im EIA eine Extinktion entsprechend dem doppelten Background-Wert erreicht wurde, wurde als Nachweisgrenze definiert. Da die untersuchten Sporen-Präparationen der jeweiligen Stämme unterschiedliche Keimdichten aufwiesen, wurden zum Vergleich der Reaktivität die Sporen-Präparationen der eingesetzten *Alicyclobacillus* Stämme anhand der optischen Dichte (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm) normalisiert, eine Extinktion von 1,0 entsprach hierbei ca. 10^7 Sporen/ml.

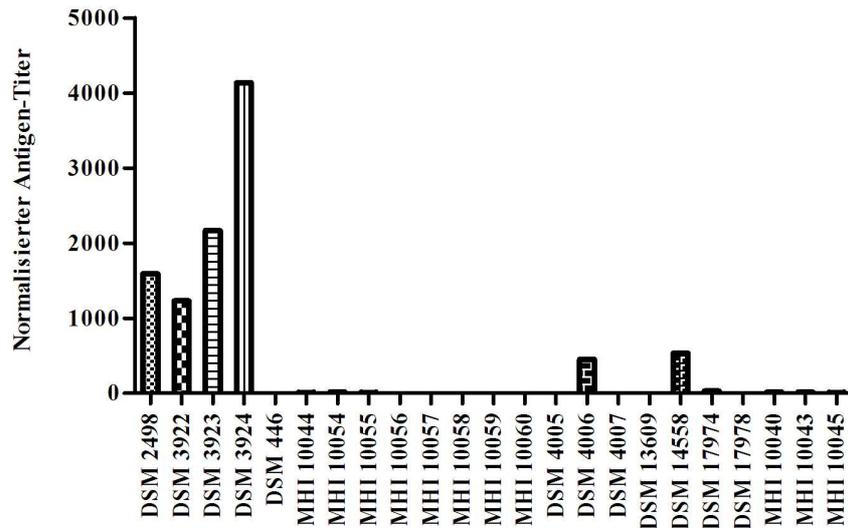


Abbildung 4.18: Reaktivität des Kaninchenserum-basierten Sandwich EIA Systems mit verschiedenen Spezies von Alicyclobazillen: *A. acidoterrestris*: DSM 2498, DSM 3922, DSM 3923 und DSM 3924; *A. acidocaldarius*: DSM 446, MHI 10044, MHI 10054, MHI 10055, MHI 10056, MHI 10057, MHI 10058, MHI 10059 und MHI 10060; *A. cycloheptanicus*: DSM 4005, DSM 4006 und DSM 4007; *A. herbarius*: DSM 13609; *A. acidiphilus*: DSM 14588; *A. sacchari*: DSM 17974; *A. fastidiosus*: DSM 17978; *Alicyclobacillus* spp.: MHI 10040, MHI 10043, MHI 10045; Als normalisierter Antigen-Titer wird die reziproke Verdünnung des Antigens – normalisiert anhand der optischen Dichte des untersuchten Sporenpräparats – bezeichnet, anhand derer die jeweilige Nachweisgrenze bestimmt wurde.

Wie in Abb. 4.18 und 4.19 dargestellt, weist das EIA-System eine hohe Affinität für die vier Referenzstämme von *A. acidoterrestris* (DSM 2498, 3923, 3924 und Typstamm 3922) auf, die Nachweisgrenzen für diese Stämme waren sehr niedrig und lagen durchschnittlich bei 5×10^3 Sporen/ml. Diese Werte belegen die hohe Sensitivität des entwickelten EIA für Sporen von *A. acidoterrestris*. Auch für die parallel untersuchten 38 weiteren Vertreter der Spezies *A. acidoterrestris* konnten niedrige Nachweisgrenzen ermittelt werden (Tab. 4.15). Diese reichten von $2,1 \times 10^3$ (MHI 10038) bis $3,8 \times 10^4$ (MHI 10033) Sporen/ml, nur Isolat MHI 10047 wies eine höhere Nachweisgrenze von 5×10^5 Sporen/ml auf. Insgesamt konnte eine ausgezeichnete Inklusivität festgestellt werden, da alle untersuchten Isolate und Referenzstämme von *A. acidoterrestris* mit dem etablierten EIA detektiert werden, dabei war die Reaktivität völlig unabhängig von der Zugehörigkeit der einzelnen Stämme zu den

verschiedenen RAPD Gruppen (Abb. 4.20). Dies impliziert, dass der Sandwich EIA generell geeignet ist, eine Vielzahl genetisch unterschiedlicher *A. acidoterrestris* Stämme nachzuweisen.

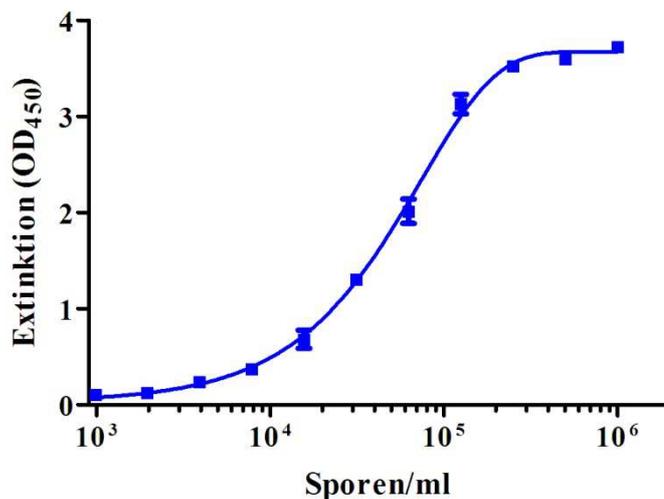


Abbildung 4.19: Standardkurve des Sandwich EIA für Sporen des *A. acidoterrestris* Referenzstamms DSM 3923. Die Nachweisgrenze lag bei $4,4 \times 10^3$ Sporen/ml.

Tabelle 4.15: Nachweisgrenzen des Kaninchenserum-basierten Sandwich EIA für Sporen verschiedener *A. acidoterrestris* Referenzstämme und Isolate.

Nachweisgrenze (Sporen/ml)	Stamm/Isolat ¹
2000 - 4000	MHI 10038, MHI 10016, DSM 3924, MHI 10020, MHI 10019, MHI 10018, MHI 10021, MHI 10024
4000 - 6000	MHI 10025, MHI 10037, MHI 10042, MHI 10015, DSM 3923, MHI 10028, MHI 10023, MHI 10041, MHI 10034
6000 - 8000	DSM 2498, MHI 10017, MHI 10035, MHI 10026, MHI 10029, MHI 10032
8000 – 20.000	DSM 3922, MHI 10049, MHI 10027, MHI 10039, MHI 10051, MHI 10053, MHI 10002, MHI 10052, MHI 10031, MHI 10001, MHI 10061, MHI 10030, MHI 10036, MHI 10048
20.000 – 40.000	MHI 10022, MHI 10050, MHI 10003, MHI 10033
> 40.000	MHI 10047

¹: Reihenfolge: niedrigste zu höchste Reaktivität

Gruppe I	DSM 3922	DSM 3923	DSM 3924	MHI 10041	MHI 10001
	MHI 10002	MHI 10003			
Gruppe II	MHI 10024	MHI 10025	MHI 10032	MHI 10022	MHI 10030
Gruppe III	MHI 10016	MHI 10017	MHI 10019	MHI 10020	MHI 10021
	MHI 10026	MHI 10027	MHI 10028	MHI 10034	MHI 10035
	MHI 10037	MHI 10038	MHI 10015	MHI 10031	MHI 10033
	MHI 10039				
Gruppe IV	MHI 10023	MHI 10029	MHI 10036	MHI 10042	
ohne Gruppe	DSM 2498	MHI 10018			
	MHI 10040	MHI 10043	MHI 10044	MHI 10045	MHI 10047
EIA-Reaktivität		hoch	mittel	gering	

Abbildung 4.20: Vergleichende Darstellung der Reaktivität von *A. acidoterrestris* und anderen *Alicyclobacillus* Isolaten im Sandwich EIA in Abhängigkeit von der bei der RAPD-Klassifizierung ermittelten Gruppenzugehörigkeit.

Neben der hohen Inklusivität und Sensitivität zeichnete sich der Sandwich EIA ebenfalls durch seine Exklusivität aus. Während alle 42 getesteten Isolate und Referenzstämme von *A. acidoterrestris* mit Hilfe des EIA zuverlässig nachzuweisen waren, konnte keine Reaktivität mit neun Stämmen von *A. acidocaldarius*, zwei Stämmen von *A. cycloheptanicus*, Vertretern von *A. herbarius*, *A. sacchari* und *A. fastidiosus*, sowie drei weiteren Isolaten, deren Spezieszugehörigkeit innerhalb des Genus *Alicyclobacillus* unklar ist, detektiert werden. Nur jeweils ein Stamm der potentiell Fehleroma-produzierenden aber Guajacol-negativen (4.1.2.3) *A. acidiphilus* (DSM 14558) bzw. *A. cycloheptanicus* (DSM 4006) generierten leicht positive Reaktionen im EIA (Abb. 4.18). Die Untersuchung der Intergenusspezifität ergab zudem, dass Sporen anderer Gattungen (*Bacillus* und *Clostridium* spp.; Tab. 4.14) nicht im Sandwich EIA reagierten.

4.5.1.2 Detektion von Sporen in Fruchtsäften

In einer umfangreichen Anwendungsstudie wurde der etablierte Sandwich EIA eingehend auf die Einsetzbarkeit zum Nachweis von *A. acidoterrestris* Sporen in kontaminierten Fruchtsaftproben untersucht. Dazu wurden Proben verschiedener Fruchtsäfte (Orange, klarer und trüber Apfel, Birne, Tomate, Pink Grapefruit und Traube) mit Sporen von *A. acidoterrestris* kontaminiert und mittels EIA analysiert.

Die Saftproben wurden dazu, in Anlehnung an IFU-Methode Nr. 12, zunächst zehnfach in BAT-Bouillon verdünnt, mit Sporen einer Mischung von vier Stämmen von *A. acidoterrestris* (DSM 2498, MHI 10001, MHI 10002 und MHI 10003) in einer definierten Konzentration (10^7 Sporen/ml) kontaminiert und dann als Verdünnungsreihe (Verdünnungspuffer: PBS/0,1 % Tween) direkt in den etablierten Sandwich EIA eingesetzt. Als Negativkontrolle diente eine nicht kontaminierte Probe. In diesen orientierenden Versuchen wurde auch der Einfluss des pH-Wertes der Saftproben auf EIA-spezifische Parameter (Signalintensität und Reproduzierbarkeit) überprüft. Dazu wurden die pH-Werte der Fruchtsaftproben durch Zugabe von 1 M Sørensen-Phosphatpuffer, auf verschiedene pH-Werte (5 – 7) eingestellt. Es konnte gezeigt werden, dass bis zu pH-Werten von 6 geringere Absorptionswerte, sowie eine unspezifische Bindung der Sporen an die Mikrotiterplatten im EIA auftraten. Signifikant bessere Ergebnisse konnten dagegen mit pH Werten von 6,5 oder höher erzielt werden (Abb. 4.21). Infolgedessen wurde für die EIA-Untersuchungen der pH der in BAT-Bouillon verdünnten Saftproben durch Zugabe von 0,2 ml eines 1 M Sørensen-Phosphatpuffers (mit Zusatz von 1 % Tween 20) zu 1 ml Probe auf einen pH von 6,5 eingestellt.

Die Untersuchungen der angelegten Verdünnungsreihen zeigten zudem, dass unabhängig von der Saftsorte, Nachweisgrenzen von ca. 10^4 Sporen/ml im EIA erreicht wurden. Somit konnte bestätigt werden, dass prinzipiell mit dem EIA die sensitive Detektion von *A. acidoterrestris* Sporen auch in Saftmatrix möglich ist.

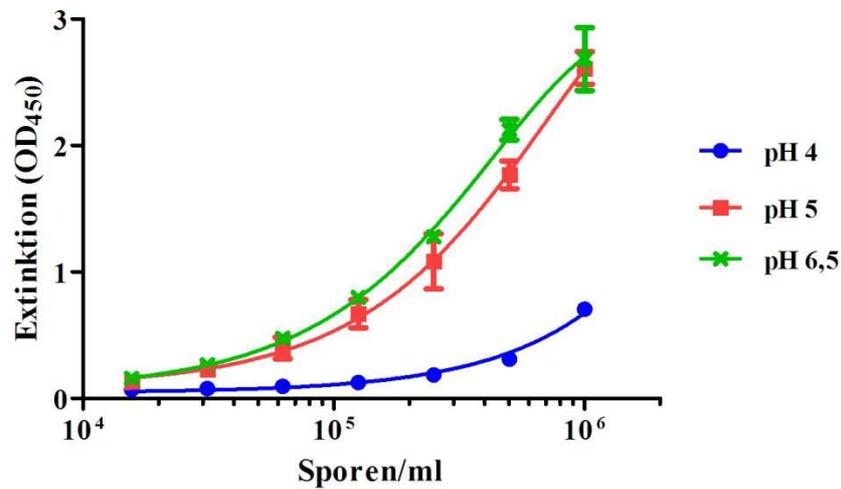


Abbildung 4.21: Auswirkung verschiedener pH-Werte auf die Signalintensität des Sandwich EIA. Untersucht wurde eine zehnfach in BAT-Bouillon verdünnte und mit einer Mischung aus vier Stämmen von *A. acidoterrestris* (DSM 2498, MHI 10001, MHI 10002 und MHI 10003) künstlich kontaminierte Orangensaftprobe bei verschiedenen pH-Werten.

Die einzelnen Saftsorten unterschieden sich jedoch hinsichtlich der Höhe ihrer Background-Absorptionswerte, wobei die Analyse von Orangen-, Tomaten- und Pink-Grapefruitsaft in niedrigen maximalen Backgroundwerten von ca. 0,05 resultierte, während die anderen Saftsorten deutlich höhere Werte aufwiesen (ca. 0,2 für Birne, 0,4 – 0,5 für weißen Traubensaft und trüben Apfelsaft und > 0,8 für klaren Apfelsaft). Wie in Tabelle 4.16 und 4.17 dargestellt, konnten diese hohen Backgroundwerte durch einen einfachen Verdünnungsschritt auf akzeptable Werte von ca. 0,2 minimiert werden, so dass die Anwendung des etablierten EIA auch für diese Saftsorten möglich ist.

Um im Weiteren die praktische Anwendbarkeit des EIA unter möglichst realen Bedingungen zu überprüfen, wurden 10 ml Orangensaftprobe künstlich mit 1 bzw. 10 Sporen/ml des DSM-Stammes 2498 bzw. des Isolates MHI 10003 kontaminiert, zehnfach in BAT Bouillon verdünnt und anschließend entsprechend der IFU Methode Nr. 12 einer Hitzebehandlung (10 min bei 80 °C) unterzogen. Nach 24 bzw. 48 h Inkubation bei 45 °C wurden Proben gezogen und parallel mit dem entwickelten EIA sowie konventionell mikrobiologisch untersucht. Diese orientierenden Versuche zeigten, dass die Keimzahlen nach 24 h Inkubation bei < 10³ bis 1,3 × 10⁴ lagen (Abb. 4.22), Werte die unter oder knapp im Bereich der

Nachweisgrenze des EIA für diese beiden Stämme liegen (Tab. 4.15). Dementsprechend wurden für die nach 24 h gezogenen Proben im EIA negative Ergebnisse erhalten. Nach 48 h Inkubation konnten alle künstlich kontaminierten Proben im EIA eindeutig als positiv identifiziert werden.

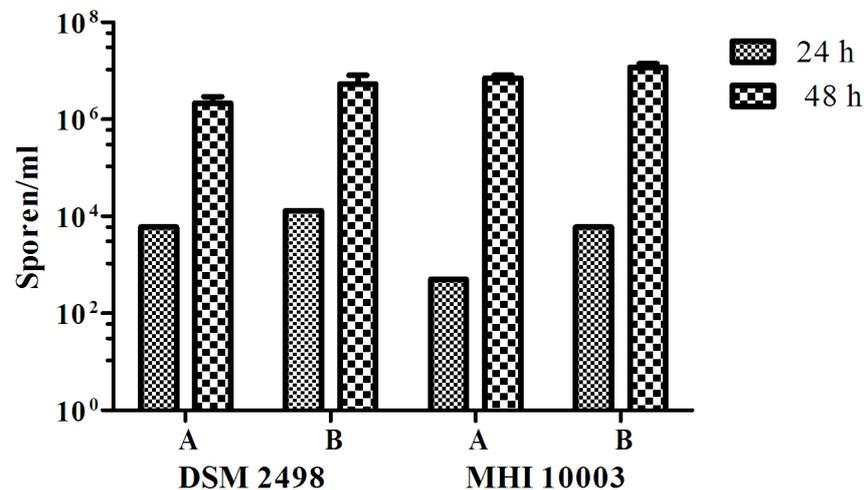


Abbildung 4.22: Sporenzahlen in Orangensaftproben, die mit 1 (A) oder 10 (B) Sporen/ml des Referenzstamms DSM 2498 oder des Isolats MHI 10003 künstlich kontaminiert und dann für 24 bzw. 48 h bei 45 °C in BAT-Bouillon inkubiert wurden.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Vorversuche wurden die Untersuchungen zum Nachweis von *A. acidoterrestris* in künstlich kontaminierten Proben auf eine breite Palette verschiedener Fruchtsäfte ausgeweitet. Die in Tab. 4.16 und 4.17 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass nach 48 stündiger Inkubation alle kontaminierten Proben mittels Sandwich EIA bis zu Verdünnungen von > 1:16 zuverlässig als positiv identifiziert werden konnten. Die unterschiedliche Ausgangskontamination von 1 bzw. 10 Sporen/ml hatte hierbei tendenziell nur bei manchen Saftsorten (Traube, Pink-Grapefruit, trüber Apfel) Einfluss auf die im EIA messbare Signalintensität, wobei allerdings für die meisten Proben kein Endpunkttiter (Probenverdünnungsstufe äquivalent zur Nachweisgrenze des EIAs) bestimmt wurde. Interessanterweise wurden in Orangensaft, Tomatensaft, trübem Apfelsaft und Birnensaft für das Isolat MHI 10003 deutlich höhere Messwerte erhalten als für die mit dem Stamm DSM 2498 kontaminierten Proben, obwohl für die Sporen des Isolates in den Untersuchungen zur Sensitivität des EIA eine vergleichsweise schlechte Nachweisgrenze von

$3,5 \times 10^4$ Sporen/ml (Tab. 4.15) ermittelt worden war. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die – wie oben erwähnt – hohen Background-Messwerte bestimmter Säfte (Birnen-, weißer Trauben-, trüber und klarer Apfelsaft) keinen Einfluss auf die Nachweiseffizienz der jeweiligen EIAs hatte. Bei einer Verdünnung von 1:16 lagen die Background-Werte aller untersuchten Saftsorten bei maximal 0,15, während die Signalintensitäten der mit *A. acidoterrestris* Sporen kontaminierten Säfte nach 48 h Inkubation mindestens doppelt so hoch waren und damit eindeutig die Differenzierung zwischen kontaminierten und nicht kontaminierten Proben ermöglichten.

Tabelle 4.16: EIA Ergebnisse für verschiedene Saftproben (zehnfach in BAT-Bouillon verdünnt), die mit 0, 1 oder 10 Sporen/ml des Isolats MHI 10003 (A) bzw. des Referenzstamms DSM 2498 (B) künstlich kontaminiert und für 48 h bei 45 °C inkubiert wurden. Die Saftproben wurden für die EIA Analyse seriell verdünnt. Dargestellt sind die Ergebnisse für zwei Sorten von Fruchtsäften (Orange und Tomate) mit niedrigem EIA-Background, sowie weißer Traubensaft (mittlerer Background) und klarer Apfelsaft (hoher Background). Die angegebenen Daten repräsentieren die Mittelwerte von drei unabhängigen Ansätzen.

*	EIA Ergebnisse (Extinktion bei 450nm)									
	Orangensaft					Tomatensaft				
	0	1		10		0	1		10	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1:1	0,05 ± 0,01	3,62	1,65	3,62	3,11	0,05 ± 0,01	3,50	1,98	3,55	1,97
1:2	0,05 ± 0,01	3,61	0,74	3,62	2,44	0,05 ± 0,01	3,13	0,98	3,61	1,15
1:4	0,04 ± 0,01	3,51	0,47	3,56	1,58	0,04 ± 0,01	2,82	0,51	3,55	0,59
1:8	0,04 ± 0,01	3,15	0,26	3,27	0,91	0,05 ± 0,01	2,61	0,29	3,20	0,35
1:16	0,04 ± 0,01	2,64	0,16	2,98	0,56	0,05 ± 0,01	2,51	0,16	2,65	0,20
*	weißer Traubensaft					klarer Apfelsaft				
	0	1		10		0	1		10	
		A	B	A	B	A	B	A	B	
1:1	0,40 ± 0,07	3,15	3,62	3,59	3,61	0,87 ± 0,15	2,48	2,74	3,10	2,82
1:2	0,36 ± 0,05	2,18	3,21	3,61	3,45	0,64 ± 0,07	1,90	2,16	1,98	2,06
1:4	0,29 ± 0,05	1,31	2,15	3,48	2,93	0,40 ± 0,04	1,20	1,51	1,29	1,72
1:8	0,22 ± 0,04	0,84	1,51	2,83	2,40	0,20 ± 0,03	0,75	0,44	0,78	1,30
1:16	0,15 ± 0,02	0,49	0,79	2,07	1,72	0,08 ± 0,03	0,40	0,55	0,39	0,84

*: Verdünnung

Tabelle 4.17: EIA Ergebnisse für verschiedene Saftproben (zehnfach in BAT-Bouillon verdünnt), die mit 0, 1 oder 10 Sporen/ml des Isolats MHI 10003 (A) bzw. des Referenzstamms DSM 2498 (B) künstlich kontaminiert und für 48 h bei 45 °C inkubiert wurden. Die Saftproben wurden für die EIA-Analyse seriell verdünnt. Dargestellt sind die Ergebnisse für trüben Apfelsaft, Pink-Grapefruitsaft sowie Birnensaft. Die angegebenen Daten repräsentieren die Mittelwerte von drei (unkontaminierte Proben) bzw. zwei (kontaminierte Proben) unabhängigen Ansätzen.

*	EIA Ergebnisse (Extinktion bei 450nm)														
	trüber Apfelsaft					Pink-Grapefruitsaft					Birnensaft				
	0	1		10		0	1		10		0	1		10	
		A	B	A	B		A	B	A	B		A	B		
1:1	0,50 ± 0,11	3,54	1,56	3,58	3,21	0,06 ± 0,01	3,36	3,69	3,41	3,56	0,24 ± 0,02	3,64	2,15	3,40	2,25
1:2	0,30 ± 0,06	3,10	0,77	3,64	1,95	0,05 ± 0,01	2,76	3,29	3,47	3,60	0,17 ± 0,02	3,71	1,11	3,56	1,08
1:4	0,19 ± 0,04	2,52	0,47	3,68	1,10	0,05 ± 0,01	1,96	2,20	3,45	3,59	0,12 ± 0,02	3,65	0,62	3,51	0,58
1:8	0,14 ± 0,04	1,51	0,26	3,68	0,66	0,05 ± 0,01	1,31	1,46	3,32	3,29	0,08 ± 0,01	3,34	0,36	3,49	0,35
1:16	0,07 ± 0,04	0,96	0,15	3,63	0,38	0,05 ± 0,01	0,72	0,77	2,77	2,31	0,07 ± 0,02	2,77	0,20	3,55	0,20

*: Verdünnung

4.6 Generierung monoklonaler Antikörper

Zur Gewinnung monoklonaler Antikörper wurden drei Zellfusionen unter Verwendung der Hybridom-Technik durchgeführt (3.2.3). Basierend auf den beiden Selektionskriterien, hohe Antikörper-Titer und ausgeprägte Affinitäten der Antiseren, wurden dazu die Mäuse I, II und IV ausgewählt. Das Screening des Zellmaterials hinsichtlich der Produktion von Antikörpern gegen Alicyclobazillen erfolgte zunächst mittels indirekter EIAs, nach der Etablierung eines Sandwich EIA Systems (4.5.1) konnte nachträglich aufgetautes, kryokonserviertes Zellmaterial zusätzlich auch im Sandwich EIA getestet werden. Letztendlich konnten im Verlauf der Untersuchungen 16 mAK-produzierende Hybridomzelllinien selektiert und etabliert werden.

4.7 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

Die Überprüfung der Antikörperproduktivität der generierten Hybridomzelllinien, die Bestimmung der relativen Affinität sowie die Identifizierung der Immunglobulinsubtypen erfolgte mit verschiedenen EIA-Formaten, es wurden dazu sowohl indirekte als auch Sandwich EIAs eingesetzt. Basierend auf den dabei erzielten Ergebnissen wurden zwei mAK für die Massenproduktion bzw. ein mAK für die Herstellung eines Antikörper-Enzymkonjugates ausgewählt. Die Ergebnisse der Isotypisierung sind in Tabelle 4.18 zusammengefasst, insgesamt waren 12 mAK dem Subtyp IgG zuzuordnen, während vier mAK dem Subtyp IgM angehörten.

4.7.1 Indirekter Enzymimmuntest

Indirekte EIAs wurden wie unter 3.2.1.1 sowie 4.4.1/2 beschrieben durchgeführt. Zur Abschätzung der Produktivität der etablierten Hybridomzelllinien wurden Mikrotiterplatten mit einer konstanten Konzentration an Sporen beschichtet und anschließend mit Verdünnungsreihen der zu überprüfenden Zellkulturüberstände (ZKÜ) inkubiert. Als Titer im indirekten EIA wurde diejenige Verdünnungsstufe eines ZKÜ definiert, bei der eine Extinktion von 1,0 erreicht wird. Es zeigte sich, dass die Produktivität der Hybridomzelllinien teilweise deutlich variierte. So konnten Antikörpertiter von 30 (mAK 12E3) bis > 6500 (mAK 4C7 und mAK 3E8) nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

Zur vergleichenden orientierenden Bestimmung der relativen Affinitäten der mAK im indirekten EIA wurde eine Sporenmischung eingesetzt, bestehend aus ungleichen Anteilen der vier zur Immunisierung verwendeten Stämme DSM 2498, MHI 10001, MHI 10002 sowie

MHI 10003. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit Verdünnungsreihen der Sporenmischung beschichtet und anschließend mit den zu überprüfenden ZKÜ (im Überschuss in einer Verdünnung von 1:10 zugegeben) inkubiert. Als Nachweisgrenze (Antigen-Titer) wurde die Verdünnungsstufe des Antigens definiert, bei der noch eine Extinktion von 0,1 erreicht wird. Die Nachweisgrenzen der mAK waren teilweise sehr gering. Insbesondere der mAK 4C7 (Subtyp IgG₁) zeigte unter den Bedingungen des indirekten EIA eine hohe Affinität, mit einer Nachweisgrenze von $5,0 \times 10^2$ Sporen/ml für die eingesetzte Sporenpräparation. Die niedrigsten relativen Affinitäten wurden für mAK 11F9 ermittelt, die Nachweisgrenze lag hierbei bei $4,0 \times 10^5$ Sporen/ml (Tab. 4.18).

Tabelle 4.18: Übersicht zu den wesentlichen Charakteristika der generierten mAK gegen *Alicyclobacillus* Sporen.

Fusion	Zelllinie	Subtyp	Epitop-Spezifität*	EIA-Typ [#]	Nachweisgrenze (KbE/ml)
I Maus I	1H10	IgG ₁	66 kDa	1	$2,2 \times 10^4$
	2C1	IgG ₁	50 kDa	1	$3,4 \times 10^4$
	2F7	IgG ₁	66 kDa	1	$2,0 \times 10^4$
	11C4	IgG ₁	14 kDa	2	$2,0 \times 10^4$
	11F7	IgG ₁	14 kDa	2	$5,0 \times 10^3$
	11F9	IgG _{2a}	50 kDa	1	$4,0 \times 10^5$
	11H11	IgG ₁	14 kDa	2	$5,0 \times 10^3$
	12E3	IgG ₁	-	2	$2,0 \times 10^4$
II Maus IV	3C10	IgM	n. d.	1	$2,0 \times 10^4$
	3E8	IgG _{2a}	66 kDa	1	$5,0 \times 10^3$
III Maus II	4C2	IgG ₁	50 kDa	1	$2,0 \times 10^4$
	4C7	IgG ₁	14 kDa	1	$5,0 \times 10^2$
	4G12	IgM	66 kDa	1	$5,0 \times 10^3$
	4H5	IgG ₁	66 kDa	1	$3,4 \times 10^4$
	32B9	IgM	-	1	$2,0 \times 10^5$
	32F1	IgM	-	2	$1,4 \times 10^5$

* Angegeben sind die apparenten Molekulargewichte der mit den jeweiligen mAK im Immunoblot reaktiven Sporenproteine; -: keine Banden detektierbar; n. d.: nicht durchgeführt

[#] 1: Indirekter EIA; 2: Sandwich EIA

Die Inklusivität der auf den jeweiligen mAK beruhenden indirekten EIAs wurde in weiteren detaillierten Untersuchungen überprüft, wobei hierfür die oben erwähnten Stämme zum Einsatz kamen. Hierbei zeigte sich, dass die Affinitäten für die vier Stämme z. T. deutlich unterschiedlich waren (Abb. 4.23). Beispielsweise wies mAK 4C7 eine hohe Affinität für

DSM 2498, MHI 10001 und MHI 10003 auf, zeigte jedoch keine Reaktivität mit Isolat MHI 10002. MAK 4H5 dagegen reagierte nur mit DSM 2498 und MHI 10001, nicht aber mit den beiden anderen Isolaten MHI 10002 und MHI 10003. Alle anderen überprüften mAK reagierten hingegen im indirekten EIA mit allen untersuchten Stämmen, wobei allerdings die festgestellten Antigen-Titer z. T. deutlich variierten. Eine weitere Charakterisierung der im indirekten EIA reaktiven mAK in Hinblick auf Inklusivität und Exklusivität wurde nicht vorgenommen, da diese wie in 4.7.2 erwähnt nicht im Sandwich EIA einsetzbar waren.

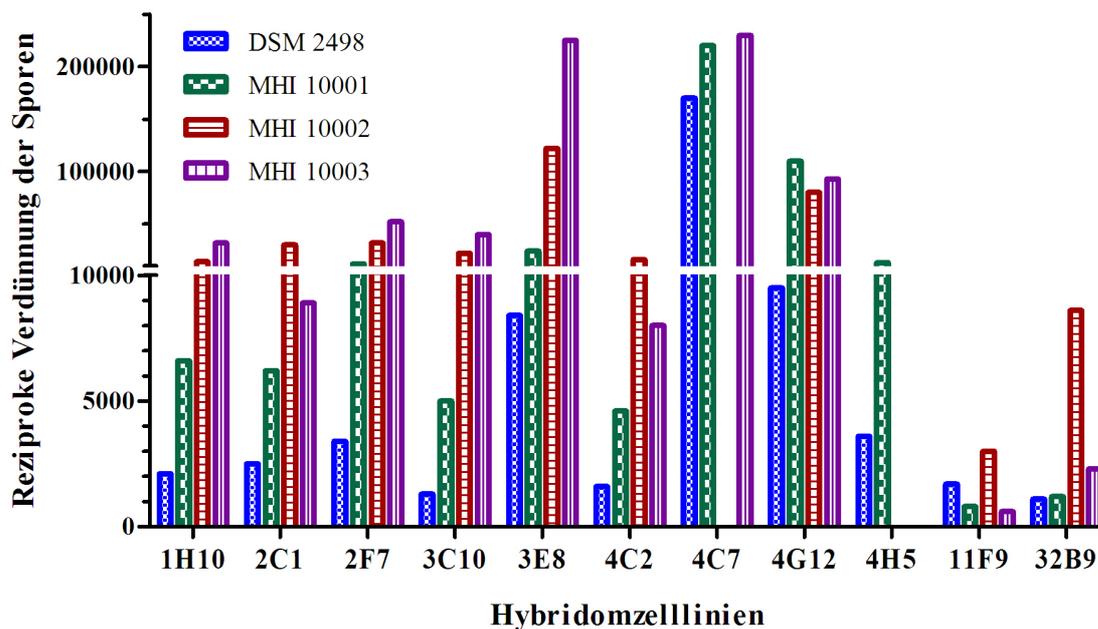


Abbildung 4.23: Relative Affinitäten der in den indirekten EIAs reaktiven mAK für Sporenpräparationen von vier verschiedenen *A. acidoterrestris* Stämmen. Dargestellt sind die im indirekten EIA gemessenen Antigen-Titer (entsprechend einer Extinktion von 1,0).

4.7.2 Sandwich EIA

Alternativ zu indirekten EIAs wurde für das Screening der AK-produzierenden Hybridomzelllinien bzw. zur weiteren Charakterisierung der produzierten mAK in Anlehnung an das unter 4.5.1 beschriebene EIA Verfahren ein Sandwich EIA System (3.2.1.2) etabliert.

Dazu wurden Mikrotiterplatten mit Kaninchen anti-Maus-Immunglobulinen beschichtet. Die Mikrotiterplatten wurden dann zunächst mit antikörperhaltigen ZKÜ und danach mit Sporenmaterial inkubiert. Zur Detektion wurde das unter 4.5 beschriebene, für

Alicyclobazillen spezifische Kaninchenantiserum-HRP-Konjugat eingesetzt.

Bei Einsatz von ZKÜ der Hybridomzelllinien, die vor Etablierung des Sandwich EIA gescreent worden waren, zeigte sich, dass diese keine Reaktivität im Sandwich EIA aufwiesen. Daher wurde aus den Zellfusionen stammendes eingefrorenes Zellmaterial aufgetaut und die resultierenden Zelllinien direkt parallel sowohl mittels indirektem als auch Sandwich EIA auf Antikörperproduktion überprüft. Daraufhin konnten einige Zelllinien etabliert werden, deren Antikörper im Sandwich EIA eingesetzt werden können. Generell war es jedoch nicht möglich, mAK zu generieren, die in beiden EIA-Typen reaktiv waren.

Zur Erstellung von Standardkurven der im Sandwich EIA einsetzbaren mAK (Abb. 4.24) wurden Verdünnungsreihen des Antigens (Sporenpräparationen der als Immunogen eingesetzten Stämme) angelegt. Generell war auffällig, dass maximal Signalintensitäten von ca. 1,0 erzielt werden konnten, unabhängig vom verwendeten mAK sowie Sporengehalt der eingesetzten Präparationen. Die Nachweisgrenzen waren dennoch sehr niedrig und lagen im Sandwich EIA je nach eingesetztem mAK zwischen $1,4 \times 10^5$ Sporen/ml und $5,0 \times 10^3$ Sporen/ml (Tab. 4.18).

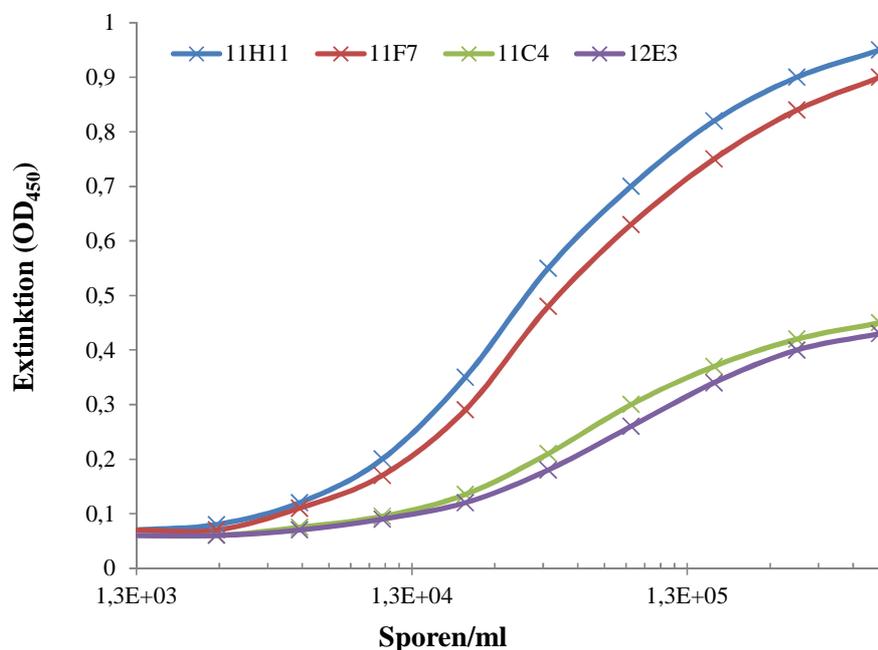


Abbildung 4.24: Im Sandwich EIA erhaltene Standardkurven für eine Sporenmischung von *A. acidoterrestris* (DSM 2498, MHI 10001, 10002 und 10003) bei Verwendung verschiedener mAK als Fangantikörper.

4.7.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Um die Reaktivität der generierten mAK mit Sporen von *A. acidoterrestris* zu überprüfen, wurden analog zu den polyklonalen Antiseren (4.4.3) Immunfluoreszenzversuche, wie unter 3.2.1.3 beschrieben, durchgeführt. Die ZKÜ wurden in Verdünnungen von 1:5 oder 1:10 eingesetzt. Im Gegensatz zu den polyklonalen Antiseren konnte für die mAK jedoch keine Reaktivität mit den Sporen gezeigt werden.

4.7.4 Immunoblots

Zur Bestimmung der Antigen-Spezifität der mAK wurden, wie unter 3.2.1.4 bzw. 3.2.2 beschrieben, Immunoblots durchgeführt. Die antikörperhaltigen ZKÜ bzw. aufgereinigten mAK wurden in Verdünnungen von 1:10 bis 1:40 bzw. in einer Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt. Von 15 untersuchten mAK konnte für 12 mAK eine Reaktivität mit den eingesetzten Präparationen der Oberflächenproteine von Isolat MHI 10003 (bzw. DSM 2498 bei mAK 4H5) nachgewiesen werden (Abb. 4.25). Zwei der nicht-reaktiven Stämme waren dem Subtyp IgM zuzuordnen (32B9 und 32F1), der ebenfalls nicht-reaktive ZKÜ von Hybridomzelllinie 12E3 wies nur geringe Antikörpertiter auf. In Tab. 4.18 sind die relativen Molekulargewichte der sichtbaren Hauptbanden zusammenfassend aufgeführt, diese lagen – wie auch bereits bei den polyklonalen Antiseren festgestellt (4.4.4) – vorzugsweise im Bereich von ca. 14 kDa, 50 kDa bzw. 66 kDa. Vier mAK (4C7, 11H11, 11F7 und 11C4) wiesen eine deutliche Reaktivität mit einem Protein von ca. 14 kDa auf, bei drei mAK (4C2, 11F9, 2C1) lag die reaktive Hauptbande im Bereich von ca. 50 kDa, wobei der Immunoblot bei mAK 11F9 (IgG_{2a}) in einer breiten, undeutlich abgegrenzten Hauptbande resultierte. Weitere fünf mAK (1H10, 2F7, 3E8, 4G12, 4H5) waren hauptsächlich mit einem Protein der Größenordnung 66 kDa reaktiv. Bei einigen mAK konnte zusätzlich zu den Hauptbanden eine geringere Reaktivität mit weiteren Banden beobachtet werden. Beispielsweise traten bei mAK 2C1, 2F7 und 3E8 Nebenbanden mit einem relativen Molekulargewicht von knapp unter 45 kDa auf.

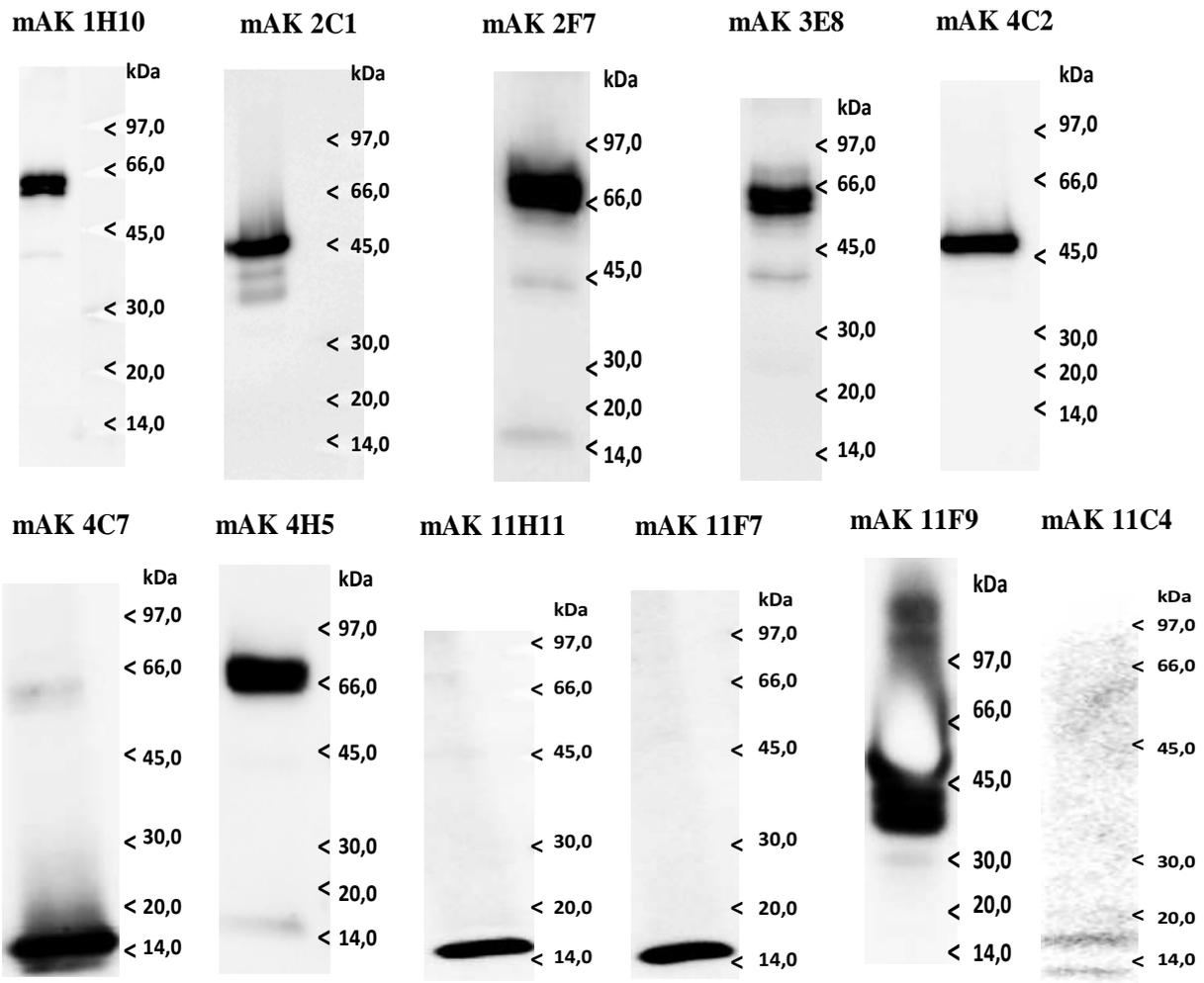


Abbildung 4.25: Analyse der Reaktivität von mAK im Immunoblot mit Oberflächenprotein-Präparationen von Sporen des Isolats MHI 10003 bzw. DSM-Stamm 2498 (mAK 4H5).

4.8 Anwendung der monoklonalen Antikörper

4.8.1 Massenproduktion

Basierend auf den in 4.7 dargestellten Ergebnissen der Charakterisierung der generierten mAK wurden zwei mAK, nämlich 11H11 und 11F7, für die Massenproduktion ausgewählt. Beide weisen eine hohe Affinität für Sporen auf, dies resultierte in einer ausgesprochen niedrigen Nachweisgrenze von $< 10^4$ Sporen/ml im Sandwich EIA. Außerdem gehören sie dem stabilen IgG-Subtyp an und zeigen im Immunoblot eine Spezifität für ein ca. 14 kDa großes Protein.

Die Massenproduktion der mAK erfolgte in miniPerm Bioreaktoren. Die so generierten und mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällten Antikörper wurden anschließend über Protein A affinitätschromatographisch aufgereinigt.

4.8.2 Herstellung Peroxidase-markierter mAK

Um zu überprüfen, ob durch den Einsatz von Peroxidase-markierten mAK als Detektions-AK die Sensitivität der Sandwich EIAs gesteigert werden kann, wurden entsprechende Konjugate hergestellt. Da bei mAK 11H11 das bei den polyklonalen Kaninchenantisera beschriebene Kopplungsverfahren nicht einsetzbar war (unter den in 4.5 beschriebenen Kopplungsbedingungen wurde eine vollständige Inaktivierung des mAK beobachtet), wurde der mAK alternativ mit Hilfe des Lightning-Link HRP Conjugation Kit der Firma Innova Biosciences markiert. Das so generierte Konjugat wurde schließlich mit 1 % (g/v) BSA stabilisiert und mit 0,01 % (g/v) Thimerosal konserviert.

Der Erfolg der Kopplung wurde im EIA überprüft, dabei zeigte sich, dass das 11H11-HRP Konjugat eine ähnlich hohe Reaktivität wie die nicht konjugierten mAK aufwies. Bei einer Verdünnung von 1:250 [in 1 % (g/v) Casein/PBS] konnten optimale Ergebnisse im Sandwich EIA erzielt werden.

4.8.3 Etablierung von mAK-basierten Sandwich EIAs

Nach Massenproduktion, Aufreinigung und Enzymmarkierung des mAK 11H11 war es möglich, zusätzlich zu dem unter 4.5.1 beschriebenen, rein Kaninchenserum-basierten Sandwich EIA Verfahren, zwei weitere auf mAK basierende Sandwich EIA Systeme zu etablieren. Bei beiden Varianten erfolgt eine Kombination des mAK mit Kaninchenserum bzw. Peroxidase-markierten Kaninchenserum (Tab. 4.18): Bei Variante A werden Mikrotiterplatten mit 10 µg/ml des mAK 11H11 als Fangantikörper in PBS beschichtet. Nach Inkubation mit den Sporenpräparationen [Verdünnung in 0,1 % (v/v) Tween/PBS] erfolgt die Zugabe von Kaninchenserum-Enzymkonjugat in einer Verdünnung von 1:500 als Detektionsantikörper. Bei Variante B werden polyklonale Kaninchenantikörper (1:500 Verdünnung) an die feste Phase gebunden. Als Detektionsantikörper findet der Peroxidase-markierte mAK 11H11 [1:250 Verdünnung in 1 % (g/v) Casein/PBS] Verwendung.

Beide EIA-Verfahren wurden eingehend überprüft und wiesen, abhängig von den verwendeten Antigenpräparationen, ähnlich hohe Affinitäten bzw. Nachweisgrenzen für eine Sporenmischung von *A. acidoterrestris* (DSM 2498, MHI 10001, MHI 10002 und MHI 10003) auf, wie das rein Kaninchenserum-basierte Nachweisverfahren. Die Backgroundwerte

der auf mAK 11H11 basierenden EIA-Systeme waren dabei sehr niedrig (0,015 – 0,02), der Leerwert des pAK-basierten Sandwich EIA lag dagegen mit einer Extinktion von 0,05 etwas höher (Tab. 4.19). Generell lagen die ermittelten Nachweisgrenzen dabei, abhängig von den verwendeten Sporenpräparationen, im Bereich von 10^4 Sporen/ml. Es stehen damit drei sensitive EIA-Verfahren zur Detektion von Sporen von *A. acidoterrestris* zur Verfügung.

Tabelle 4.19: Aufbau und Charakteristika verschiedener Sandwich EIA Varianten zum Nachweis von *A. acidoterrestris* Sporen. Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen wurde eine Sporenmischung (DSM 2498, MHI 10001, MHI 10002 und MHI 10003) eingesetzt.

Fang-Antikörper	Detektions-Antikörper	Background ¹	Nachweisgrenze (Sporen/ml)
11H11	Kan AS-HRP	0,015	$1,1 \times 10^4$
Kan AS	11H11-HRP	0,02	$1,0 \times 10^4$
Kan AS	Kan AS-HRP	0,05	$1,7 \times 10^4$

¹: Extinktion des antigenfreien Kontrollansatzes

4.8.3.1 Intra- und Intergenusspezifität

Die Ermittlung der Inklusivität sowie Exklusivität der auf mAK 11H11 basierenden Sandwich EIA Variante (mAK 11H11 & Kaninchenserum-Enzymkonjugat; Tab. 4.19) erfolgte analog zu der unter 4.5.1.1 beschriebenen Vorgehensweise für den Kaninchen-basierten Sandwich EIA. Ausgesprochen niedrige Nachweisgrenzen von $1,0 \times 10^3$ bzw. $2,5 \times 10^3$ Sporen/ml konnten für die als Immunogen eingesetzten Isolate MHI 10003 bzw. MHI 10001 ermittelt werden. Auch alle weiteren untersuchten Isolate von *A. acidoterrestris* konnten nachgewiesen werden (Tab. 4.20), im Vergleich zu dem etablierten rein polyklonalen Kaninchenserum-basierten Sandwich EIA lagen die detektierten Nachweisgrenzen dabei allerdings im Durchschnitt um eine Zehnerpotenz höher, v. a. für die fünf Isolate MHI 10031, MHI 10033, MHI 10050, MHI 10047 sowie MHI 10048 war die Sensitivität vergleichsweise gering ($\geq 2,0 \times 10^5$). Auch bei diesem EIA-System war die Reaktivität völlig unabhängig von der Zugehörigkeit der einzelnen Stämme zu den verschiedenen RAPD Gruppen (4.1.2.4).

Tabelle 4.20: Nachweisgrenzen des auf mAK 11H11 basierenden Sandwich EIA Systems für Sporen der *A. acidoterrestris* Referenzstämme und Isolate.

Nachweisgrenzen (Sporen/ml)	Stamm/ Isolat ¹
1000 - 2500	MHI 10003, MHI 10001
20.000 – 40.000	DSM 3923, MHI 10018, MHI 10023, DSM 2498, MHI 10016, MHI 10025, MHI 10026, MHI 10034, MHI 10037, MHI 10039
50.000 – 90.000	MHI 10017, MHI 10020, MHI 10022, MHI 10024, MHI 10032, DSM 3922, MHI 10015, MHI 10038, MHI 10041, DSM 3924
100.000 – 400.000	MHI 10002, MHI 10019, MHI 10027, MHI 10028, MHI 10029, MHI 10030, MHI 10035, MHI 10042, MHI 10049, MHI 10051, MHI 10053, MHI 10036, MHI 10052, MHI 10061, MHI 10021, MHI 10031, MHI 10033, MHI 10050, MHI 10047, MHI 10048

¹: Reihenfolge: niedrigste zu höchste Reaktivität

Es zeigte sich zudem, dass auch diese EIA-Variante eine hohe Exklusivität aufwies, denn Stämme bzw. Isolate von *A. cycloheptanicus*, *A. acidocaldarius*, *A. sacchari*, *A. fastidiosus* sowie nicht weiter klassifizierten *Alicyclobacillus* spp. Isolaten riefen kein bzw. nur ein sehr geringes Messsignal hervor (Abb. 4.26). Ebenso wie das Kaninchen-basierte Sandwich EIA System weist dieser EIA allerdings eine gewisse Affinität für *A. acidiphilus* auf. Unterschiede in der Reaktivität der beiden Sandwich EIAs bestehen jedoch vor allem für *A. herbarius* (DSM 13609), der im Übrigen in den in 4.1.2.3 beschriebenen Versuchen wie die *A. acidoterrestris*-Isolate als Guajacol-Produzent identifiziert werden konnte. Neben der Intragenus-Spezifität wurde die Intergenus-Spezifität mit Sporen von 30 Stämmen unterschiedlicher *Bacillus* und *Clostridium* spp. (Tab. 4.14) untersucht. Nur für einen Stamm von *B. cereus* war Reaktivität nachweisbar, alle übrigen Stämme reagierten negativ.

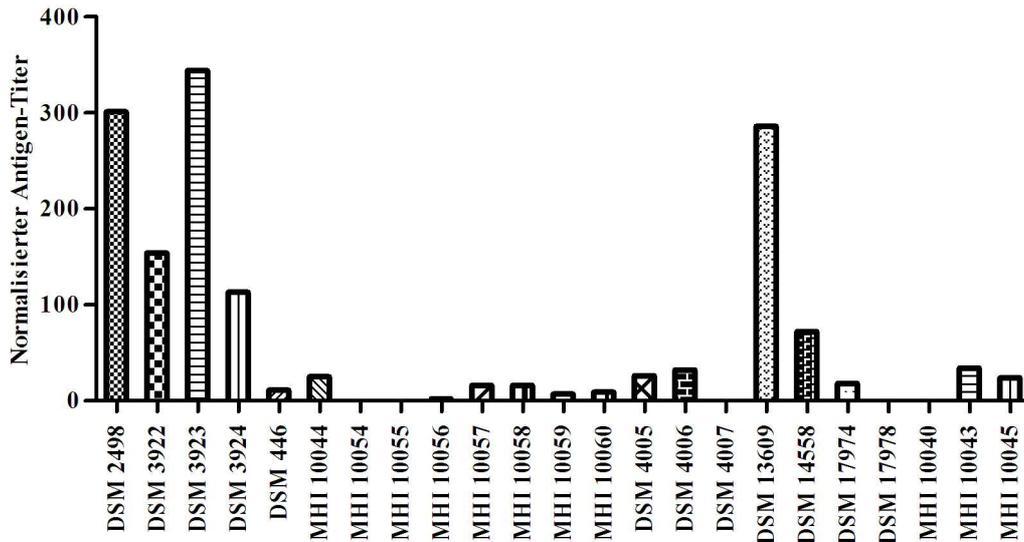


Abbildung 4.26: Reaktivität des auf mAK 11H11 basierenden Sandwich EIA System für verschiedene Spezies innerhalb des Genus *Alicyclobacillus*: *A. acidoterrestris*: DSM 2498, DSM 3922, DSM 3923 und DSM 3924; *A. acidocaldarius*: DSM 446, MHI 10044, MHI 10054, MHI 10055, MHI 10056, MHI 10057, MHI 10058, MHI 10059 und MHI 10060; *A. cycloheptanicus*: DSM 4005, DSM 4006 und DSM 4007; *A. herbarius*: DSM 13609; *A. acidiphilus*: DSM 14588; *A. sacchari*: DSM 17974; *A. fastidiosus*: DSM 17978; *Alicyclobacillus* spp.: MHI 10040, MHI 10043, MHI 10045; Als normalisierter Antigen-Titer wird die reziproke Verdünnung des Antigens – normalisiert anhand der optischen Dichte des untersuchten Sporenpräparats – bezeichnet, anhand derer die jeweilige Nachweisgrenze bestimmt wurde.

V. DISKUSSION

Alicyclobazillen, insbesondere *A. acidoterrestris*, stehen derzeit im Fokus der Fruchtsaftindustrie, da die Verderbserreger ein hohes Schadenspotential besitzen. Sporen der Bakterien können den Pasteurisierungsprozess von Fruchtsäften und anderen sauren Produkten überstehen, später bei geeigneten Bedingungen – v. a. hohe Umgebungstemperaturen – wieder auskeimen, sich vermehren und dann durch Bildung von Fehlparomen (hauptsächlich Guajacol) zum Verderb der Produkte führen. Hierfür reichen schon Sporenzahlen von < 1 Spore/10 ml aus (WALLS & CHUYATE, 2000a). Bisher sind keine praktikablen Methoden zur vollständigen Inaktivierung der bakteriellen Dauerformen in Säften bekannt, daher wären schnelle und zuverlässige Nachweisverfahren zur frühzeitigen Detektion von Kontaminationen wünschenswert. Die bislang von internationalen Fruchtsaftverbänden empfohlenen standardisierten Testmethoden zum Nachweis Fehlparomproduzierender *Alicyclobacillus* spp. basieren auf klassisch-mikrobiologischen Verfahren und sind mitunter sehr langwierig. Ein Nachweis der Mikroorganismen dauert nicht selten mehr als 5 Tage, dabei ist es für die Hersteller teuer und aufwändig, große Mengen an Waren bis zum Erhalt des mikrobiologischen Befundes zurückzuhalten. Warenrückrufe sind ebenfalls mit hohen Kosten für die Unternehmen verbunden und können dem Ruf des betroffenen Herstellers schaden.

Um einen schnelleren Nachweis von Alicyclobazillen zu ermöglichen, wurde bereits eine Vielzahl alternativer, v. a. molekularbiologischer Verfahren entwickelt (2.4.2), die sich jedoch bisher nicht in der Routineanalytik etablieren konnten, da der Einsatz zu aufwändig oder kostenintensiv wäre bzw. die Zuverlässigkeit der Methoden nicht gewährleistet ist. Ein weiterer, vielversprechender Ansatz besteht in der Entwicklung und Anwendung immunchemischer Methoden. Enzymimmuntests sind bereits in vielen Labors etabliert, da sie bei sehr hoher Sensitivität und Spezifität schnell, kostengünstig und mit geringem Geräteaufwand durchführbar sind. Aus diesen Gründen scheint die Entwicklung von EIAs ein sinnvoller Ansatz zu sein, um eine rasche und einfache Detektion von *A. acidoterrestris* in kontaminierten Produkten zu ermöglichen.

5.1 Generierung der Antikörper

Die bisher beschriebenen EIAs für den Nachweis von Alicyclobazillen beruhen auf der Detektion von vegetativen Zellen mittels spezifischer polyklonaler Antiseren (WANG et al., 2012; LI et al., 2013; LI et al., 2014; WANG et al., 2014). Bisher wurden, soweit bekannt, weder mAK zum Nachweis vegetativer Zellen, noch pAK oder mAK zum Nachweis von *Alicyclobacillus* Sporen entwickelt. Vorteil des Nachweises von vegetativen Zellen ist, dass die als Immunogen eingesetzten Bakterienpräparationen vergleichsweise einfach herzustellen sind. Jedoch kann eine Kontamination von z. B. frisch pasteurisierten Säften mit *Alicyclobacillus* Sporen erst nach einer Anreicherung der Proben festgestellt werden, wobei es zu einer Auskeimung der Sporen und Wachstum der vegetativen Zellen kommt. Daher wäre es sinnvoller, über ein Nachweisverfahren zu verfügen, mit dem Sporen, die den Pasteurisierungsprozess überlebt haben, direkt in Proben nachgewiesen werden können. Langfristiges Ziel der im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen ist daher die Entwicklung einer auf spezifischen poly- oder monoklonalen Antikörpern basierenden immunomagnetischen Separations- und Anreicherungs-methode (2.4.2.3) für Sporen von *A. acidoterrestris*, um die oft in geringer Anzahl aber mit hoher Häufigkeit (PETTIPHER et al., 1997; OTEIZA et al., 2011) in Produkten vorkommenden Sporen in kurzer Zeit so weit aufkonzentrieren zu können, dass ein anschließender Nachweis mittels EIA oder PCR möglich wird, so dass auf die zeitintensive kultur-basierte Anreicherung verzichtet werden kann. Zur Realisierung dieses analytischen Konzeptes sollten in der vorliegenden Arbeit die Grundlagen geschaffen werden durch die Generierung von poly- und monoklonalen Antikörpern sowie deren umfassende Charakterisierung im Hinblick auf Affinität und Spezifität für *A. acidoterrestris* Sporen. Des Weiteren sollte die Eignung der jeweiligen Antikörper für die Etablierung von EIAs und deren Einsetzbarkeit zum Nachweis von Alicyclobazillen in Fruchtsäften überprüft werden.

Neben der potentiellen Einsetzbarkeit von Sporen-spezifischen Antikörpern zur Anreicherung von Alicyclobazillen aus Fruchtsäften, könnten – zumindest theoretisch – auf entsprechenden Antikörpern basierende Testverfahren auch eine bessere Inklusivität (Anteil der positiv reagierenden *A. acidoterrestris* Stämme) sowie Exklusivität (Anteil nicht-reaktiver, aber potentiell kreuzreaktiver Nicht-Target Stämme) aufweisen als vergleichbare Assays, die auf gegen vegetative Zellen gerichteten Antikörpern basieren. Dieser Umstand liegt darin begründet, dass Sporen um ein Vielfaches weniger Proteine und damit potentielle Antigene an ihrer Oberfläche exprimieren als vegetative Zellen. Beispielsweise wurde im Hinblick auf die Anzahl von exprimierten Membranproteinen für vegetative Zellen von

B. subtilis eine Größenordnung von mehr als 1000 Einzelproteinen prognostiziert, mehr als 500 dieser Proteine konnten auch tatsächlich bereits identifiziert werden (HAHNE et al., 2008; BECHER et al., 2011). Hingegen wurden als Bestandteil der Sporenhülle von *B. subtilis* bisher < 100 Proteine beschrieben (HENRIQUES & MORAN, 2007; ABHYANKAR et al., 2011), für Sporen von *B. cereus* und *C. difficile* wurden ebenfalls ähnlich geringe Zahlen publiziert (ABHYANKAR et al., 2013). Einige Proteine der Sporenhülle – u. a. viele Enzyme und wichtige Proteine der Sporen-Morphogenese – sind allerdings hochkonserviert, d. h. sie treten als orthologe Proteine bei verschiedenen Sporenbildnern auf. Der weitaus größte Anteil der Hüll-Proteine ist aber Spezies-spezifisch (LAI et al., 2003; HENRIQUES & MORAN, 2007) und eignet sich damit als Target für die Generierung selektiver Antikörper. Dass die Entwicklung von Antikörpern und Etablierung von EIAs zum Nachweis bakterieller Sporen generell möglich ist, konnte wie unter 2.4.2.3 dargestellt bereits in mehreren Arbeiten demonstriert werden (QUINLAN & FOEGEDING, 1998; LAVILLA et al., 2008; TAMBORRINI et al., 2010).

Um die Generierung von Antikörpern gegen Sporen zu ermöglichen, war es nötig, hochreine Sporenpräparationen als Immunogen einzusetzen. Zu diesem Zweck wurden zunächst in orientierenden Versuchen verschiedene Anzucht- und Reinigungsmethoden für die Herstellung von Sporen von *A. acidoterrestris* überprüft. Letztlich konnte ein Verfahren etabliert werden, mit dem es möglich war, zuverlässig und effektiv Sporen zu produzieren. Dieses beinhaltet zunächst die zweitägige Voranreicherung eines Stammes in BAT-Flüssigmedium, gefolgt von Anreicherung und Sporenbildung der Bakterien durch Inkubation auf modifizierten BAT-Agarplatten für 5 d bei 45 °C. Da laut IFU-Methode Nr. 12 eine Sporenbildung von Alicyclobazillen auf BAT-Agar beobachtet werden kann, wurde dieses Nährmedium für die Sporenproduktion ausgewählt. Basierend auf ein von VYAS et al. (2011) für *A. acidocaldarius* Sporen beschriebenes Verfahren konnte nach dem Abernten die Reinheit der Sporenpräparate u. a. durch mehrere Waschschrte und eine Dichtegradientenzentrifugation mit Nycodenz so weit optimiert werden, dass schließlich geeignete Präparate für die Herstellung des Immunogens sowie zur späteren Evaluierung der generierten Antiseren zur Verfügung standen.

Da die generierten Antikörper einen möglichst hohen Prozentsatz an *A. acidoterrestris* Stämmen abdecken sollten, wurden vier *A. acidoterrestris* Stämme unterschiedlicher Provenienz zur Immunisierung ausgewählt. Diese heterogenen Sporenpräparationen setzten sich aus einem Referenzstamm (DSM 2498) sowie drei Lebensmittelisolaten aus der Routineanalytik zusammen (MHI 10001, 10002 und 10003). Sowohl LI et al. (2013) als auch

WANG et al. (2012) setzten dagegen ausschließlich den Referenzstamm DSM 3922 als Immunogen zur Generierung der beschriebenen polyklonalen Kaninchen- bzw. Ratten-antiseren gegen vegetative Zellen von *Alicyclobacillus* ein. Dabei bietet der Einsatz mehrerer Stämme den Vorteil, dass eine breitere Palette verschiedener bakterieller Antigene zur Antikörperproduktion zur Verfügung steht, zudem steigt durch die Verwendung von aktuell aus Lebensmitteln isolierten Stämmen die Wahrscheinlichkeit, dass die generierten Antikörper später tatsächlich mit praxisrelevanten Keimen reaktiv sind.

Um eine Infektion der zu immunisierenden Tiere (Kaninchen und Mäuse) zu vermeiden, wurden die als Immunogen eingesetzten Sporensuspensionen mit einer 2 % (g/v) Lösung des Vernetzungsmittels Paraformaldehyd (PFA) inkubiert und somit inaktiviert. Um die Veränderung immunogener Oberflächenstrukturen der Sporen zu minimieren, wurde die geringste noch vollständig inaktivierende PFA-Konzentration ausgewählt. Von der Arbeitsgruppe um Wang wurden die verwendeten Bakterienpräparationen dagegen durch Erhitzung auf 121 °C für 30 min inaktiviert (WANG et al., 2012). Die Hitzeinaktivierung ist jedoch kritisch zu bewerten, da sie, im Gegensatz zur schonenderen Inaktivierung durch chemische Verfahren, zur umfangreichen Denaturierung von Proteinen und damit zur massiven Veränderung antigener Epitope führen kann (KUBY, 2007).

Die hohe Immunogenität der in den eigenen Untersuchungen hergestellten Präparationen zeigte sich dadurch, dass sowohl in Kaninchen als auch Mäusen unabhängig von verwendetem Adjuvans bzw. der Immunogenzusammensetzung (Öl-in-Wasser bzw. Wasser-in-Öl-Emulsion) hohe spezifische AK-Titer von > 1:50.000 induziert werden konnten. Für die weitere Charakterisierung standen letztlich zwei polyklonale Kaninchenserum sowie insgesamt 16 mAK-produzierende Hybridomzelllinien aus drei Zellfusionen zur Verfügung.

5.2 Charakterisierung der Antikörper & Etablierung von EIAs

Um die umfassende Evaluierung der generierten Antiseren, mAK sowie der etablierten EIAs zum Nachweis von Sporen von *A. acidoterrestris* im Hinblick auf Sensitivität sowie Inklusivität und Exklusivität zu ermöglichen, wurde eine umfangreiche Stammbibliothek, bestehend aus insgesamt 61 Referenzstämmen und Isolaten von *Alicyclobacillus* spp., 42 davon *A. acidoterrestris*, angelegt und in die Untersuchungen einbezogen. Daneben wurden zur Überprüfung der Exklusivität 30 weitere sporenbildende Nicht-*Alicyclobacillus* Stämme mittels EIA analysiert. Um potentiell auftretende unterschiedliche Reaktivitätsmuster der jeweiligen EIAs mit verschiedenen Stämmen von *A. acidoterrestris* beurteilen zu können,

wurden die eingesetzten Stämme ausführlich charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle *A. acidoterrestris* Stämme in der Lage waren Guajacol zu produzieren und damit potentielle Verderbserreger darstellen, sowie dass eine hohe genotypische Variabilität zwischen den verschiedenen untersuchten Stämmen der Stammbibliothek besteht. Bei den in der Arbeitsgruppe um Li entwickelten EIAs zum Nachweis von vegetativen *A. acidoterrestris* wurde mit einer nur aus einem Stamm von *A. acidoterrestris* sowie fünf bzw. sieben Nicht-*Alicyclobacillus* Stämmen bestehenden Stammbibliothek gearbeitet (LI et al., 2013). Die von Wang beschriebenen EIAs wurden mit 12 bzw. 20 verschiedenen *Alicyclobacillus* und 54 bzw. 18 Nicht-*Alicyclobacillus* Stämmen evaluiert (WANG et al., 2012).

Im Rahmen von Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte die spezifische Reaktivität der polyklonalen Kaninchen- und Mäuseantisera mit Sporenpräparationen von *A. acidoterrestris* eindeutig gezeigt werden. Bei parallel untersuchten Negativkontrollen bzw. vegetativen Zellen war hingegen keine Bindung der Antikörper und somit keine Fluoreszenz in den Präparaten nachweisbar. Die Epitop-Spezifität wurde im Immunoblot untersucht, dabei wurde deutlich, dass die Antiseren mit Oberflächenprotein-Präparationen der Sporen reagieren, wobei bei den einzelnen Antiseren teilweise unterschiedliche Reaktivitätsmuster auftraten. Unter Verwendung indirekter EIAs konnte zudem ermittelt werden, dass die spezifischen Seren hochaffin für Sporen von *A. acidoterrestris* waren. Da Sandwich EIAs im Vergleich zu indirekten EIAs im Allgemeinen eine Steigerung der Sensitivität & Spezifität um \geq Faktor 2 - 5 ermöglichen (MCCLANE & STROUSE, 1984; KEMENY et al., 1985) und diese EIA-Variante zudem eine höhere Robustheit gegenüber Probenmatrix-Effekten aufweist, wurde die Etablierung eines solchen Testsystems auch für den Nachweis von *A. acidoterrestris* Sporen angestrebt. Bei diesem EIA können zudem auch mit Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatten in größerer Anzahl vorbereitet und längere Zeit aufbewahrt werden, so dass zu untersuchende Proben ohne Zeitverzögerung direkt eingesetzt werden können.

Der etablierte Sandwich EIA erwies sich als hochsensitiv, die Nachweisgrenzen der eingesetzten Referenzstämme lagen durchschnittlich bei $5,0 \times 10^3$ Sporen/ml, sowie zwischen $2,1 \times 10^3 - 3,8 \times 10^4$ Sporen/ml für die untersuchten Isolate. Nur für ein Isolat (MHI 10047) wurde eine etwas geringere Testsensitivität festgestellt ($5,0 \times 10^5$ Sporen/ml). Mit diesen Resultaten lag der Sandwich EIA im oberen Bereich der bisher für den Nachweis von Alicyclobazillen beschriebenen EIAs. WANG et al. (2012) und LI et al. (2013) erzielten mit indirekten EIAs Testempfindlichkeiten von 10^5 KBE/ml für vegetative Zellen von Alicyclobazillen, sowie von $5,0 \times 10^3$ in einem Sandwich EIA (LI et al., 2014) und 10^3 in einem EIA in Kombination mit immunomagnetischer Separation (WANG et al., 2013a).

Allerdings wurden die Nachweisgrenzen dieser EIAs für *A. acidoterrestris* bzw. *Alicyclobacillus* spp. nur für den zur Immunisierung eingesetzten Referenzstamm DSM 3922 bestimmt, sodass eine Aussagekraft über die tatsächliche Testempfindlichkeit nur eingeschränkt möglich ist. Für andere publizierte EIAs zum Nachweis von *Bacillus* Sporen wurden Nachweisgrenzen von 10^3 bis 10^6 KbE/ml angegeben (HOILE et al., 2007; KUEHN et al., 2009; WANG et al., 2009; TAMBORRINI et al., 2010; GOMEZ DE LA TORRE et al., 2012).

Um die Selektivität des neu etablierten EIA zu überprüfen, wurden umfangreiche Inklusivitäts- und Exklusivitätsstudien ausgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich der EIA neben der hohen Sensitivität ebenfalls durch eine ausgeprägte Inklusivität auszeichnete. Alle 42 Referenzstämme und Isolate von *A. acidoterrestris* konnten detektiert werden. Weder im Hinblick auf die grundsätzliche Reaktivität im Sandwich EIA noch im Hinblick auf die für die jeweiligen Isolate ermittelte Testsensitivität ergaben sich Hinweise darauf, dass die Zuordnung der verschiedenen Stämme zu den einzelnen RAPD-Gruppen einen Einfluss auf die Reaktivität des neu etablierten EIA hatte, obwohl die zur Immunisierung verwendeten Isolate alle der gleichen RAPD-Gruppe (I) angehörten. Nur der ebenfalls eingesetzte DSM-Stamm 2498 war keiner Gruppe zuzuordnen und scheint somit einen variierenden genetischen Background zu haben. Die genetische Variabilität innerhalb der Spezies scheint daher keinen maßgeblichen Einfluss auf die EIA-Nachweisbarkeit von *A. acidoterrestris* Sporen zu haben. Alle vorhandenen Daten deuten somit darauf hin, dass mit dem entwickelten EIA höchstwahrscheinlich ein sehr hoher Prozentsatz der in Produkten zu findenden *A. acidoterrestris* Stämme nachgewiesen werden kann. Diese Ergebnisse untermauern letztlich auch die oben skizzierte Strategie, dass durch den Einsatz einer breiten Palette an verschiedenen Isolaten bei der Immunisierung breit-reaktive Antiseren induziert werden sollten.

Die hohe Exklusivität des Testverfahrens äußerte sich dadurch, dass nur mit jeweils einem Stamm von *A. acidiphilus* sowie *A. cycloheptanicus* eine geringe Reaktivität auftrat, mit den anderen untersuchten Stämmen der verschiedenen *Alicyclobacillus* spp. hingegen keine Reaktivität im Sandwich EIA nachweisbar war. Zudem war keine Kreuzreaktivität mit Sporen von *Bacillus* und *Clostridium* spp. erkennbar, dabei wurde u. a. auch *B. coagulans* eingesetzt, ein ebenfalls thermo-acidophiler Sporenbildner, der „flachsauen“ Verderb in sauren Produkten hervorrufen kann (CHANG & KANG, 2004). Diese Ergebnisse belegen die unter 5.1 aufgestellte Hypothese, dass die gegen Sporen generierten Antiseren eine hohe Spezifität aufweisen sollten, da die meisten Proteine an der Oberfläche der Sporen Spezies-

spezifisch sind (HENRIQUES & MORAN, 2007). Die Reaktivität des EIA für weitere in Fruchtsäften potentiell vorkommende Mikroorganismen, – wie z. B. Milchsäurebakterien, Hefen und Schimmelpilze – wurde aufgrund der geringen genetischen Verwandtschaft zu Alicyclobazillen nicht überprüft, entsprechende Untersuchungen wären allerdings im Hinblick auf eine abschließende Beurteilung der Selektivität des EIA, sowie dessen Einsetzbarkeit zur Untersuchung von Fruchtsäften angezeigt.

Um die generierten 16 mAK zu charakterisieren, wurde zunächst eine Bestimmung der jeweiligen Immunglobulin-Subtypen durchgeführt. MAK vom Subtyp IgG sind erwünscht, da sie sich durch eine höhere Stabilität auszeichnen und sich leichter aufreinigen lassen als mAK vom Subtyp IgM. Diese Charakteristika sind sowohl für einen Einsatz in EIAs als auch für eine Beschichtung magnetischer Partikel im Rahmen einer immunomagnetischen Anreicherung vorteilhaft. In anderen Arbeiten stellte es sich als schwierig heraus, mAK vom IgG-Subtyp gegen bakterielle Sporen zu generieren: beispielsweise konnte WIESCHER (2013) nur zwei mAK vom IgG-Subtyp gegen Sporen von *B. cereus* etablieren, bei KUEHN et al. (2009) wurde nach Immunisierung mit inaktivierten *B. anthracis* Sporen lediglich ein mAK erhalten, dieser gehörte jedoch dem Subtyp IgM an. Im Gegensatz dazu war es in der vorliegenden Arbeit problemlos möglich, mAK vom Subtyp IgG zu generieren. Von den 16 etablierten Hybridomzelllinien produzierten 12 mAK vom Subtyp IgG, während 4 mAK dem Subtyp IgM zuzuordnen waren.

Zur Bestimmung der Epitop-Spezifität der entwickelten mAK wurden Immunoblots mit Oberflächenprotein-Präparationen von *A. acidoterrestris* Sporen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl die polyklonalen Antiseren als auch 12 von 15 untersuchten mAK mit einem ähnlichen Spektrum an Sporen-Proteinen reagierten. Bei den mAK lagen die Molekulargewichte der Zielantigene der jeweiligen Antikörper entweder bei ca. 14 kDa (4 mAK), 50 kDa (3 mAK) oder 66 kDa (5 mAK). Allerdings reagierte kein mAK mit der Bande bei 30 kDa, die mit beiden Kaninchenseren, sowie den Mäuseseren (vor allem Maus III) nachweisbar war. Nur drei mAK waren nicht im Immunoblot reaktiv, von diesen konnten zwei mAK (32B9 und 32F1) dem Subtyp IgM zugeordnet werden. Angaben anderer Autoren zur Reaktivität von Antikörpern mit *Alicyclobacillus* Sporenprotein-Präparationen liegen nicht vor.

STEICHEN et al. (2003) identifizierte ein Protein von ca. 70 kDa (nach Deglykosylierung) als immundominantes Protein des Exosporiums von *B. anthracis*, mit dem 12 von 20 untersuchten mAK reagierten. Außerdem wurden drei Proteine des Exosporiums beschrieben, die in einem Bereich von 43 kDa, 17 kDa sowie 13 kDa lagen und

damit eine ähnliche Größenordnung aufwiesen wie die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Target-Proteine. Im Gegensatz dazu hatte das antigene Protein, das bei WIESCHER (2013) mit einem mAK gegen Sporen von *B. cereus* reagierte, ein Molekulargewicht von 21 kDa. Die Molekulargewichte der bisher für *B. subtilis* und *B. cereus* beschriebenen Proteine der Sporenhülle liegen im Bereich von ca. 6 – 70 kDa, bei *C. difficile* kommen auch Proteine bis zu 95 kDa vor (KIM & SCHUMANN, 2009; ABHYANKAR et al., 2013). Darunter sind einige Proteine, die der oben beschriebenen Größenordnung entsprechen, viele Hüll-Proteine wurden jedoch noch nicht charakterisiert. Bisher ist generell wenig über Oberflächenproteine, bzw. die Oberflächenstruktur von *Alicyclobacillus* Sporen bekannt. Beispielsweise ist unklar, ob ähnlich wie bei *B. cereus* und *B. anthracis* ein Exosporium ausgebildet wird oder ob dieses – wie bei *B. subtilis* – fehlt. Zumindest für *A. tolerans* konnte bei einigen der erstmals elektronenmikroskopisch untersuchten Sporen die Ausbildung eines Exosporiums gezeigt werden (DUDA et al., 2006). Weitere Untersuchungen zu Oberflächenstruktur bzw. -komponenten von Alicyclobazillen – und insbesondere von *A. acidoterrestris* – wären wünschenswert, um gezielt Antikörper gegen immunodominante Proteine herzustellen und für den Nachweis der Sporen einzusetzen.

Ein Charakteristikum der etablierten mAK war, dass in Immunfluoreszenz-Untersuchungen keine Reaktivität mit Sporen von *A. acidoterrestris* nachgewiesen werden konnte. Dieses Phänomen wurde ebenfalls bei mAK gegen *B. cereus* Sporen beschrieben (WIESCHER, 2013), die Ursache für die fehlende Reaktivität konnte in der Arbeit jedoch nicht abschließend geklärt werden. Der Autor postulierte die Hypothese, dass diese eventuell in der mangelnden Präsentation des Zielepitops begründet sein könnte oder dass die mAK mit Proteinen reagieren, die nur locker an die Oberfläche der Sporen angelagert sind und deshalb durch Waschschriffe während der Probenvorbereitung abgewaschen werden. Diese Hypothese konnte durch eigene orientierende Untersuchungen gestützt werden: Dazu wurden Sporenpräparationen steril filtriert, das erhaltene Filtrat wurde dann im direkten Vergleich zu den Original-Sporenpräparationen im indirekten EIA eingesetzt und mit einigen der generierten ZKÜ analysiert. Es zeigte sich, dass insbesondere bei dem gegen ein 14 kDa Protein gerichteten, hochaffinen mAK 4C7 eine starke Reaktivität mit dem sterilen Filtrat auftrat, der entsprechende Antigen-Titer lag nur 20 % unter dem für die Original-Sporenpräparation ermittelten Titer. Andere mAK zeigten ebenfalls eine – wenn auch geringere – Rest-Reaktivität mit den steril filtrierten Ansätzen, diese lag beispielsweise für mAK 3E8 bei ca. 30 %, bzw. für mAK 2F7 bei ca. 20 % (beide reagieren mit einem 66 kDa Protein). Die mAK 4C2 und 2C1 - beide gegen ein 50 kDa Protein gerichtet - reagierten

hingegen nicht mit den sterilen Präparationen. Es ist daher davon auszugehen, dass sich in den steril filtrierten Überständen Proteine befinden, die sich von der Sporenoberfläche ablösen und dann auch für sich alleine im EIA reaktiv sind. Offensichtlich trifft das insbesondere für das antigene Protein mit einem relativen Molekulargewicht im Bereich von ca. 14 kDa, sowie in geringerem Maße für das 66 kDa-Protein zu. Die Reaktivität der mAK mit diesen Proteinen könnte auch erklären, weshalb in den Immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen keine Reaktivität der mAK mit den Sporen zu beobachten war. Diese locker angelagerten Proteine wurden jedoch anscheinend trotz intensiver Waschschriffe bei der Herstellung des Immunogens nicht vollständig abgelöst. WALPER et al. (2012) beschrieb dieses Phänomen ebenfalls für Einzeldomänenantikörper (sdAk) gegen das Protein EA1, das u. a. auf der Sporenoberfläche von *B. anthracis* vorkommt. Bei Erhöhung der Anzahl der Sporen-Waschschriffe nahm die Signalintensität eines auf diesen Antikörpern basierenden EIA zwar kontinuierlich ab, aber nur bis zu einer Anzahl von 5 Waschschriffen. Jeder weitere Waschschriff resultierte in keiner weiteren Reduktion des Meßsignals.

Ähnlich wie die polyklonalen Antiseren zeichneten sich auch die mAK in EIA-Untersuchungen durch hohe Affinitäten für Sporen bzw. Sporenproteine von *A. acidoterrestris* aus. Die Nachweisgrenzen für Sporen der als Immunogen eingesetzten Stämme lagen je nach mAK bei $5,0 \times 10^3$ Sporen/ml – $1,4 \times 10^5$ Sporen/ml im Sandwich EIA, sowie bei $5,0 \times 10^2$ – $4,0 \times 10^5$ Sporen/ml im indirekten EIA (Tab. 4.18). Allerdings blieb unklar, weshalb die etablierten mAK entweder nur im indirekten EIA oder Sandwich EIA reaktiv waren. Von WIESCHER (2013) beschriebene mAK gegen vegetative *B. cereus* wiesen ebenfalls dieses Reaktionsmuster auf. Orientierende Untersuchungen zur Inklusivität zeigten, dass alle im indirekten EIA reaktiven mAK – mit Ausnahme von mAK 4C7 sowie mAK 4H5 - die vier zur Analyse eingesetzten Stämme nachweisen konnten. Die von diesen beiden mAK nicht detektierten Stämme (MHI 10002, bzw. MHI 10003) besitzen wahrscheinlich eine Variation in der Aminosäuresequenz des entsprechenden Epitops des 14 bzw. 66 kDa Proteins. MAK reagieren im Gegensatz zu polyklonalen Antiseren grundsätzlich nur mit einem Epitop auf dem Zielantigen, bei Proteinen sind dies in der Regel nur 4 – 8 Aminosäuren. Variiert diese Sequenz bei verschiedenen Stämmen einer Spezies, so kann dies die Inklusivität eines mAK limitieren. Daher ist die Reaktivität von mAK innerhalb der Spezies oftmals im Vergleich zu polyklonalen Antiseren nur eingeschränkt gewährleistet und kann im äußersten Fall sogar dazu führen, dass ein mAK ausschließlich mit dem Stamm reagiert, der zur Immunisierung eingesetzt wurde (WOLFERTSTETTER, 1999).

5.3 Nachweis von *A. acidoterrestris* in Fruchtsäften

Aufgrund der hohen Sensitivität und Selektivität des auf polyklonalen Kaninchenserum basierenden Testsystems für *A. acidoterrestris* wurde die Anwendung dieses EIA Verfahrens anhand von kontaminierten Saftproben detailliert untersucht. Um den Einsatz des EIA in der Routineanalytik möglichst simpel zu gestalten, sollten Fruchtsaftproben direkt, ohne aufwändige Probenvorbereitung appliziert werden. Fruchtsäfte zeichnen sich jedoch natürlicherweise durch äußerst niedrige pH-Werte aus. Bei direktem Einsatz von Fruchtsaftproben in EIAs kommt es daher, bedingt durch das saure Milieu, zur Beeinträchtigung der eingesetzten Antikörper und damit zur Störung des gesamten EIA. Folgerichtig konnten in orientierenden Versuchen bei Proben mit niedrigen pH-Werten (pH 4 – 6) nur geringe Signalintensitäten im EIA, sowie unspezifische Bindung der Sporen an die Mikrotiterplatten und damit sehr variable, nicht reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Um diese Effekte zu vermeiden, wurden daher die zehnfach in BAT-Bouillon verdünnten Proben (IFU, 2007) mit hochmolarem Phosphatpuffer auf einen pH von 6,5 eingestellt. Mit dieser simplen Vorgehensweise konnten reproduzierbar hohe Signalintensitäten im EIA generiert werden. Es ist besonders hervorzuheben, dass die Sporen vor Applikation im EIA nicht aus der Probe extrahiert werden mussten, sondern unter Verwendung des Sørensen-Puffers direkt eingesetzt werden konnten, ein Beleg für die Robustheit der generierten Antikörper und des etablierten EIA. Im Gegensatz dazu mussten die Proben bei den in der Arbeitsgruppe um Li entwickelten EIAs (LI et al., 2013; LI et al., 2014) vor Einsatz zunächst zur Isolierung der vegetativen Zellen abzentrifugiert und dann in Bicarbonatpuffer gelöst werden.

Um die Einsetzbarkeit des entwickelten EIA für die Routineanalytik zu gewährleisten, sollte das Verfahren für eine Vielzahl von unterschiedlichen Produkten überprüft worden sein. Die bisher publizierten EIAs wurden nur für den Einsatz von Proben aus Apfelsaft bzw. Apfelsaftkonzentrat evaluiert (WANG et al., 2012; LI et al., 2013; WANG et al., 2013a; LI et al., 2014). Alicyclobazillen können aber auch den Verderb diverser anderer Saftsorten verursachen (CHANG & KANG, 2004). Im Rahmen einer umfangreichen Anwendungsstudie wurde das etablierte Testsystem daher anhand einer breiten Palette unterschiedlicher Säfte - Orangen-, Tomaten-, Grapefruit-, Birnen-, weißer Traubensaft sowie klarer und naturtrüber Apfelsaft - evaluiert. Unabhängig von der Fruchtsaftsorte konnten die Bakterien in allen Säften, die künstlich mit Sporen von *A. acidoterrestris* kontaminiert worden waren, bis zu einer Nachweisgrenze von durchschnittlich $1,0 \times 10^4$ Sporen/ml erfolgreich nachgewiesen werden, somit ist die Einsetzbarkeit des entwickelten Testsystems für die Detektion von

Sporen von *A. acidoterrestris* in diesen Säften generell gewährleistet. Darüber hinaus könnte der EIA aber durchaus noch für weitere sensible Produkte wie z. B. Mango- und Pfirsichsaft (OTEIZA et al., 2011) oder isotonische Getränke und Eistee (YAMAZAKI et al., 1996; DUONG & JENSEN, 2000) evaluiert werden.

Dass Bestandteile bestimmter Fruchtsäfte die EIAs nachteilig beeinflussen, zeigte sich darin, dass Birnen-, weißer Trauben- sowie naturtrüber und klarer Apfelsaft relativ hohe maximale Background-Werte (0,2 – > 0,8) aufwiesen, während bei Orangen- Grapefruit- und Tomatensaft nur vergleichsweise geringe Background-Werte von ca. 0,05 detektiert wurden. Trotzdem können auch die betreffenden Saftsorten mit dem etablierten Testsystem untersucht werden, denn der beschriebene Matrixeffekt nahm bei Verdünnung der Proben kontinuierlich ab und lag schon bei 1:16 verdünnten Proben mit Ausnahme des Traubensaftes im Bereich des für den antigenfreien Kontrollansatz üblichen Extinktionsbereiches von $\leq 0,1$. Bei Untersuchung von höher kontaminierten Produkten sind bei dieser Verdünnungsstufe positive von negativen Proben problemlos zu unterscheiden, der Nachweis von geringen Kontaminationen in diesen Produkten könnte jedoch eventuell schwierig sein. Für diese Proben empfiehlt es sich daher, parallel nicht angereicherte Teilproben des Produktes zu analysieren, um den unspezifischen Background gezielt messen zu können.

Um zu zeigen, dass die praktische Anwendbarkeit des Tests für alle evaluierten Saftsorten - auch bei Kontamination mit geringen Sporenzahlen - gewährleistet ist, wurden die Saftproben mit 1 bzw. 10 Sporen/ml des *A. acidoterrestris* DSM-Stamms 2498 bzw. des Isolates MHI 10003 künstlich kontaminiert und nach Anreicherung in Anlehnung an die Methode Nr. 12 (IFU, 2007) nach 24 und 48 h mittels EIA untersucht. Um die Effizienz dieses Versuchsansatzes beurteilen zu können, wurde bewusst zum einen ein Stamm zur Kontamination eingesetzt, der sich durch eine relativ geringe Nachweisgrenze (DSM 2498: $6,25 \times 10^3$ Sporen/ml) sowie hohes Sporulationsvermögen auszeichnete, sowie zum anderen das Isolat MHI 10003, für das der Kaninchenserum-basierte Sandwich EIA deutlich weniger sensitiv war (Nachweisgrenze: $3,5 \times 10^4$ Sporen/ml). Unabhängig vom verwendeten Stamm konnte eine Kontamination mit *A. acidoterrestris* in allen Saftsorten nach 48 h Inkubationszeit zuverlässig nachgewiesen werden. Der Umstand, dass in Orangensaft, Tomatensaft, trübem Apfelsaft und Birnensaft deutlich höhere Messwerte für Isolat MHI 10003 generiert wurden als für die mit DSM 2498 kontaminierten Proben, deutet auf ein deutlich ausgeprägtes unterschiedliches Wachstumsverhalten der beiden zur Kontamination eingesetzten Stämme in speziell diesen Fruchtsaftsorten hin. Prinzipiell ist bekannt, dass bestimmte Inhaltsstoffe von Säften das Wachstum von Alicyclobazillen inhibieren können, das sind beispielsweise in

rotem Traubensaft vorhandene neutrale Phenolverbindungen (CHANG & KANG, 2004). Generell wäre aber auch denkbar, dass innerhalb der Spezies *A. acidoterrestris* Unterschiede in der Verträglichkeit bestimmter Produkt-spezifischer Substanzen bestehen, wodurch das Wachstum einzelner Stämme gehemmt oder begünstigt werden könnte. Von YOKOTA (2007) wurde bereits beschrieben, dass verschiedene Isolate von *A. acidoterrestris* differierende Wachstumsmuster in unterschiedlichen Säften (Orangen-, Zitronen- und Grapefruitsaft) aufwiesen.

Bei nur 24 stündiger Inkubation war in keinem Ansatz der Nachweis von *A. acidoterrestris* Sporen mittels EIA möglich, wahrscheinlich ist dies zum einen auf die zu diesem Zeitpunkt geringen Keimzahlen – in Vorversuchen wurden $< 10^3 - 1,3 \times 10^4$ KbE/ml ermittelt – sowie zum anderen auch auf einen noch zu geringen Anteil sporulierter Zellen zurückzuführen. Im Vergleich dazu konnten mit dem von der Arbeitsgruppe um LI entwickelten indirekten und Sandwich EIA (LI et al., 2013; LI et al., 2014) mit 1 KbE/ml *A. acidoterrestris* kontaminierte Proben schon nach 12 h, sowie mit dem von WANG et al. (2013a) beschriebenen IMS-EIA nach 24 h als positiv detektiert werden. Ursächlich für den früher möglichen Nachweis ist wahrscheinlich, dass das Target dieser EIAs vegetative Zellen sind. Da zudem in diesen Versuchen die Proben mit vegetativen Zellen und nicht – wie in der vorliegenden Arbeit – mit Sporen inokuliert worden waren, fällt zum einen die für die Auskeimung der Sporen nötige Zeit weg, zum anderen ist nach Wachstum der vegetativen Zellen keine zusätzliche Sporenbildung nötig, um den Nachweis im EIA zu ermöglichen. Ein weiterer Faktor ist möglicherweise, dass die Inkubation der Proben bei LI und WANG unter Schütteln erfolgte, wodurch ein schnelleres Wachstum der Bakterien möglich ist. Eine Schüttel-Inkubation von Proben ist in IFU-Methode Nr. 12 - die in der vorliegenden Arbeit als Orientierung diente - allerdings nicht vorgesehen.

Auch für die generierten mAK waren orientierende Versuche zur Einsetzbarkeit der darauf basierenden EIA Systeme zum Nachweis von *A. acidoterrestris* Sporen in Fruchtsaftproben vielversprechend (nicht dargestellt): unter Einsatz von mAK 11H11 und 11F7 im Sandwich EIA sowie mAK 4C7 bzw. mAK 3E8 in indirekten EIAs konnten mit Sporen kontaminierte Orangensaftproben nachgewiesen werden. Die Etablierung von auf mAK basierenden Testsystemen zum direkten Nachweis von Sporen von *A. acidoterrestris* in Fruchtsäften scheint daher möglich und steht aufgrund der Re- und Massenproduzierbarkeit der mAK im Fokus zukünftiger Arbeiten.

Zusammenfassend ermöglichen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten poly- und monoklonalen Antikörper sowie die damit etablierten immunchemischen Verfahren zum ersten Mal den Nachweis von Sporen des für die Fruchtsaftindustrie wirtschaftlich äußerst bedeutsamen Verderbserregers *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Die mit einer umfassend charakterisierten Stammbibliothek untersuchte, ausgesprochen hohe Sensitivität sowie Selektivität der etablierten Testsysteme legen nahe, dass Antikörper gegen Sporen eine vielversprechende Alternative für Antikörper gegen vegetative Zellen sind. Die generelle Praxistauglichkeit des entwickelten auf polyklonalen Antikörpern basierenden Sandwich EIA konnte unter Einbeziehung verschiedenster Saftsorten gezeigt werden.

Mittelfristig stehen damit Antikörper zur Verfügung, die zur Entwicklung von Anreicherungsverfahren wie z. B. immunomagnetischer Separation eingesetzt werden können und damit langwierige kultur-basierte Anreicherungsverfahren vermeiden würden. Der bereits etablierte pAK-basierte Sandwich EIA könnte dann im Anschluss zur Detektion der angereicherten Sporen verwendet werden. Weiterhin wäre es denkbar, die spezifischen Antikörper für die Entwicklung von hochsensitiven Immuno-PCRs einzusetzen. Mit Hilfe dieser Techniken könnte die Nachweisgrenze für Sporen von *A. acidoterrestris* weiter deutlich reduziert werden, so dass der Fruchtsaftindustrie letztlich das dringend benötigte schnelle, einfache und zuverlässige Verfahren für den Nachweis von Kontaminationen mit *A. acidoterrestris* zur Verfügung stünde.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die acidophilen und thermoresistenten Sporenbildner des Genus *Alicyclobacillus* spielen aufgrund der Bildung von Fehlpararomen eine wichtige Rolle als Verderbserreger von Fruchtsäften, wobei dem Guajacol-produzierenden *A. acidoterrestris* eine besondere Bedeutung zukommt. Um den einfachen, schnellen und zuverlässigen Nachweis von *A. acidoterrestris* Sporen in verschiedenen Fruchtsäften zu ermöglichen, sollten erstmals spezifische poly- und monoklonale Antikörper (pAK und mAK) entwickelt und darauf basierend hochsensitive und selektive immunchemische Nachweisverfahren etabliert werden.

Um eine umfassende und verlässliche Charakterisierung der entwickelten Antikörper zu gewährleisten, wurde eine *Alicyclobacillus* spp. Stammbibliothek (n = 61) aufgebaut. Die Identifizierung der Isolate erfolgte nach mikrobiologischen Kriterien sowie mittels Real-Time PCR, RAPD-Analysen dienten zur weiteren Differenzierung. Ein Pool aus vier verschiedenen, mittels Paraformaldehyd inaktivierten *A. acidoterrestris* Stämmen wurde zur Immunisierung von Kaninchen und Mäusen verwendet. Die spezifische Bindung der induzierten pAK an die Sporen konnte mittels Immunfluoreszenz bestätigt werden.

Basierend auf den generierten polyklonalen Kaninchenserum wurde ein sensitiver Sandwich Enzymimmuntest (EIA) aufgebaut, die Nachweisgrenzen lagen bei durchschnittlich $5,0 \times 10^3$ Sporen/ml für die DSM-Referenzstämme, sowie $2,1 \times 10^3 - 3,8 \times 10^4$ Sporen/ml für die untersuchten 38 *A. acidoterrestris* Isolate. Unter Verwendung der Stammbibliothek und weiterer aerober sowie anaerober Sporenbildner konnte die hohe Inklusivität sowie Exklusivität des Verfahrens bestätigt werden: Alle *A. acidoterrestris* Stämme wurden als positiv erkannt, während die meisten anderen *Alicyclobacillus* spp. Stämme, sowie die Vertreter von Nicht-Alicyclobazillen keine Reaktivität zeigten.

Anwendungsstudien zeigten die Einsetzbarkeit des pAK-basierten EIA für den direkten Nachweis von Sporen in verschiedenen Fruchtsäften. Nach 48 stündiger Anreicherung der in BAT-Bouillon verdünnten und mit 1 Spore/ml künstlich kontaminierten Proben bei 45 °C konnte in allen untersuchten Fruchtsaftsorten reproduzierbar und zuverlässig *A. acidoterrestris* nachgewiesen werden.

Auch die 16 generierten mAK reagierten entweder in indirekten oder Sandwich EIAs z. T. hochaffin mit Sporen von *A. acidoterrestris*, mit Nachweisgrenzen von $5,0 \times 10^2 - 4,0 \times 10^5$ Sporen/ml. Ein etablierter mAK-basierter Sandwich EIA wies eine hohe Inklusivität und Exklusivität auf. Mittels Immunoblot konnte für 12 mAK eine ausgeprägte Reaktivität mit Sporenproteinen gezeigt werden, die reaktiven Banden lagen bei ca. 14, 50 bzw. 66 kDa.

VII. SUMMARY

Detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit juices: generation and characterization of poly- and monoclonal antibodies

The acidophilic and thermophilic spore formers of the genus *Alicyclobacillus* play an important role as spoilage microorganisms in fruit juices due to their ability to produce off-flavors, with the guaiacol-producing *A. acidoterrestris* being of utmost relevance. To facilitate the simple, rapid and reliable detection of *A. acidoterrestris* spores in various fruit juices, for the first time, specific poly- and monoclonal antibodies (pAb and mAb) should be developed and used to establish highly sensitive and selective antibody-based detection methods.

To enable the comprehensive and reliable characterization of the generated antibodies, a collection of *Alicyclobacillus* strains (n = 61) was created. Identification of the isolates was accomplished by microbiological techniques as well as by real-time PCR, RAPD analyses were used for further differentiation. A pool of four different, paraformaldehyde-inactivated *A. acidoterrestris* strains was employed for the immunization of rabbits and mice. The specific binding of the induced pAb to spores could be confirmed by immunofluorescence.

Based on the developed polyclonal rabbit antisera a sensitive sandwich enzyme immunoassay (EIA) was established, limits of detection were approximately 5.0×10^3 spores/ml for the DSM reference strains and ranged from 2.1×10^3 – 3.8×10^4 spores/ml for the evaluated 38 isolates of *A. acidoterrestris*. The high inclusivity and exclusivity of the EIA system could be corroborated by analyzing the *Alicyclobacillus* collection and other aerobic and anaerobic spore formers: All *A. acidoterrestris* strains were detected positive, whereas most of the other *Alicyclobacillus* spp. as well as the non-*Alicyclobacillus* strains showed no reactivity.

Performance studies demonstrated the applicability of the pAb-based EIA for the direct detection of spores in a variety of fruit juices. After incubation of the samples - diluted in BAT broth and contaminated artificially with 1 spore/ml – for 48 h at 45 °C, *A. acidoterrestris* spores could be detected reliably and reproducibly in all tested fruit juice types.

Furthermore, the generated 16 mAb showed high affinities for spores of *A. acidoterrestris* either in indirect or sandwich EIAs, with detection limits of 5.0×10^2 – 4.0×10^5 spores/ml. High inclusivity and exclusivity values were determined for an established mAb-based sandwich EIA. Immunoblot assays illustrated the distinct reactivity of 12 mAb with spore proteins, the reactive bands had apparent molecular weights of 14, 50 and 66 kDa.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abad A, Moreno MJ, Montoya A. A monoclonal immunoassay for carbofuran and its application to the analysis of fruit juices. *Analytica Chimica Acta* 1997; 347: 103-10.

Abhyankar W, Ter Beek A, Dekker H, Kort R, Brul S, de Koster CG. Gel-free proteomic identification of the *Bacillus subtilis* insoluble spore coat protein fraction. *Proteomics* 2011; 11: 4541-50.

Abhyankar W, Hossain AH, Djajasaputra A, Permponpattana P, Ter Beek A, Dekker HL, Cutting SM, Brul S, de Koning LJ, de Koster CG. In pursuit of protein targets: Proteomic characterization of bacterial spore outer layers. *Journal of Proteome Research* 2013; 12: 4507-21.

Albuquerque L, Rainey FA, Chung AP, Sunna A, Nobre MF, Grote R, Antranikian G, da Costa MS. *Alicyclobacillus hesperidum* sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of Sao Miguel in the Azores. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2000; 50: 451-7.

Bahceci KS, Gokmen V, Acar J. Formation of guaiacol from vanillin by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice: a model study. *European Food Research and Technology* 2005; 220: 196-9.

Bahceci KS, Acar J. Determination of guaiacol produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by using HPLC and spectrophotometric methods, and mathematical modeling of guaiacol production. *European Food Research and Technology* 2007; 225: 873-8.

Bakthavathsalam P, Rajendran VK, Saran U, Chatterjee S, Ali BMJ. Immunomagnetic nanoparticle based quantitative PCR for rapid detection of *Salmonella*. *Microchimica Acta* 2013; 180: 1241-8.

Becher D, Buttner K, Moche M, Hessling B, Hecker M. From the genome sequence to the protein inventory of *Bacillus subtilis*. *Proteomics* 2011; 11: 2971-80.

Bender GR, Marquis RE. Spore heat resistance and specific mineralization. *Applied and Environmental Microbiology* 1985; 50: 1414-21.

Bergere JL, Favreau B. Immunodetection of spores of *Clostridium tyrobutyricum* as butyric swelling of cheese. *Sciences Des Aliments* 1987; 7: 89-98.

Bevilacqua A, Sinigaglia M, Corbo MR. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: New methods for inhibiting spore germination. *International Journal of Food Microbiology* 2008; 125: 103-10.

Blake MR, Weimer BC. Immunomagnetic detection of *Bacillus stearothermophilus* spores in food and environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 1997; 63: 1643-6.

Brigmon RL, Zam SG, Wilson HR. Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs and chicken with enzyme-linked-immunosorbent assay. *Poultry Science* 1995; 74: 1232-6.

Cai R, Li D, Yuan Y, Wang Z, Guo C, Liu B, Yue T. Extraction, partial purification and characterization of vanillic acid decarboxylase from *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3923. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2015a; doi: 10.1002/jsfa.7455. [Epub ahead of print].

Cai R, Yuan Y, Wang Z, Guo C, Liu B, Liu L, Wang Y, Yue T. Precursors and metabolic pathway for guaiacol production by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *International Journal of Food Microbiology* 2015b; 214: 48-53.

Cerny G, Hennlich W, Poralla K. Spoilage of fruit juice by Bacilli - isolation and characterization of the spoiling microorganism. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 1984; 179: 224-7.

Chang S, Kang DH. Development of novel *Alicyclobacillus* spp. isolation medium. *Journal of applied microbiology* 2005; 99: 1051-60.

Chang SS, Kang DH. *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: History, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Critical Reviews in Microbiology* 2004; 30: 55-74.

Chang SS, Park SH, Kang DH. Development of novel agar media for isolating guaiacol producing *Alicyclobacillus* spp. International Journal of Food Microbiology 2013; 164: 1-6.

Chen J, Ma XY, Yuan YW, Zhang W. Sensitive and rapid detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* using loop-mediated isothermal amplification. Journal of the Science of Food and Agriculture 2011; 91: 1070-4.

Connor CJ, Luo HL, Gardener BBM, Wang HH. Development of a real-time PCR-based system targeting the 16S rRNA gene sequence for rapid detection of *Alicyclobacillus* spp. in juice products. International Journal of Food Microbiology 2005; 99: 229-35.

Darland G, Brock T. *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. Journal of General Microbiology 1971; 67: 9-15.

De Rosa M, Gambacorta A, Minale L, Bu'Lock JD. Cyclohexane fatty acids from a thermophilic bacterium. Chemical Communications (Journal of the Chemical Society Section D) 1971; 21: 1334.

Deinhard G, Blanz P, Poralla K, Altan E. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. Systematic and Applied Microbiology 1987a; 10: 47-53.

Deinhard G, Saar J, Krischke W, Poralla K. *Bacillus cycloheptanicus* sp. nov., a new thermoacidophile containing omega-cycloheptane fatty acids. Systematic and Applied Microbiology 1987b; 10: 68-73.

Dewey FM, Ebeler SE, Adams DO, Noble AC, Meyer UM. Quantification of *Botrytis* in grape juice determined by a monoclonal antibody-based immunoassay. American Journal of Enology and Viticulture 2000; 51: 276-82.

Duda VI, Suzina NE, Severina LO, Bogdanova TI, Tsaplina IA, Karavaiko GI. Ultrastructural organization of *Alicyclobacillus tolerans* strain K1(T) cells. Archives of Microbiology 2006; 185: 63-8.

Dufresne S, Bousquet J, Boissinot M, Guay R. *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing, gram-positive, spore-forming bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1996; 46: 1056-64.

Duong HA, Jensen N. Spoilage of iced tea by *Alicyclobacillus*. *Food Australia* 2000; 52: 292.

Eiroa MNU, Junqueira VCA, Schmidt FL. *Alicyclobacillus* in orange juice: Occurrence and heat resistance of spores. *Journal of Food Protection* 1999; 62: 883-6.

From C, van der Voort M, Abee T, Granum PE. Characterization of a spore-specific protein of the *Bacillus cereus* group. *Fems Microbiology Letters* 2012; 331: 152-9.

Funes-Huacca M, Regitano LCD, Mueller O, Carrilho E. Semiquantitative determination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice by reverse-transcriptase polymerase chain reaction and capillary electrophoresis - laser induced fluorescence using microchip technology. *Electrophoresis* 2004; 25: 3860-4.

Galikowska E, Kunikowska D, Tokarska-Pietrzak E, Dziadziuszko H, Los JM, Golec P, Wegrzyn G, Los M. Specific detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* strains by using ELISA with bacteriophages as recognition agents. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2011; 30: 1067-73.

Glaeser SP, Falsen E, Martin K, Kampferl P. *Alicyclobacillus consociatus* sp. nov., isolated from a human clinical specimen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2013; 63: 3623-7.

Gocmen D, Elston A, Williams T, Parish M, Rouseff RL. Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS. *Letters in Applied Microbiology* 2005; 40: 172-7.

Gomez de la Torre TZ, Ke R, Mezger A, Svedlindh P, Stromme M, Nilsson M. Sensitive detection of spores using volume-amplified magnetic nanobeads. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 2012; 8: 2174-7.

Goto K, Matsubara H, Mochida K, Matsumura T, Hara Y, Niwa M, Yamasato K. *Alicyclobacillus herbarius* sp. nov., a novel bacterium containing omega-cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002a; 52: 109-13.

Goto K, Mochida K, Asahara M, Suzuki M, Yokota A. Application of the hypervariable region of the 16S rDNA sequence as an index for the rapid identification of species in the genus *Alicyclobacillus*. *Journal of General and Applied Microbiology* 2002b; 48: 243-50.

Goto K, Mochida K, Asahara M, Suzuki M, Kasai H, Yokota A. *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess omega-alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003; 53: 1537-44.

Goto K, Mochida K, Kato Y, Asahara M, Fujita R, An SY, Kasai H, Yokota A. Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangiidus* sp. nov., *Alicyclobacillus sacchari* sp. nov. and *Alicyclobacillus shizuokensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; 57: 1276-85.

Goto K, Nishibori A, Wasada Y, Furuhashi K, Fukuyama M, Hara M. Identification of thermo-acidophilic bacteria isolated from the soil of several Japanese fruit orchards. *Letters in Applied Microbiology* 2008; 46: 289-94.

Gouws PA, Gie L, Pretorius A, Dhansay N. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rDNA from mango juice and concentrate. *International Journal of Food Science and Technology* 2005; 40: 789-92.

Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. *Applied and Environmental Microbiology* 1998; 64: 3153-8.

Groenewald WH, Gouws PA, Witthuhn RC. Isolation and identification of species of *Alicyclobacillus* from orchard soil in the Western Cape, South Africa. *Extremophiles* 2008; 12: 159-63.

Groenewald WH, Gouws PA, Witthuhn RC. Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Food Microbiology* 2009; 26: 71-6.

Guo X, You XY, Liu LJ, Zhang JY, Liu SJ, Jiang CY. *Alicyclobacillus aeris* sp. nov., a novel ferrous- and sulfur-oxidizing bacterium isolated from a copper mine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; 59: 2415-20.

Hahne H, Wolff S, Hecker M, Becher D. From complementarity to comprehensiveness - targeting the membrane proteome of growing *Bacillus subtilis* by divergent approaches. *Proteomics* 2008; 8: 4123-36.

Hearty S, Leonard P, Quinn J, O'Kennedy R. Production, characterisation and potential application of a novel monoclonal antibody for rapid identification of virulent *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods* 2006; 66: 294-312.

Henriques AO, Moran CP. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annual Review of Microbiology* 2007; 61: 555-88.

Hippchen B, Roll A, Poralla K. Occurrence in soil of thermo-acidophilic Bacilli possessing omega-cycloheptane fatty acids and hopanoids. *Archives of Microbiology* 1981; 129: 53-5.

Hiraishi A, Inagaki K, Tanimoto Y, Iwasaki M, Kishimoto N, Tanaka H. Phylogenetic characterization of a new thermoacidophilic bacterium isolated from hot springs in Japan. *Journal of General and Applied Microbiology* 1997; 43: 295-304.

Hoile R, Yuen M, James G, Gilbert GL. Evaluation of the rapid analyte measurement platform (RAMP) for the detection of *Bacillus anthracis* at a crime scene. *Forensic Science International* 2007; 171: 1-4.

Horak D, Babic M, Mackova H, Benes MJ. Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations. *Journal of Separation Science* 2007; 30: 1751-72.

IFU (2007). Method on the Detection of Taint Producing *Alicyclobacillus* in Fruit Juices. Method No. 12. International Federation of Fruit Juice Producers. Pp. 1-11.

Imperio T, Viti C, Marri L. *Alicyclobacillus pohliae* sp. nov., a thermophilic, endospore-forming bacterium isolated from geothermal soil of the north-west slope of Mount Melbourne (Antarctica). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2008; 58: 221-5.

Jensen N. *Alicyclobacillus* - a new challenge for the food industry. *Food Australia* 1999; 51: 33-6.

Jensen N. *Alicyclobacillus* in Australia. *Food Australia* 2000; 52: 282-5.

Jensen N, Whitfield FB. Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. *Letters in Applied Microbiology* 2003; 36: 9-14.

Jiang CY, Liu Y, Liu YY, You XY, Guo X, Liu SJ. *Alicyclobacillus ferrooxydans* sp. nov., a ferrous-oxidizing bacterium from solfataric soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2008; 58: 2898-903.

Kannenbergh E, Blume A, Poralla K. Properties of omega-cyclohexane fatty acids in membranes. *Febs Letters* 1984; 172: 331-4.

Karavaiko GI, Bogdanova TI, Tourova TP, Kondrat'eva TF, Tsaplina IA, Egorova MA, Krasil'nikova EN, Zakharchuk LM. Reclassification of '*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. *thermotolerans*' strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Dufresne et al. 1996 as *Alicyclobacillus disulfidooxidans* comb. nov., and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005; 55: 941-7.

Kemeny DM, Urbanek R, Samuel D, Richards D. Increased sensitivity and specificity of a sandwich ELISA for measurement of IgE antibodies. *Journal of Immunological Methods* 1985; 78: 217-26.

Kim J, Schumann W. Display of proteins on *Bacillus subtilis* endospores. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2009; 66: 3127-36.

Komitopoulou E, Boziaris IS, Davies EA, Delves-Broughton J, Adams MR. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *International Journal of Food Science and Technology* 1999; 34: 81-5.

Krischke W, Poralla K. Properties of *Bacillus acidocaldarius* mutants deficient in omega-cyclohexyl fatty acid biosynthesis. *Archives of Microbiology* 1990; 153: 463-9.

Kuby J, Kindt, T., Goldsby, R. A., Osborne B. A. (2007) *Immunology*. Sara Tenney, W.H. Freeman and Company, New York.

Kuehn A, Kovac P, Saksena R, Bannert N, Klee SR, Ranisch H, Grunow R. Development of antibodies against anthrose tetrasaccharide for specific detection of *Bacillus anthracis* spores. *Clinical and Vaccine Immunology* 2009; 16: 1728-37.

Kumar BK, Raghunath P, Devegowda D, Deekshit VK, Venugopal MN, Karunasagar I, Karunasagar I. Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA for the rapid detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *International Journal of Food Microbiology* 2011; 145: 244-9.

Kumar R, Surendran PK, Thampuran N. Evaluation of culture, ELISA and PCR assays for the detection of *Salmonella* in seafood. *Letters in Applied Microbiology* 2008; 46: 221-6.

Kusube M, Sugihara A, Moriwaki Y, Ueoka T, Shimane Y, Minegishi H. *Alicyclobacillus cellulosityticus* sp. nov., a thermophilic, cellulolytic bacterium isolated from steamed Japanese cedar chips from a lumbermill. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2014; 64: 2257-63.

Lai EM, Phadke ND, Kachman MT, Giorno R, Vazquez S, Vazquez JA, Maddock JR, Driks A. Proteomic analysis of the spore coats of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* 2003; 185: 1443-54.

Lavilla M, de Luis R, Conesa C, Perez MD, Calvo M, Sanchez L. Production of polyclonal antibodies against spores of *Clostridium tyrobutyricum*, a contaminant affecting the quality of cheese: characterisation of the immunodominant protein. *Food and Agricultural Immunology* 2008; 19: 77-91.

Lavilla M, Moros M, Puertas S, Grazu V, Perez MD, Calvo M, de la Fuente JM, Sanchez L. Specific peptides as alternative to antibody ligands for biomagnetic separation of *Clostridium tyrobutyricum* spores. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012; 402: 3219-26.

Li JK, Xia K, Yu CZ. Detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate by enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Control* 2013; 30: 251-4.

Li JK, Huang RR, Xia K, Liu L. Double antibodies sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate. *Food Control* 2014; 40: 172-6.

Luo H, Yousef AE, Wang HH. A real-time polymerase chain reaction-based method for rapid and specific detection of spoilage *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. *Letters in Applied Microbiology* 2004; 39: 376-82.

Ma K, Deng Y, Bai Y, Xu DX, Chen E, Wu HJ, Li BM, Gao LJ. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in fresh pork using a multiplex real-time PCR assay based on immunomagnetic separation. *Food Control* 2014; 42: 87-93.

Maldonado MC, Belfiore C, Navarro AR. Temperature, soluble solids and pH effect on *Alicyclobacillus acidoterrestris* viability in lemon juice concentrate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2008; 35: 141-4.

Matsubara H, Goto K, Matsumura T, Mochida K, Iwaki M, Niwa M, Yamasato K. *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, omega-alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002; 52: 1681-5.

McClane BA, Strouse RJ. Rapid detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology* 1984; 19: 112-5.

McIntyre S, Ikawa JY, Parkinson N, Haglund J, Lee J. Characteristics of an acidophilic *Bacillus* strain isolated from shelf-stable juices. *Journal of Food Protection* 1995; 58: 319-21.

Merle J, Montville TJ. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: the organism, the challenge, potential interventions. *Journal of Food Processing and Preservation* 2014; 38: 153-8.

Molva C, Baysal AH. Effect of sporulation medium on wet-heat resistance and structure of *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922-type strain spores and modeling of the inactivation kinetics in apple juice. *International Journal of Food Microbiology* 2014; 189: 82-8.

Mousing J, Jensen PT, Halgaard C, Bager F, Feld N, Nielsen B, Nielsen JP, Bech-Nielsen S. Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in danish slaughter swine herds. *Preventive Veterinary Medicine* 1997; 29: 247-61.

Murakami M, Tedzuka H, Yamazaki K. Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH. *Food Microbiology* 1998; 15: 577-82.

Murray MB, Gurtler JB, Ryu JH, Harrison MA, Beuchat LR. Evaluation of direct plating methods to enumerate *Alicyclobacillus* in beverages. *International Journal of Food Microbiology* 2007; 115: 59-69.

Najafi R, Mukherjee S, Hudson J, Sharma A, Banerjee P. Development of a rapid capture-cum-detection method for *Escherichia coli* O157 from apple juice comprising nano-immunomagnetic separation in tandem with surface enhanced Raman scattering. *International Journal of Food Microbiology* 2014; 189: 89-97.

Nakano C, Takahashi N, Tanaka N, Okada S. *Alicyclobacillus dauci* sp. nov., a slightly thermophilic, acidophilic bacterium isolated from a spoiled mixed vegetable and fruit juice product. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2015; 65: 716-22.

Nicolaus B, Lama L, Gambacorta A. (2002) Thermophilic *Bacillus* isolates from Antarctic environments. Blackwell Science Publ, Oxford. 47-63.

Niwa M. Control of hazardous bacteria in acidic beverages by using a guaiacol detection kit (peroxidase method).

http://www.cosmobio.co.jp/export_e/products/kits/products_KYO_20050412/Guaiacol_detection_kit_reference.pdf 2004;

Olsvik O, Popovic T, Skjerve E, Cudjoe KS, Hornes E, Ugelstad J, Uhlen M. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 1994; 7: 43-54.

Orr RV, Beuchat LR. Efficacy of disinfectants in killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and performance of media for supporting colony development by survivors. *Journal of Food Protection* 2000; 63: 1117-22.

Oshima M, Ariga T. Omega-cyclohexyl fatty acids in acidophilic thermophilic bacteria - Studies on their presence, structure and biosynthesis using precursors labeled with stable isotopes and radioisotopes. *Journal of Biological Chemistry* 1975; 250: 6963-8.

Oteiza JM, Ares G, Sant'Ana AS, Soto S, Giannuzzi L. Use of a multivariate approach to assess the incidence of *Alicyclobacillus* spp. in concentrate fruit juices marketed in Argentina: Results of a 14-year survey. *International Journal of Food Microbiology* 2011; 151: 229-34.

Oteiza JM, Soto S, Alvarenga VO, Sant'Ana AS, Giannuzzi L. Flavorings as new sources of contamination by deteriorogenic *Alicyclobacillus* of fruit juices and beverages. *International Journal of Food Microbiology* 2014; 172: 119-24.

Oteiza JM, Soto S, Alvarenga VO, Sant'Ana AS, Gianuzzi L. Fate of *Alicyclobacillus* spp. in enrichment broth and in juice concentrates. *International Journal of Food Microbiology* 2015; 210: 73-8.

Ozalp VC, Bayramoglu G, Arica MY, Oktem HA. Design of a core-shell type immunomagnetic separation system and multiplex PCR for rapid detection of pathogens from food samples. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013; 97: 9541-51.

Padhye NV, Doyle MP. Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157-H7 in food. *Applied and Environmental Microbiology* 1991; 57: 2693-8.

Palop A, Alvarez I, Raso J, Condon S. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidocaldarius* in water, various buffers, and orange juice. *Journal of Food Protection* 2000; 63: 1377-80.

Parish ME, Goodrich RM. Recovery of presumptive *Alicyclobacillus* strains from orange fruit surfaces. *Journal of Food Protection* 2005; 68: 2196-200.

Pettipher GL, Osmundson ME, Murphy JM. Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Letters in Applied Microbiology* 1997; 24: 185-9.

Pettipher GL, Osmundson ME. Methods for the detection, enumeration and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Australia* 2000; 52: 293-5.

Pontius AJ, Rushing JE, Foegeding PM. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. *Journal of Food Protection* 1998; 61: 41-6.

Poralla K, Kannenberg E, Blume A. A glycolipid containing hopane isolated from the acidophilic, thermophilic *Bacillus acidocaldarius*, has a cholesterol-like function in membranes. *Febs Letters* 1980; 113: 107-10.

Poralla K, König WA. The occurrence of omega-cycloheptane fatty acids in a thermo-acidophilic *Bacillus*. *Fems Microbiology Letters* 1983; 16: 303-6.

Portanti O, Di Febo T, Luciani M, Pompili C, Lelli R, Semprini P. Development and validation of an antigen capture ELISA based on monoclonal antibodies specific for *Listeria monocytogenes* in food. *Veterinaria Italiana* 2011; 47: 281-90.

Quinlan JJ, Foegeding PM. Monoclonal antibody-based ELISAs for the detection of bacterial spores. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 1998; 6: 1-16.

Safarik I, Safarikova M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B* 1999; 722: 33-53.

Sanchez B, Arias S, Chaignepain S, Denayrolles M, Schmitter JM, Bressollier P, Urdaci MC. Identification of surface proteins involved in the adhesion of a probiotic *Bacillus cereus* strain to mucin and fibronectin. *Microbiology-Sgm* 2009; 155: 1708-16.

Sass-Kiss A, Sass M. Immunoanalytical method for quality control of orange juice products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000; 48: 4027-31.

Sass-Kiss A, Sass M. Distribution of various peptides in citrus fruits (grapefruit, lemon, and orange). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50: 2117-20.

Schecklies E. (1996) *Polyklonale Antikörper: Eine Einführung in die Theorie und Praxis der Antikörperherstellung*. Wiley-VCH, Weinheim.

Shan S, Zhong ZQ, Lai WH, Xiong YH, Cui X, Liu DF. Immunomagnetic nanobeads based on a streptavidin-biotin system for the highly efficient and specific separation of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 2014; 45: 138-42.

Shayanfar S, Harzman C, Pillai S. Fruit juice and puree characteristics influence enrichment requirements for real-time PCR detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. International Journal of Food Contamination 2015; 2: 1-6.

Shields MJ, Hahn KR, Janzen TW, Goji N, Thomas MC, Bin Kingombe CI, Paquet C, Kell AJ, Amoako KK. Immunomagnetic capture of *Bacillus anthracis* spores from food. Journal of Food Protection 2012; 75: 1243-8.

Siegmund B, Pollinger-Zierler B. Odor thresholds of microbially induced off-flavor compounds in apple juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2006; 54: 5984-9.

Silva FM, Gibbs P, Vieira MC, Silva CLM. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. International Journal of Food Microbiology 1999; 51: 95-103.

Simbahan J, Drijber R, Blum P. *Alicyclobacillus vulcanalis* sp. nov., a thermophilic, acidophilic bacterium isolated from Coso Hot Springs, California, USA. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2004; 54: 1703-7.

Smit Y, Cameron M, Venter P, Witthuhn RC. *Alicyclobacillus* spoilage and isolation - A review. Food Microbiology 2011; 28: 331-49.

Splittstoesser DF, Churey JJ, Lee CY. Growth characteristics of aciduric sporeforming Bacilli isolated from fruit juices. Journal of Food Protection 1994; 57: 1080-3.

Steichen C, Chen P, Kearney JF, Turnbough CL. Identification of the immunodominant protein and other proteins of the *Bacillus anthracis* exosporium. Journal of Bacteriology 2003; 185: 1903-10.

Stevens KA, Jaykus LA. Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: A review. Critical Reviews in Microbiology 2004; 30: 7-24.

Steyn CE, Cameron M, Witthuhn RC. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment - A review. *International Journal of Food Microbiology* 2011; 147: 1-11.

Tamborrini M, Holzer M, Seeberger PH, Schurch N, Pluschke G. Anthrax spore detection by a Luminex assay based on monoclonal antibodies that recognize anthrose-containing oligosaccharides. *Clinical and Vaccine Immunology* 2010; 17: 1446-51.

Thelen K, Beimfohr, C., Snaidr, J. Specific rapid detection of *Alicyclobacillus* by fluorescently-labelled gene probes in fruit juices. *Fruit Processing* 2003; 6: 416-8.

Thornton CR, Slaughter DC, Davis RM. Detection of the sour-rot pathogen *Geotrichum candidum* in tomato fruit and juice by using a highly specific monoclonal antibody-based ELISA. *International Journal of Food Microbiology* 2010; 143: 166-72.

Tsuruoka N, Isono Y, Shida O, Hemmi H, Nakayama T, Nishino T. *Alicyclobacillus sendaiensis* sp. nov., a novel acidophilic, slightly thermophilic species isolated from soil in Sendai, Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003; 53: 1081-4.

Uchida M, Teramura H, Kashida M, Kodaka H. Evaluation of a New Chromogenic Agar Medium for *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Biocontrol Science* 2013; 18: 95-100.

Uchino F, Doi S. Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. *Agricultural and Biological Chemistry* 1967; 31: 817-22.

Vyas J, Cox J, Setlow B, Coleman WH, Setlow P. Extremely variable conservation of gamma-type small, acid-soluble proteins from spores of some species in the bacterial order Bacillales. *Journal of Bacteriology* 2011; 193: 1884-92.

Walker M, Phillips CA. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: An increasing threat to the fruit juice industry? *International Journal of Food Science and Technology* 2008; 43: 250-60.

Walls I, Chuyate R. Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Food Australia 2000a; 52: 286-8.

Walls I, Chuyate R. Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from fruit juices. Journal of AOAC International 2000b; 83: 1115-20.

Walls I, Chuyate, R. *Alicyclobacillus* - historical perspective and preliminary characterization study. Dairy, Food and Environmental Sanitation 1998 18: 499-503.

Walper SA, Anderson GP, Lee PAB, Glaven RH, Liu JL, Bernstein RD, Zabetakis D, Johnson L, Czarnecki JM, Goldman ER. Rugged single domain antibody detection elements for *Bacillus anthracis* spores and vegetative cells. PloS One 2012; 7(3): e32801. doi:10.1371/journal.pone.0032801.

Wang DB, Bi LJ, Zhang ZP, Chen YY, Yang RF, Wei HP, Zhou YF, Zhang XE. Label-free detection of *B. anthracis* spores using a surface plasmon resonance biosensor. Analyst 2009; 134: 738-42.

Wang XH, Liu T, Xu N, Zhang Y, Wang S. Enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay for ochratoxin A: investigation of analytical conditions and sample matrix on assay performance. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2007; 389: 903-11.

Wang ZL, Yue TL, Yuan YH, Cai R, Guo CX, Wang X, Niu C. Development of polyclonal antibody-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Alicyclobacillus* strains in apple juice. Journal of Food Science 2012; 77: M643-M9.

Wang ZL, Yue TL, Yuan YH, Cai R, Niu C, Guo CX. Development and evaluation of an immunomagnetic separation-ELISA for the detection of *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. International Journal of Food Microbiology 2013a; 166: 28-33.

Wang ZL, Wang J, Yue TL, Yuan YH, Cai R, Niu C. Immunomagnetic separation combined with polymerase chain reaction for the detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice. PloS One 2013b; 8(12): e82376. doi:10.1371/journal.pone.0082376.

Wang ZL, Cai R, Yuan YH, Niu C, Hu ZQ, Yue TL. An immunomagnetic separation-real-time PCR system for the detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit products. International Journal of Food Microbiology 2014; 175: 30-5.

Wardencki W, Michulec M, Curylo J. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. International Journal of Food Science and Technology 2004; 39: 703-17.

Wasserman AE. Organoleptic evaluation of three phenols present in woodsmoke. Journal of Food Science 1966; 31: 1005-10.

Wiescher FMM. (2013) Produktion von poly- und monoklonalen Antikörpern gegen *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* und Sporen von *Bacillus cereus* zur Entwicklung eines bioaffinitätschromatographischen Schnellnachweises. Ludwig-Maximilians-Universität München, Tierärztliche Fakultät, Dissertation.

Wisotzkey JD, Jurtshuk P, Fox GE, Deinhard G, Poralla K. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 1992; 42: 263-9.

Wisse CA, Parish ME. Isolation and enumeration of sporeforming, thermo-acidophilic, rod-shaped bacteria from citrus processing environments. Dairy, Food and Environmental Sanitation 1998; 18: 504-9.

Witthuhn RC, Duvenage W, Gouws PA. Evaluation of different growth media for the recovery of the species of *Alicyclobacillus*. Letters in Applied Microbiology 2007; 45: 224-9.

Witthuhn RC, Smit Y, Cameron M, Venter P. Guaiacol production by *Alicyclobacillus* and comparison of two guaiacol detection methods. *Food Control* 2013; 30: 700-4.

Wolfertstetter C. (1999) Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen die von *Escherichia coli* produzierten intrazellulären Enzyme beta-Glucuronidase, beta-Galactosidase und Glutamatdecarboxylase. Ludwig-Maximilians-Universität München, Tierärztliche Fakultät, Dissertation.

Yamazaki K, Teduka H, Shinano H. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 1996; 60: 543-5.

Yamazaki K, Kawai Y, Inoue N, Shinano H. Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Letters in Applied Microbiology* 1997a; 25: 153-6.

Yamazaki K, Okubo T, Inoue N, Shinano H. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid identification of the spoilage bacterium *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 1997b; 61: 1016-8.

Yamazaki K, Murakami M, Kawai Y, Inoue N, Matsuda T. Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. *Food Microbiology* 2000; 17: 315-20.

Yokota A, Fujii, T., Goto, K. (2007) *Alicyclobacillus* Thermophilic Acidophilic Bacilli. Springer, Heidelberg.

Yue TL, Zhang JB, Yuan YH. Spoilage by *Alicyclobacillus* bacteria in juice and beverage products: Chemical, physical, and combined control methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2014; 13: 771-97.

Zierler B, Siegmund B, Pfannhauser W. Determination of off-flavour compounds in apple juice caused by microorganisms using headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2004; 520: 3-11.

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1	Strukturformeln von Verbindungen, die für das Fehlroma bei mit <i>Alicyclobacillus</i> spp. kontaminierten Produkten verantwortlich gemacht werden.	11
Abbildung 2.2	Bildung von Guajacol im mikrobiellen Stoffwechsel aus Vanillinsäure und dessen Vorläufern.	12
Abbildung 2.3	Schematische Darstellung der Detektion von Fehlroma-produzierenden <i>Alicyclobacillus</i> spp. in Fruchtsäften nach IFU-Methode Nr. 12.	19
Abbildung 4.1	RAPD: Genetische Diversität der untersuchten <i>A. acidoterrestris</i> Isolate bzw. DSM-Referenzstämme.	49
Abbildung 4.2	RAPD: Bandenmuster von Isolaten, die keiner RAPD-Gruppe zugeordnet werden konnten und von DSM-Stämmen, die nicht der Spezies <i>A. acidoterrestris</i> angehören.	50
Abbildung 4.3	Lebend-Tot-Färbung von vegetativen Zellen von <i>Alicyclobacillus</i> mit Syto 9 Green und PI vor und nach Hitzebehandlung.	52
Abbildung 4.4	Einfluss der Lysozymkonzentration sowie -inkubationszeit auf die relative Keimdichte von Isolat MHI 10002 bzw. MHI 10003.	53
Abbildung 4.5	Dichtegradientenzentrifugation mit Nycodenz: Reinigung von Sporenpräparationen von <i>A. acidoterrestris</i> .	55
Abbildung 4.6	Sporenpräparationen des <i>A. acidoterrestris</i> Stammes MHI 10002: vor und nach Dichtegradientenzentrifugation.	56
Abbildung 4.7	Entwicklung der in den Mäuseseren nachweisbaren Antikörpertiter im Immunisierungsverlauf.	61
Abbildung 4.8	Nachweisbare Antikörper-Titer eines polyklonalen Mäuseserums bei Beschichtung der Mikrotiterplatten mit unterschiedlichen Sporenpräparationen.	62
Abbildung 4.9	Nachweisbare Antikörper-Titer in den nach den jeweiligen Restimulierungs-Injektionen gewonnenen Kaninchen-Antiseren.	63
Abbildung 4.10	Apparente Affinität der vier Mäuseseren für die als Immunogen verwendeten <i>A. acidoterrestris</i> Stämme.	64

Abbildung 4.11	Apparente Affinität der Kaninchenserum für die als Immunogen verwendeten <i>A. acidoterrestris</i> Stämme.	66
Abbildung 4.12	Reaktivität eines Mäuseserums mit einer Sporenpräparation in der Immunfluoreszenz.	68
Abbildung 4.13	Reaktivität eines Kaninchenserums mit einer Sporenpräparation in der Immunfluoreszenz sowie mit einer überwiegend vegetative Zellen enthaltenden Präparation.	69
Abbildung 4.14	SDS-PAGE von Protein-Präparationen die von mit 0,01 M NaOH sowie SDS-8 M-Harnstoff behandelten <i>A. acidoterrestris</i> Sporen gewonnen wurden (Färbung mit Coomassie-Blau).	71
Abbildung 4.15	Immunoblot-Analysen zur Reaktivität von Serum des Kaninchens I, Serum des Kaninchens II sowie Mäuseserum I mit Oberflächenprotein-Präparationen von <i>A. acidoterrestris</i> Sporen.	72
Abbildung 4.16	Effekt von Tween 20 bzw. BSA-Zusätzen zum Probenverdünnungspuffer auf die im Sandwich EIA generierten Signalintensitäten.	74
Abbildung 4.17	Vergleich der Affinitäten von Kaninchenserum I und II bei Einsatz als Fangantikörper im Kaninchenserum-basierten Sandwich EIA.	75
Abbildung 4.18	Reaktivität des Kaninchenserum-basierten Sandwich EIA Systems mit verschiedenen Spezies von Alicyclobazillen.	77
Abbildung 4.19	Standardkurve des Sandwich EIA für Sporen des <i>A. acidoterrestris</i> Referenzstamms DSM 3923.	78
Abbildung 4.20	Vergleichende Darstellung der Reaktivität von <i>A. acidoterrestris</i> und anderen <i>Alicyclobacillus</i> Isolaten im Sandwich EIA in Abhängigkeit von der RAPD-Gruppenzugehörigkeit.	79
Abbildung 4.21	Auswirkung verschiedener pH-Werte von Orangensaftproben auf die Signalintensität des Sandwich EIA.	81
Abbildung 4.22	Sporenzahlen in Orangensaftproben, die mit 1 oder 10 Sporen/ml des Referenzstamms DSM 2498 oder des Isolats MHI 10003 künstlich kontaminiert und dann 24 oder 48 h inkubiert wurden.	82
Abbildung 4.23	Übersicht zu den relativen Affinitäten verschiedener mAK für <i>A. acidoterrestris</i> Sporenpräparationen im indirekten EIA.	87

Abbildung 4.24	Im Sandwich EIA erhaltene Standardkurven für Sporen von <i>A. acidoterrestris</i> bei Verwendung verschiedener mAK.	88
Abbildung 4.25	Analyse der Reaktivität verschiedener mAK im Immunoblot.	90
Abbildung 4.26	Sensitivität des auf mAK 11H11 basierenden Sandwich EIA Systems für verschiedene Spezies von Alicyclobazillen.	94

X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1	Übersicht zu den derzeit dem Genus <i>Alicyclobacillus</i> zugeordneten Spezies.	4
Tabelle 2.2	Charakteristika einiger Lebensmittelhygienisch-relevanter <i>Alicyclobacillus</i> spp.	7
Tabelle 2.3	Zusammensetzung einiger Nährmedien, die zur Isolierung von <i>Alicyclobacillus</i> spp. aus Fruchtsäften eingesetzt werden.	16
Tabelle 2.4	Auswahl molekularbiologischer Methoden zum Nachweis von Alicyclobazillen in Fruchtsäften bzw. zur Identifizierung und Differenzierung von <i>Alicyclobacillus</i> Isolaten.	23
Tabelle 2.5	Bislang beschriebene polyklonale Antiseren für den Nachweis von <i>Alicyclobacillus</i> spp.	26
Tabelle 2.6	Charakteristika von immunchemischen Verfahren zur Detektion von <i>Alicyclobacillus</i> spp.	26
Tabelle 4.1	Stammsammlung: Auflistung der von der DSMZ bezogenen <i>Alicyclobacillus</i> Stämme.	40
Tabelle 4.2	Eigenschaften und Herkunft der zur Erstellung einer <i>Alicyclobacillus</i> -Stammbibliothek eingesetzten Isolate.	41
Tabelle 4.3	Beispielhafte Auflistung von mikrobiologischen Untersuchungsergebnissen für einige <i>Alicyclobacillus</i> spp. Isolate sowie Referenzstämme in Anlehnung an IFU-Methode Nr. 12.	43
Tabelle 4.4	Spezieszugehörigkeit (Real-Time PCR) und Charakteristika (RAPD Profil & Guajacol-Produktion) der <i>Alicyclobacillus</i> Isolate.	45
Tabelle 4.5	Charakteristika (RAPD Profil & Guajacol-Produktion) der <i>Alicyclobacillus</i> DSM-Referenzstämme.	47
Tabelle 4.6	Verhalten der zur Immunogen-Herstellung verwendeten <i>A. acidoterrestris</i> Stämme auf Mangan-Versporungsagar bzw. BAT-Agar.	51
Tabelle 4.7	Inaktivierungseffekt verschiedener Temperatur/Dosis Kombinationen von Paraformaldehyd auf <i>A. acidoterrestris</i> Sporen.	57
Tabelle 4.8	Für die Herstellung des Immunogens eingesetzte Sporenpräparationen.	58
Tabelle 4.9	Immunisierung von Mäusen mit inaktivierten <i>A. acidoterrestris</i> Sporen.	58

Tabelle 4.10	Immunisierung von Kaninchen mit inaktivierten <i>A. acidoterrestris</i> Sporen.	60
Tabelle 4.11	Als Beschichtungsantigen in den indirekten EIAs eingesetzte Sporenpräparationen.	61
Tabelle 4.12	Apparente Affinität der Mäuseseren für <i>A. acidoterrestris</i> .	65
Tabelle 4.13	Apparente Affinität der Mäuseseren für verschiedene <i>Alicyclobacillus</i> spp.	65
Tabelle 4.14	Übersicht über <i>Bacillus</i> und <i>Clostridium</i> spp., die für die Überprüfung der Exklusivität des Sandwich EIA eingesetzt wurden.	76
Tabelle 4.15	Nachweisgrenzen des Kaninchenserum-basierten Sandwich EIA für Sporen verschiedener <i>A. acidoterrestris</i> Referenzstämme und Isolate.	78
Tabelle 4.16	EIA Ergebnisse für verschiedene Saftproben (Orangen-, Tomaten-, weißer Trauben- und klarer Apfelsaft) die mit 0, 1 oder 10 Sporen/ml des Isolats MHI 10003 oder Referenzstamm DSM 2498 künstlich kontaminiert und für 48 h bei 45 °C inkubiert wurden.	83
Tabelle 4.17	EIA Ergebnisse für verschiedene Saftproben (Birne-, Pink-Grapefruit- und trüber Apfelsaft) die mit 0, 1 oder 10 Sporen/ml des Isolats MHI 10003 oder Referenzstamm DSM 2498 künstlich kontaminiert und für 48 h bei 45 °C inkubiert wurden.	84
Tabelle 4.18	Übersicht zu den wesentlichen Charakteristika der generierten mAK gegen <i>A. acidoterrestris</i> Sporen.	86
Tabelle 4.19	Aufbau und Charakteristika verschiedener Sandwich EIA Varianten zum Nachweis von <i>A. acidoterrestris</i> Sporen.	92
Tabelle 4.20	Nachweisgrenzen des auf mAK 11H11 basierenden Sandwich EIA Systems für Sporen der <i>A. acidoterrestris</i> Referenzstämme und Isolate.	93

XI. DANKSAGUNG

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich:

bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin Märtlbauer für die Überlassung des interessanten Themas sowie die Unterstützung bei der Anfertigung meiner Dissertation.

insbesondere bei Dr. Richard Dietrich, der durch die kompetente Betreuung in den letzten 2,5 Jahren sowie die ausdauernde und sorgfältige Durchsicht des Manuskripts maßgeblich zum Gelingen der Dissertation beigetragen hat und mir mit einem Augenzwinkern über so manche „Durststrecke“ hinweg geholfen hat. Danke Ritchie!

bei Dr. Andrea Didier und Dr. Kristina Schauer, die mir immer wieder bereitwillig mit Rat und Tat zur Seite standen.

bei Maja Elsner und Susanne Eberhardt für ihre gründliche und geduldige Einarbeitung in die Mikrobiologie sowie bei Brunhilde Minich und Franziska Witzko für die Einführung in die Welt der EIAs.

bei Dr. Christina Hölzel für die Durchsicht des Manuskripts.

bei Franziska Tausch für die schöne Zeit und moralische Unterstützung im gemeinsamen Labor bzw. Büro sowie für schöne Unternehmungen außerhalb des Lehrstuhls. Dafür danke ich auch Dr. Theresa Laufer ganz herzlich. Ohne euch wäre die Doktorarbeit nur halb so schön gewesen.

auch bei allen anderen Mitarbeitern und Mitdoktoranden. Danke für das tolle Betriebsklima. Ich werde immer gerne an die netten Pausen mit Kuchen und die vielen gemeinsamen Unternehmungen bzw. Ausflüge zurückdenken.

bei meiner Familie für ihre Unterstützung in den letzten Jahren. Danke, dass ihr immer für mich da seid.