

EINSATZ VON ATP-BIOLUMINISZENZMESSGERÄTEN FÜR DAS MIKROBIELLE SCREENING BEI FÜLLANLAGEN, OBERFLÄCHEN UND FÄSSERN IN KELLEREIEN

KARIN MANDL, CHRISTOPH MUTZ UND KARIN SILHAVY-RICHTER

HBLA und BA für Wein- und Obstbau
A-3400 Klosterneuburg, Wiener Straße 74
E-Mail: Karin.Mandl@weinobst.at

Die Eignung von ATP-Messungen für ein mikrobiologisches Screening von Füllanlagen oder Oberflächen wurde mit einem Lumineszenzmessgerät untersucht. Aus Übernachtskulturen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Oenococcus oeni* wurden Verdünnungsreihen angelegt. Die verschiedenen Verdünnungsstufen wurden sowohl mit zwei verschiedenen Methoden auf ihre Lichtemission untersucht als auch zur Keimzahlbestimmung auf verschiedene, in der Praxis häufig verwendete Nährmedien (TSA (Tryptone Soya Agar), WL-Agar (Wallerstein Nutrient Agar), MRS-Agar (De Man, Rogosa and Sharpe Agar), PC (Plate Count Agar) und MEA (Malzextrakt Agar)) ausplattiert. Es zeigte sich, dass die Lichtemission in höheren Keimzahlbereichen (etwa 600 bis $1,1 \times 10^4$ KBE/ml bei *S. cerevisiae* und $2,6 \times 10^4$ bis 2×10^8 KBE/ml bei *O. oeni*) gut mit den auf WL-Nährboden ermittelten Keimzahlen korrelierte (für LuciPacPen und LuciPac Pen Aqua). Bei niedrigeren Keimzahlen (bis ca. 10^5 KBE/ml bei *O. oeni* und bis 500 KBE/ml bei *S. cerevisiae*) war dagegen keine signifikante oder nur eine sehr geringe lineare Korrelation zwischen Keimzahlen auf WL-Medium und Lichtemissionen zu beobachten. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen daher, dass stärkere Keimbelastungen mit Hilfe des Kikkoman-Testsystems zuverlässig diagnostiziert werden können. Die Validierung einer ausreichenden Reinigung von Füllanlagen oder Oberflächen mit Hilfe dieses Gerätes ist aber nur sehr eingeschränkt möglich, weil erst ab relativ hohen Keimzahlen mit einem eindeutigen ATP-Messergebnis gerechnet werden kann.

Schlagwörter: ATP, *Saccharomyces cerevisiae*, Bakterien, *Oenococcus oeni*, Hefen

Use of ATP bioluminescence measuring devices for microbial screening filling lines, surfaces and barrels in cellars. The suitability of ATP measurements for microbiological screening of filling equipment or surfaces was investigated with a luminescence meter. From overnight cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* serial dilutions were made. The varying dilutions were investigated for their light emission by means of two different methods, and for germ count determination they were plated on various frequently used nutrient media (TSA (Tryptone Soya agar), WL agar (Wallerstein nutrient agar), MRS agar (De Man, Rogosa and Sharpe agar), PC (plate count agar) and MEA (malt extract agar)). It was found that the light emission with higher germ count ranges (about 600 to 1.1×10^4 CFU/ml in *S. cerevisiae* and 2.6×10^4 to 2×10^8 CFU/ml in *O. oeni*) correlated well with those determined on WL nutrient (for LuciPac Pen and LuciPac Pen Aqua). With lower germ counts (up to about 10^5 CFU/ml in *O. oeni* and up to 500 CFU/ml in *S. cerevisiae*), on the other hand, no significant or only a very small linear correlation between germ counts on WL medium and light emissions was observed. The results of this study therefore show that higher germ loads can be reliably diagnosed with the Kikkoman test system. The validation of a sufficient cleaning of filling equipment or surfaces by means of this device is only possible to a certain extent, because definite ATP measurement results only can be expected with relatively high germ counts.

Keywords: ATP, *Saccharomyces cerevisiae*, bacteria, *Oenococcus oeni*, yeast

Adenosintriphosphat (ATP) dient in der Zelle als Energieträger. Es wird intrazellulär (PAGADALA et al., 2011) gebildet und an das extrazelluläre Milieu (MEMPIN et al., 2013) abgegeben. Es ist somit eine wichtige Indikatormolekülsubstanz für biologische Prozesse im Wasser und auf Oberflächen (SIEBEL et al., 2008; VENKATESWARAN et al., 2003), und seine mögliche Eignung als Indikator für die Effektivität von Reinigungsverfahren in Verarbeitungsprozessen wird diskutiert. Messungen mit ATP (Adenosintriphosphat)-Messgeräten könnten eine rasche Kontrolle von Oberflächen und Flüssigkeiten auf mikrobiologische Kontaminationen erlauben. Biofilmbildungen in Rohrleitungen (NIQUETTE et al., 2000; HALLAM et al., 2001; STORGÅRDS et al., 2005) werden hauptsächlich durch konsequente Reinigung vermieden. ATP-Messungen können sehr rasch erfolgen. Eine Entscheidung, ob eine Reinigung von Oberflächen oder Füllanlagen wiederholt werden muss, ist auf Basis einer ATP-Messung unmittelbar nach der Reinigung möglich. Bei der praxisüblichen Bestimmung der Gesamtkeimzahlen dagegen ist eine Wartezeit auf die Ergebnisse von bis zu sieben Tagen (SIEBEL et al., 2008; ALLEN, 2004) notwendig.

Soll die Kontamination von Leitungs- und Betriebswasser durch Mikroorganismen analysiert werden, ist es wichtig, dass die Messungen unmittelbar nach den Probenahmen erfolgen. Lange Stehzeiten können nämlich die Ergebnisse verfälschen, weil es zu einer kontinuierlichen ATP-Freisetzung, einer Erhöhung der Bakterienanzahl (LAUTENSCHLAGER et al., 2010; CARRICK et al., 2001; MANDL, 2016) und zu negativen Auswirkungen auf den Geschmack, den Geruch und die Farbe des Wassers (SERVAIS et al., 1995) kommen kann.

Zur Untersuchung der mikrobiellen Belastung verschiedener Betriebswässer und Spülwässer von Kellereien und Fruchtsaftabfüllern wurde das Testsystem der Firma Kikkoman (Düsseldorf, Deutschland) verwendet. Das einfach zu bedienende Testsystem eignet sich vor allem für das Screening von glatten Oberflächen und Wasser. Es funktioniert auf Basis der Messung von Biolumineszenz, die entsteht, wenn Luciferase die Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin katalysiert. Diese Reaktion benötigt ATP, deswegen korreliert der ATP-Gehalt einer Probe mit der Lichtemission, die in Relative Light

Units (RLU) gemessen werden kann. Die RLU-Werte in den Betriebswässern der meisten Betriebe lagen bei etwa 20 (MANDL et al., 2016).

Im Bereich von Kantinen werden ATP-Systeme gerne eingesetzt. OSIMANI et al. (2014) analysierte mit Hilfe eines Clean-Trace ATP-Oberflächentest mittels eines Clean-Trace NG Luminometers die RLU-Werte der Oberflächen von verschiedenen Messern, Unterlagen und Geräten. Es wurden Messungen vor und nach der Reinigung durchgeführt und mit der totalen mesophilen Keimzahl und den Keimzahlen von Pathogenen verglichen. Es zeigte sich, dass das System für eine schnelle Kontrolle von Küchenutensilien und Oberflächen geeignet ist.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es festzustellen, inwieweit die Messung von RLU-Werten geeignet ist, eine mikrobielle Kontamination von Füllanlagen, Oberflächen und Fässern in Kellereien anzuzeigen. Als Modellkeime wurden *Saccharomyces cerevisiae* und *Oenococcus oeni* herangezogen. Bei beiden handelt es sich um Keime, die bei Verschmutzungen von Füllanlagen, Oberflächen und Fässern in Kellereien relevant sein können. Unter Laborbedingungen wurden Verdünnungsreihen der beiden Keime angelegt. Parallel erfolgten pro Verdünnungsstufe jeweils ATP-Messungen und eine Keimzahlbestimmung durch Ausplattieren auf verschiedene Nährmedien.

MATERIAL UND METHODE

Die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen erfolgten mit einem Lumitester PD-20 der Firma Kikkoman (Düsseldorf, Deutschland). Dieses Testsystem nutzt zusätzlich zur Luciferase auch Pyruvat-Orthophosphatkinase und Pyruvat-Kinase, die die Umwandlung von in der Luciferinreaktion entstandenem oder bereits in den Proben vorhandenem AMP (Adenosinmonophosphat) und ADP (Adenosindiphosphat) zu ATP katalysieren. Die Methode produziert eine definierte Menge an Lumineszenz proportional zur Menge des ATP, ADP und AMP in der Probe. Es wurden zwei verschiedene Testsysteme der Firma Kikkoman (Düsseldorf, Deutschland) mit unterschiedlich geformten Messstäbchen, nämlich LuciPac Pen Aqua (LPPA)

und LuciPac Pen (LPP) verwendet. Die ATP/AMP/ADP-Werte wurden in RLU (Relative Light Unit) angegeben. Es handelt sich dabei um eine photometrische Messung des Farbstoffes Luciferin (Dauer der Messung weniger als 1 min).

Es wurden von *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 32701, (Mecconti, Warschau, Polen) und *Oenococcus oeni* (hauseigene Stammsammlung) Übernachtskulturen in Standard I-Nährbouillon (Merck, Darmstadt, Deutschland) bei 22 °C angelegt.

Um die Keimzahlen zu erheben, wurden jeweils drei Verdünnungsreihen mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung (10 RLU) in 10er-Stufen angelegt. Jeweils 100 µl einer Verdünnungsstufe wurden auf fünf unterschiedliche Nährböden, TSA (Trypton Soja Agar, Roth, Karlsruhe Deutschland), WL-Agar (Wallerstein Nutrient Agar, Oxoid, München, Deutschland), MEA (Malzextrakt Agar, Roth, Karlsruhe, Deutschland), MRS (MRS Agar, Roth, Karlsruhe, Deutschland) und PC-Agar (Plate Count Agar, Roth, Karlsruhe, Deutschland) ausplattiert. Diese Platten wurden bei 22 °C fünf Tage lang bebrütet und visuell ausgezählt. Im Vergleich dazu wurden RLU-Messungen nach Angaben des Herstellers durch Eintauchen der Teststäbchen in die verdünnten Suspensionen mit LuciPac Pen und LuciPac Pen Aqua durchgeführt. Die RLU-Werte wurden unmittelbar nach dem Erstellen der Verdünnungsreihen gemessen (ca. 16 h nach dem Ansetzen).

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels SPSS22 (IBM, Wien, Österreich). Um den Zusammenhang zwischen Keimzahlen und RLU-Werten zu ermitteln, wurden Korrelationskoeffizienten nach Bravais-Pearson berechnet. Die beiden eingesetzten Testsysteme LPPA und LPP wurden mittels Mann Whitney U-Test verglichen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Abbildung 1 stellt die für *O. oeni* ermittelten Ergebnisse dar. Die durch Ausplattieren der Verdünnungsstufen auf die unterschiedlichen Nährböden erhaltenen Keimzahlen werden den jeweils parallel ermittelten RLU-Werten gegenübergestellt. Die Darstellungen umfassen die Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-10} , das entspricht einem

Keimzahlbereich von 0 bis 2×10^8 koloniebildende Einheiten (KBE) pro ml. Die korrespondierenden ATP/AMP-Werte lagen für beide Testsysteme (LPP und LPPA) bei 2 bis 1747 RLU, wobei im Mann Whitney U-Test keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Teststäbchen ermittelt wurden.

Die Berechnung des Zusammenhangs zwischen den erhaltenen Keimzahlen und den RLU-Werten erfolgte auf Basis der Keimzahlen, die mittels des in der Getränkeanalytik häufig verwendeten WL-Nährbodens erhoben wurden. Dabei ergab sich für den Keimzahlbereich $2,6 \times 10^4$ bis 2×10^8 KBE/ml ein Korrelationskoeffizient nach Bravais-Pearson von 0,88** (N = 48) für LPP-Stäbchen und 0,82** (N = 48) für LPPA-Stäbchen. Es zeigte sich somit ein sehr deutlicher linearer Zusammenhang zwischen RLU-Werten und Keimzahlen. Wurden allerdings nur Bakteriensuspensionen bis zu einem Bereich von 10^5 KBE/ml in die Auswertung einbezogen, ergab sich ein anderes Bild. In diesem Keimzahlbereich konnte keine signifikant lineare Korrelation von KBE/ml auf WL-Medium und RLU-Werte errechnet werden (für beide Teststäbchen).

Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse für *S. cerevisiae*. Auch hier sind die Verdünnungsstufen von 10^{-3} bis 10^{-10} in den Diagrammen enthalten, das entspricht bei *S. cerevisiae* einem Keimzahlbereich von 0 bis $1,1 \times 10^4$ KBE/ml. Die korrespondierenden ATP/AMP-Werte betragen 0 bis 252 RLU. Auch in diesem Fall wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Resultaten der LPP- und LPPA-Teststäbchen ermittelt (Mann Whitney U-Test). Über den Keimzahlbereich von 600 bis $1,1 \times 10^4$ KBE/ml betrachtet, korrelierten die Keimzahlen auf WL-Nährboden sehr gut mit den entsprechenden RLU-Messergebnissen ($r = 0,8$ ** bzw. $0,82$ ** und N = 48 für LPP und LPPA). Bei geringen Keimzahlen bis 500 KBE/ml war auch bei *S. cerevisiae* keine signifikante (bei LPP-Messstäbchen) oder nur eine sehr geringe ($r = 0,321$ *, N = 38, für LPPA-Messstäbchen) signifikante lineare Korrelation zwischen Keimzahlen auf WL-Medium und RLU-Werten zu beobachten.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass stärkere Keimbelastungen mit Hilfe des Kikkoman-Testsystems (LPP und LPPA) zuverlässig diagnostiziert werden können. Dieser Zusammenhang konnte aber bei *O. oeni* erst ab

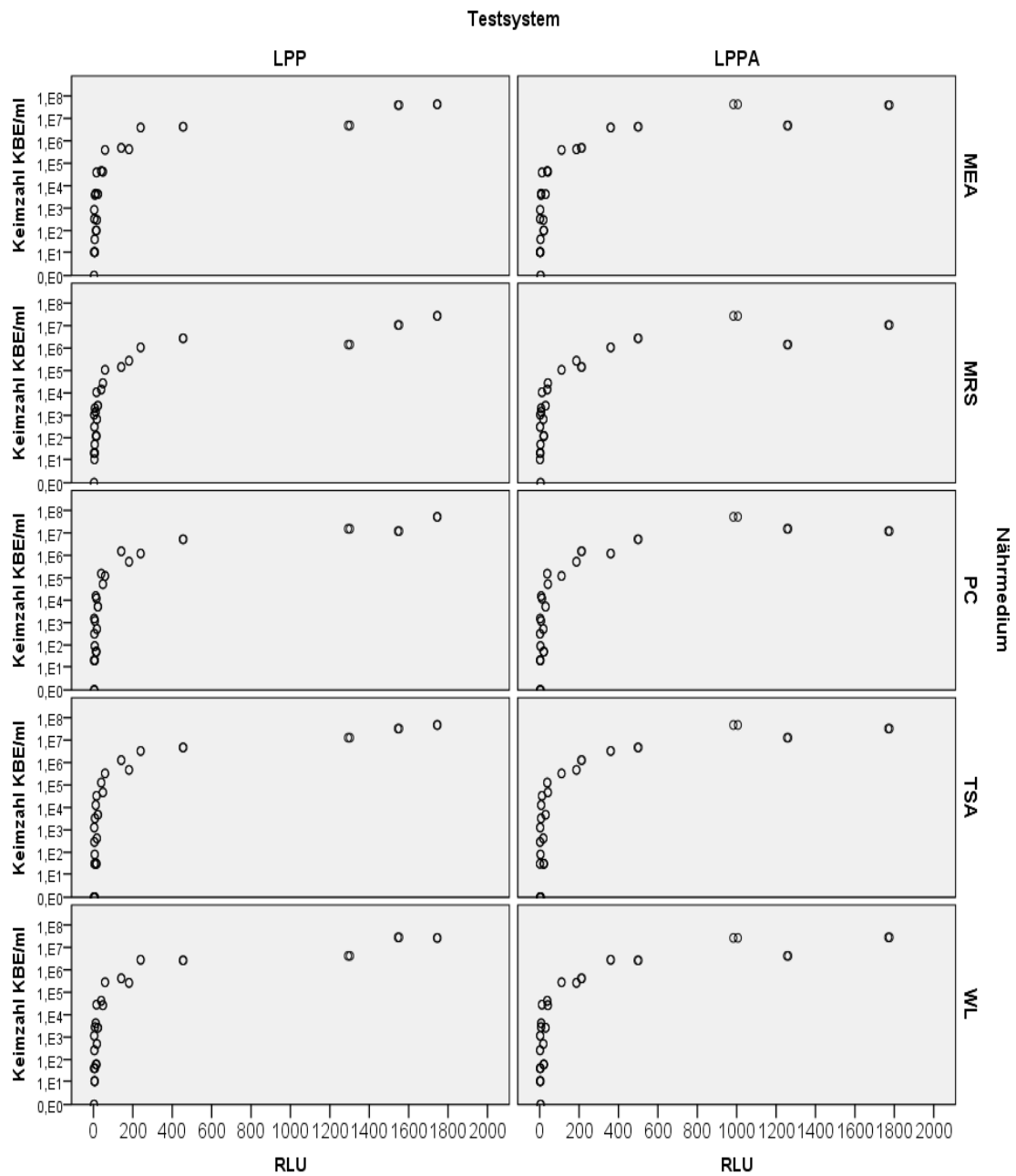


Abb. 1: Zusammenhang zwischen den auf unterschiedlichen Nährmedien ermittelten Keimzahlen in KBE/ml und den ATP/AMP-Messergebnissen in RLU ermittelt durch LPP- und LPPA-Teststäbchen für *Oenococcus oeni*; TSA (Trypton Soja Agar), WL (Wallerstein Nutrient Agar), MEA (Malzextrakt Agar), MRS (De Man, Rogosa, Sharpe Agar) PC (Plate Count Agar.)

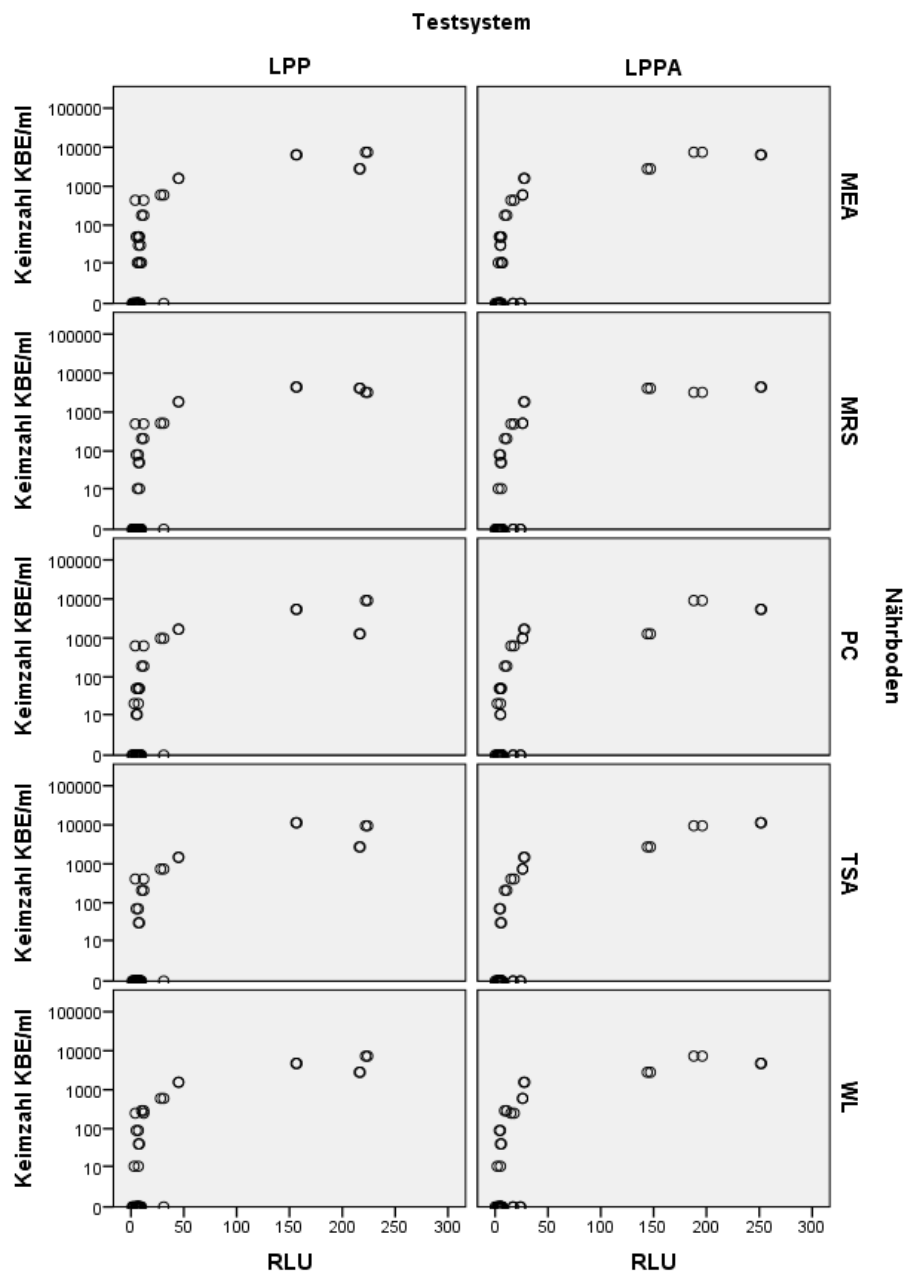


Abb. 2: Zusammenhang zwischen den auf unterschiedlichen Nährmedien ermittelten Keimzahlen in KBE/ml und den ATP/AMP-Messergebnissen in RLU ermittelt durch LPP- und LPPA-Teststäbchen für *Saccharomyces cerevisiae*; TSA (Trypton Soja Agar), WL (Wallerstein Nutrient Agar), MEA (Malzextrakt Agar), MRS (De Man, Rogosa, Sharpe Agar) PC (Plate Count Agar)

etwa $2,6 \times 10^4$ KBE/ml erkannt werden, bei *S. cerevisiae* bei jedenfalls mehr als 500 KBE/ml (Abb. 1 und 2). Die Validierung einer ausreichenden Reinigung von Füllanlagen oder Oberflächen mit Hilfe dieses Gerätes ist daher aber nur sehr eingeschränkt möglich, weil erst ab relativ hohen Keimzahlen mit einem eindeutigen ATP-Messergebnis gerechnet werden kann. Damit stimmen die Ergebnisse für *O. oeni* in etwa mit Ergebnissen aus der Literatur für *Staphylococcus aureus* überein. Auch bei *S. aureus* wurden bei höheren Keimzahlen gute Korrelationen zwischen Keimzahlen und RLU-Werten beobachtet, die geringste zuverlässig nachweisbare Keimzahl lag allerdings bei $5,6 \times 10^4$ Keimen direkt auf das Kikkoman-Teststäbchen appliziert (OMIDBAKHS et al., 2014). CARRICK et al. (2001) dagegen fanden keine ausreichende Übereinstimmung zwischen den Keimzahlen der in Brauereien relevanten Mikroorganismen *Pediococcus diimnosii*, *Lactobacillus paracasei* und *Saccharomyces carlsbergensis* und den von diesen abgegebenen Mengen an ATP, zur Anwendung kamen in diesem Versuch allerdings andere Testfabrikate. OSIMANI et al. (2014) untersuchten verschiedene Oberflächen von Messern, Geräten und Unterlagen in Kantinen. Die RLU-Werte bewegten sich etwa zwischen 1.059 und 677.979 RLU/100 cm² vor der Reinigung. Nach der Reinigung sanken die Werte bis auf 7 RLU/100 cm². Es wurden maximale Keimzahlen nach der Reinigung von $4,8 \times 10^5$ KBE/100 cm² auf einem Schneidbrett für rohes Fleisch gefunden.

Aus dem Vergleich der beiden in der vorliegenden Ar-

beit untersuchten Keime ergibt sich, dass die jeweils abgegebene Menge von ATP von Mikroorganismus zu Mikroorganismus sehr unterschiedlich sein kann. Das wird auch durch Literaturdaten bestätigt. *S. cerevisiae* enthält beispielsweise 155 fg (= 10^{-15} g) ATP pro Zelle, und bei Milchsäurebakterien liegt der Wert bei 0,7 – bis 2,2 fg ATP pro Zelle (PISTELOK et al., 2016). Somit ist eine wichtige Aussage für die Praxis, dass eine Zuordnung einer Gesamtkeimzahl zu RLU-Werten nur eingeschränkt möglich ist. Zu berücksichtigen ist darüber hinaus, dass die RLU-Werte von Wasser sehr unterschiedlich sein können. MANDL et al. (2016) beschrieben Wasserwerte, die von 10 bis 220 RLU-Werten streuten. Es handelte sich dabei um entkeimtes aufbereitetes Wasser, bis hin zu stark mikrobiell belastetem Brunnenwasser. Normales durchschnittliches Leitungswasser liegt im Bereich von 16 RLU. Bevor Messungen in einem Betrieb durchgeführt werden, wird empfohlen die hauseigenen RLU-Werte des Wassers zu messen, um den Basiswert für die eigenen folgenden Messungen zu kennen. Ein Wert um die 100 RLU entspricht mindestens einer Keimzahl von 10.000 KBE/ml. Aus dieser hohen Zahl kann geschlossen werden, dass RLU-Werte im Bereich von 100 RLU eine sehr hohe Keimbelastung darstellen.

DANKSAGUNG

Wir danken Frau Dr. MONIKA RIEDLE-BAUER für die Unterstützung bei Erstellung der Grafiken und Statistik.

LITERATUR

ALLAN, M.J., EDBERG, S. AND REASONER, D. 2004: Heterotrophic plate count bacteria- what is their significance in drinking water? International Journal of Food Microbiology 92: 265-274.

ATLAS, R.M. 1946: Handbook of Microbiological Media. 3rd ed.- New York: CRC Press, 2004

BACK, W. 1994: Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie. Nürnberg: Verlag Hans Carl, 1994

CARRICK, K., BARNEY, M., NAVARRO, A. AND RYDER, D. 2000: The comparison of four bioluminometer and their swab kits for instant hygiene monitoring and detection of microorganisms in the brewery. Journal of Institute of Brewing, vol. 107, Nr. 1

LAUTENSCHLAGER, K., BOON, Y., WANG, N., EGLI, T. AND HAMMES, F. 2010: Overnight stagnation of drinking water in household taps induces microbial growth and changes in community composition Water Research 44: 4868 -4877.

- MANDL, K., HUMMER, J., KLINGER, R. UND MUTZ C. 2016: Überprüfung der Eignung eines ATP-Testsystems zur mikrobiologischen Kontrolle von Betriebswässern in Trauben und Früchte verarbeitenden Betrieben, Mitteilungen Klosterneuburg 66: 266-280,
- MEMPIN, R., TRAN, H., CHEN, C., GONG, H., HO, K.K. AND SANGWEI, L. 2013: Release of extracellular ATP by bacteria during growth. BMC Microbiology 13: 301.
- MURAKAMI, A., KIMURA, K. AND NAKANO, A. 1999: The inactive form of a yeast casein kinase I suppresses the secretory defect of the sec12 mutant. Implication of negative regulation by the Hrr25 kinase in the vesicle budding from the endoplasmic reticulum. J Biol Chem 274(6): 3804-10.
- OMIDBAKHS, N., AHMADPOUR, F. AND KENNY, N. 2014: How Reliable Are ATP Bioluminescence Meters in Assessing Decontamination of Environmental Surfaces in Healthcare Settings? Virolle M-J, ed. PLoS ONE ;9(6):e99951. doi:10.1371/journal.pone.0099951.
- OSIMANI, A., GAROFALO, C., CLEMENTI, F., TAVOLETTI, S. AND AQUILANTI, L. 2014: Bioluminescence ATP Monitoring for the Routine Assessment of Food Contact Surface Cleanliness in a University Canteen Int. J. Environ. Res. Public Health, 11, 10824-10837; doi:10.3390/ijerph111010824
- PAGADALA, V., VISTAIN, L., SYMERSKY, J. AND MUELLER, D. 2011: Characterization of the mitochondrial ATP synthase from yeast *Saccharomyces cerevisiae* J Bioenerg Biomembr 43: 333-347.
- PISTELOK, F., POHL, A., STUCZYŃSKI, T., UND WIERA B. 2016: Using ATP Test for assessment of hygiene risks Ecol. Chem Eng. S. 23 (2): 259-270.
- SERVAIS, P., LAURENT, P. AND RANDON, G. 1995: Comparison of bacterial dynamics in various French distribution systems J. Water Sci. Res. Technol. –Aqua 44: 10-17.
- SIEBEL, E., WANG, Y., EGLI, T. AND HAMMES, F. 2008: Correlation between total cell concentration, total adenosine triphosphate concentration and heterotrophic plate counts during microbial monitoring of drinking water, Drinking Engineering and Science Discussions 1: 71 – 86.
- VENKATESWARAN, K., HATTORI, N., MYRON, L.D. AND KERN, R. 2003: ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities Journal of Microbiological Methods 52: 367 -377.

Eingelangt am 17. Mai 2017