



ÖNOLOGIE – NACHWEIS UND IDENTIFIZIERUNG VON MIKROORGANISMEN

Die mikrobiologische Überwachung des Weinherstellungsprozesses ist eine wichtige Grundlage, um die Entstehung von Gärstoppen oder Fehlnoten zu verstehen und künftig zu beheben.

Um wichtige Informationen über den Zustand der Gärhefe oder die Qualität des fertigen Weins zu erhalten, ist eine mikrobiologische Überwachung unabdingbar. So bestätigt z.B. eine hohe Hefemortalität einen Gärstopp. Ebenso gibt die Identifizierung von Mikroorganismen wie *Brettanomyces* Aufschluss über eine mögliche Beeinträchtigung des fertigen Weins. Neben den Werkzeugen der klassischen Mikrobiologie haben sich zwei neue Untersuchungsmethoden herausgebildet: die Molekularbiologie und die Durchflusszytometrie. Während sich die Molekularbiologie auf die Charakterisierung der in den Mikroorganismen vorhandenen Nucleinsäuren konzentriert, liefert die Durchflusszytometrie strukturelle und funktionelle Informationen über jede analysierte Bakterien- oder Hefezelle. In diesem Artikel werden diese mikrobiologischen Untersuchungsinstrumente vorgestellt und ihre Komplementarität in der Forschung und Praxis der Önologie diskutiert.

Klassische Mikrobiologie

In der Önologie besteht die Technik der direkten Untersuchung von Mikroorganismen darin, eine Probe eines gärenden Mosts oder eines fertigen Weins zu entnehmen, um sie mithilfe einer Zählkammer unter dem Mikroskop zu betrachten (Abb. 1A). Die Mikroorganismen von Interesse werden identifiziert und ausgezählt. Durch die Verwendung von Farbstoffen ist es möglich, geschädigte Zellen von intakten zu unterscheiden. Die Identifizierung und Zählung von Mikroorganismen auf der Petrischale ist dagegen eine indirekte Methode, da sie das Wachstum von Mikroorganismen aus der Ausgangsprobe ermöglicht. In diesem Fall werden verschiedene Verdünnungen einer Probe auf Petrischalen ausplattiert und ein bis sieben Tage lang bebrütet. Die interessierenden Mikroorganismen werden nicht mehr einzeln, sondern als koloniebildende Einheiten (KBE) erkannt und gezählt (Abb. 1B). Die Analyse in Petrischalen wird bei der Weinherstellung häufig eingesetzt, da sie es ermög-

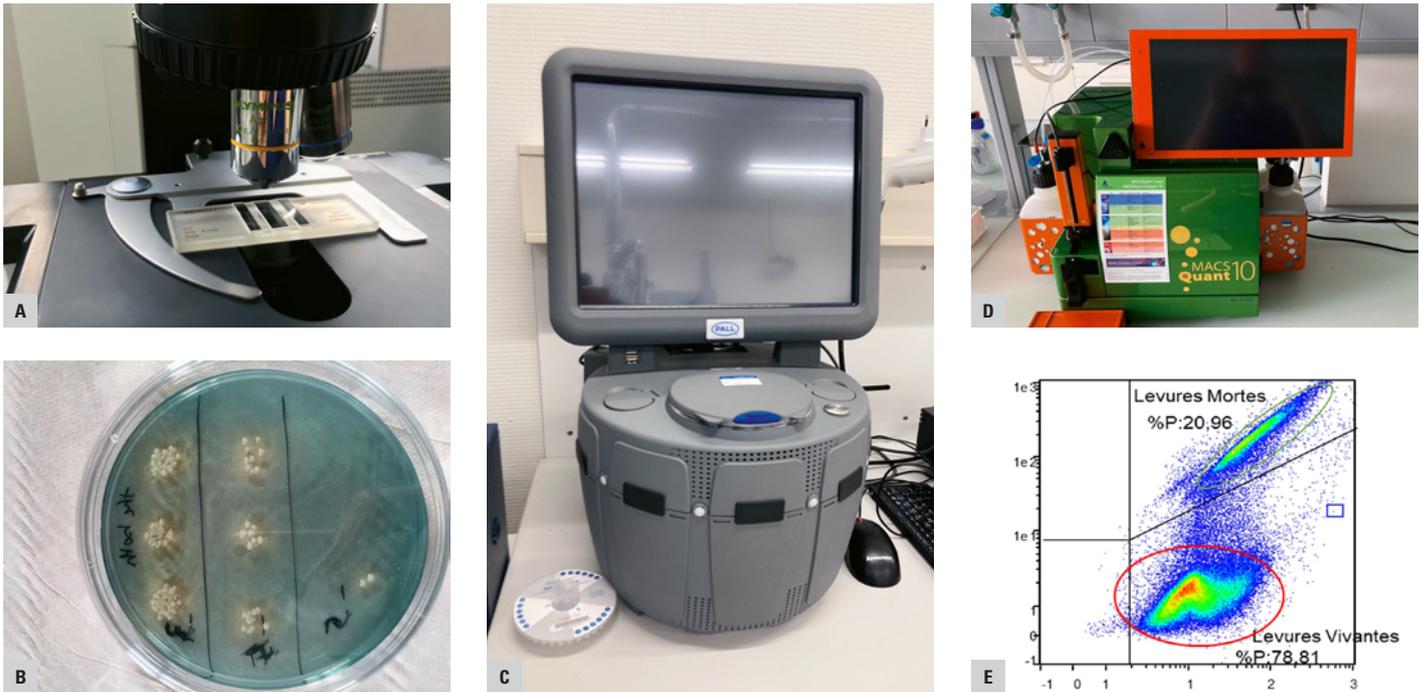


Abb. 1: Die drei Kategorien von Werkzeugen in der Mikrobiologie. **A.** Direkte Zählung der Mikroorganismen. Ein Aliquot der Probe wird in die Zählkammer (weisser Pfeil) geladen und die Mikroorganismen werden durch Beobachtung unter dem Mikroskop ausgezählt.

B. Wachsende Hefekolonien auf Gelatinemedium in Petrischalen. **C.** Das PCR-System Genedisc von Pall, das von der Ecole HES-SO in Changins verwendet wird. Die DNA-Proben werden in die Mikrovertiefungen der Scheibe geladen (schwarzer Pfeil). Nach dem Einsetzen in das System (weisser Pfeil) findet die PCR-Reaktion in den Wells statt und das Ergebnis wird auf dem Bildschirm angezeigt. **D.** Der Durchflusszytometrie-Analysator MACSQuant von Miltenyi Biotec, der von Agroscope verwendet wird. Ein kleines Volumen (20–100 Mikroliter) der Probe, die die Mikroorganismen enthält, wird automatisch aus einer Nadel (weisser Pfeil) entnommen und analysiert. **E.** «Dot-plot»-Grafik zur Veranschaulichung der Ergebnisse einer durchflusszytometrischen Analyse. Jede Zelle wird durch einen Punkt (blaues Quadrat) dargestellt. Gruppen von Zellen, die die gleichen Merkmale der von bestimmten Reagenzien emittierten Fluoreszenz aufweisen, werden in Gruppen zusammengefasst. Die Grafik zeigt die Populationen lebender (rot eingekreist) und toter (grün eingekreist) Zellen und ihren prozentualen Anteil an der Gesamtzahl der Zellen.

licht, die Art des Mikroorganismus durch die Beobachtung der Kolonien oder durch die Verwendung selektiver Medien (z.B. DBDM-Medium für *Brettanomyces*/Dekkera) zu erkennen. Im Allgemeinen sind diese analytischen Werkzeuge einfach in der Anwendung und kostengünstig. Im Gegensatz dazu können Zählung und Bestimmung sowohl unter dem Mikroskop als auch auf Schalen eine gewisse analytische Variabilität aufweisen. Darüber hinaus kann die Kultivierung auf Schalen mehrere Tage dauern, was die Überwachung der Fermentation nicht unerheblich beeinflusst. Ausserdem werden bei der Auszählung in Schalen lebende Mikroorganismen, die nicht kultivierbar sind (Viable not Cultivable, VNC), nicht berücksichtigt. Dies kann zu falschen negativen Ergebnissen führen (Ergebnis: keine *Brettanomyces*, obwohl sie im VNC-Zustand vorhanden sind).

Die moderne Molekularbiologie

Die Molekularbiologie befasst sich mit der Untersuchung und Charakterisierung von Nukleinsäuren, wie z.B. der DNA. Die DNA ist ein Polymer aus vier Nukleotiden: Adenosin (A), Thymin (T), Guanosin (G) und Cytosin (C), die in verschiedenen Kombinationen über die gesamte Länge des DNA-Moleküls in einer Sequenz angeord-

net sind. Die Nukleotidsequenz führt zu DNA-Abschnitten (Genen), die die Informationen für den Proteinaufbau tragen. Die Nukleotidsequenz der DNA variiert je nach Art der Organismen stark. Dies wird in der Önologie genutzt, um die vorhandenen Mikroorganismen mit einer sehr feinen Auflösung genau zu bestimmen. Mit molekularen Methoden ist es möglich, verschiedene Stämme von *S. Cerevisiae* nachzuweisen. Eine der in der Önologie weit verbreiteten molekularen Methoden ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die Methode ermöglicht die Analyse von DNA, die in geringen Mengen innerhalb von Proben vorkommt (Beispiel: eine nicht geimpfte Mostprobe). Darüber hinaus ermöglicht diese Technik die Bestimmung spezifischer Sequenzen, die für die verschiedenen in der Probe vorhandenen Bakterien- oder Hefearten charakteristisch sind. Ein PCR-System für die Önologie (Genedisc, Pall) ist im Handel erhältlich und wird in den Labors der HES-SO in Changins verwendet. Nach der Zell-Lyse, also dem Zerfall der Zelle durch Schädigung der äusseren Membran, und der DNA-Extraktion ist es dank einer PCR-Reaktion möglich, *S. Cerevisiae*, *Brettanomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* sowohl lebend als auch VNC innerhalb von drei Stunden zu identifizieren (Abb. 1C). Obwohl die molekularen Werkzeuge spezifisch und äusserst empfindlich sind, liefern sie in der Regel keine funkti-

onellen Informationen (Lebensfähigkeit, Stoffwechselaktivität usw.) über die untersuchte Mikroorganismenpopulation. Daher sind andere Methoden erforderlich, die die Zellen unter diesem Gesichtspunkt analysieren.

Die Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FCM) ist eine Methode, die im biomedizinischen Bereich äusserst häufig eingesetzt wird. Mit dieser Technik kann man eine extrem hohe Anzahl von Zellen charakterisieren und spezifische Informationen zu jeder analysierten Zelle liefern. Kurz gesagt: In einem Zytometer (Abb. 1D) werden die Zellen nacheinander durch ein Fluidsystem bis zu einem Messbereich geführt. Dort werden sie von einem Laserlichtstrahl angeregt und die emittierte Fluoreszenz wird von einem Detektor gesammelt. Die Zellen werden schliesslich mithilfe eines Computers als Punkte auf sogenannten Dot-Plots dargestellt, die auf der X- und Y-Achse eine aufsteigende Skala der Fluoreszenzwerte zeigen (Abb. 1E). Fluoreszenz wird direkt von Reagenzien emittiert, die den physiologischen Zustand der Zellen anzeigen. In diesem Zusammenhang sind Fluoreszenzsonden für den Stoffwechsel, die Lebensfähigkeit oder zur phänotypischen Identifizierung erhältlich. In der Önologie wurde die FCM erfolgreich angewandt, um den physiologischen Zustand (lebende/tote Zellen) und die Konzentration von Mikroorganismen während der Weinbereitung zu bestimmen. Ausserdem konnten mit dieser Methode VNC-Zellen nachgewiesen werden, die von konventionellen Techniken nicht erfasst werden. Im Allgemeinen liefert die FCM in sehr kurzer Zeit (wenige Minuten) Informationen über die Mikrobiologie der Gärung und kann fast als «Online»-Tool betrachtet werden. Im Handel erhältlich sind Geräte und Reagenzien, die für die mikrobiologische Analyse von Most, Gärung oder fertigem Wein optimiert sind (z.B. das Sysmex-System). Sie können relativ einfach in önologischen Mikrobiologielabors eingesetzt werden. FCM wird bei Agroscope in Changins verwendet und weiterentwickelt und wird zunehmend an Bedeutung gewinnen sowohl für die analytische Überwachung der Weinbereitung im Keller als auch für Experimente auf Laborebene wo es zur detaillierten Untersuchung der den Gärungen zugrunde liegenden zellulären Mechanismen dienen soll (Abb. 2).

Schlussfolgerungen

Die im Artikel beschriebenen analytischen Werkzeuge haben sowohl Vor- als auch Nachteile. Herkömmliche mikrobiologische Analysen bieten phänotypische Identifikationsmöglichkeiten und sind einfach durchzuführen. Sie können jedoch eine analytische Variabilität und lange Laufzeiten aufweisen. Molekularbiologische Methoden sind zwar äusserst spezifisch und empfindlich, können aber in der Regel keine funktionellen Informationen auf zellulärer Ebene liefern. Die Durchflusszytometrie, eine leistungsstarke und vielseitige Methode zur Bestimmung der Funktionalität auf Einzelzelebene, ist zumindest derzeit nicht in der Lage, ein hohes Mass an phänotypischer Identifizierung zu liefern. Idealerweise sollten alle diese analytischen Möglichkeiten komplementär genutzt werden, da die eine die Grenzen der anderen auflösen kann. In diesem Sinne wird am Standort Changins ein Kompetenzzentrum für die F-

Mikrobiologisches Follow-up einer Fermentation durch Durchflusszytometrie

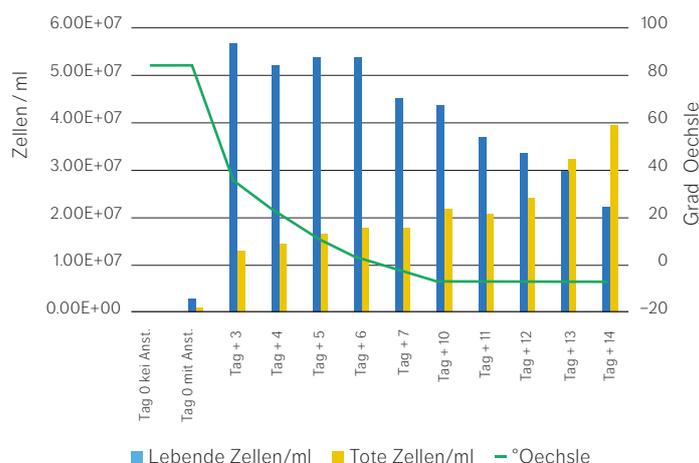


Abb. 2: Durchflusszytometrische Überwachung der alkoholischen Gärung eines mit *Saccharomyces Cerevisiae* inokulierten Chasselas-Mosts mithilfe eines 30 L-Bioreaktors. In blau die Konzentration (Zellen/ml) der lebenden Hefen, in gelb die Konzentration der toten Zellen. Die Kurve beschreibt den Trend der gemessenen Densitometriewerte in Grad Oechsle.

schung im Bereich der önologischen Mikrobiologie entwickelt (Zusammenarbeit zwischen Agroscope und der HES-SO Changins). Die Möglichkeit, verschiedene und sich idealerweise ergänzende Methoden zur mikrobiologischen Überwachung zu entwickeln, könnte für die Hauptakteure im önologischen Bereich, die Produzenten und kantonalen Laboratorien, von Vorteil sein. ■



GILLES BOURDIN

Agroscope, Nyon
gilles.bourdin@agroscope.admin.ch



FEDERICO SIZZANO

Agroscope, Nyon
federico.sizzano@agroscope.admin.ch

Marie Blackford, Fabrice Lorenzini,
Christoph Carlen, Agroscope, Nyon
Scott Simonin, Benoit Bach, Serge Hautier, HES-SO Changins