



Slutrapport/guideline

Brug af 16S rRNA gensekventering til processtyring for konstant holdbarhed

Steffen Jørgensen og Anette Granly Koch

19. december 2019

Projekt nr. 2005327

Version 1

Init. STJO/MT/AGLK

Sammendrag

Baggrund

Kødindustrien oplever myndighedskrav og kundekrav om dokumentation for en ensartet, høj mikrobiologisk sikkerhed og holdbarhed af kødprodukter. I dag udtages mange prøver til dokumentation af mikrobiologi i forbindelse med færdigvarekontrol, holdbarhedsforsøg og hygiejneovervågning. Der udtages prøver til analyse for specifikke bakterier samt totalkim og/eller mælkesyrebakterier – metoder, som er baseret på dyrkning af bakterier. Derfor får man kun svar på om det, man leder efter, er til stede i en prøve. Med de nye molekylærbiologiske metoder er det muligt at få et langt mere nuanceret svar på, hvilke bakterier en prøve indeholder, og det uden at skulle dyrke bakterierne.

Formål

Formålet med projektet har været at undersøge, om 16S rRNA gensekventering med efterfølgende dataanalyse er et egnet værktøj til at beskrive og kortlægge, hvilke bakterier der findes i produktionsmiljø, råvarer og færdigpakkede forædlede kødprodukter, samt identificere hvordan molekylærbiologiske metoder kan blive et procesværktøj, som fødevarer virksomheder kan anvende til proceskontrol og troubleshooting.

Konklusion

Den optimerede "16S-analysemetode" med DNA-oprensning, amplificering af et stykke 16S rRNA gen (V3-V4) og sekventering af dette stykke 16S rRNA gen (ca. 465 bp) giver en god beskrivelse af bakteriesammensætningen i en prøve. Dette er vist for prøver med designede blandinger af bakterier samt prøver fra fødevarer virksomheder.

Med metoden er det muligt at identificere bakterier, der har en holdbarhedsforringende effekt på forædlede kødprodukter. Metoden kan måle et lavt antal bakterieceller i en prøve, dog ikke i niveauet 1 cfu/25 g.

Den efterfølgende databehandling kan identificere bakterierne ned til slægtsniveau med stor nøjagtighed. Der foreligger en større usikkerhed ved identifikation af organismer på artniveau. Den amplificerede 16S rRNA sekvens (V3-V4) er ikke lige god til at differentiere mellem arter i alle slægter. Fx er V3-V4 bedre til at differentiere mellem streptokok-arter end mellem Actino-arter. Hvor robust artsresultatet er, varierer således fra organismegruppe til organismegruppe.

"16S-metoden" kan anvendes til:

- identifikation af mikroorganismer, som er årsag til fordærv (fordærv kan observeres som fx pustning, misfarvning, synlig vækst, dårlig lugt osv.)
- identifikation af, hvor i en produktionsproces fordærvelsesbakterier introduceres
- identifikation af enkelte kolonier fra en agarplade

Baggrund

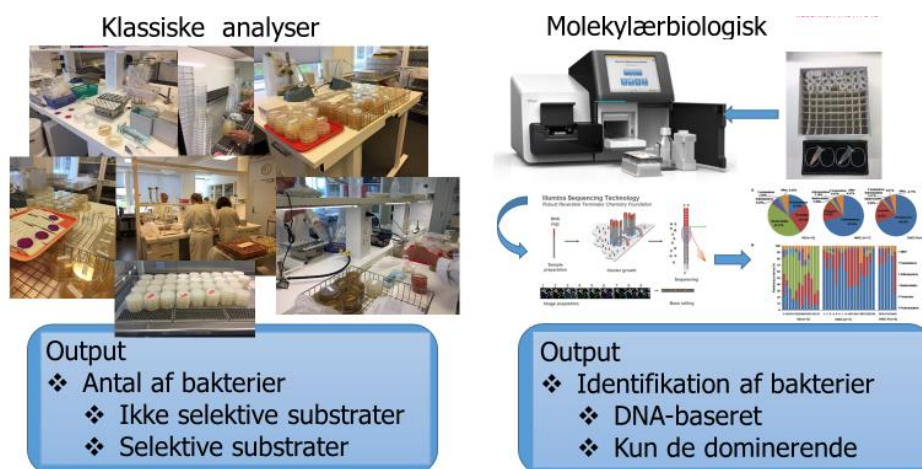
Indledning

Kødindustrien oplever myndighedskrav og kundekrav om dokumentation for en ensartet, høj mikrobiologisk sikkerhed og holdbarhed af kødprodukter. I dag udtages mange prøver til dokumentation af mikrobiologi i forbindelse med færdigvarekontrol, holdbarhedsforsøg og hygiejneovervågning. Der udtages prøver til analyse for specifikke bakterier samt totalkim og/eller mælkesyrebakterier – metoder, som er baseret på dyrkning af bakterier. Derfor får man kun svar på om det, man leder efter, er til stede i en prøve. Med de nye molekylærbiologiske metoder er det muligt at få et langt mere nuanceret svar på, hvilke bakterier en prøve indeholder, og det uden at skulle dyrke bakterierne.

Formål

Formålet med projektet har været at undersøge, om 16S rRNA gensekventering med efterfølgende dataanalyse er et egnet værktøj til at beskrive og kortlægge, hvilke bakterier der findes i produktionsmiljø, råvarer og færdigpakkede forædlede kødprodukter, samt identificere hvordan molekylærbiologiske metoder kan blive et procesværktøj, som fødevarer virksomheder kan anvende til proceskontrol og troubleshooting.

Målet er at opnå en afklaring af, hvordan industrien kan gå fra klassiske mikrobiologiske analyser til molekylærbiologiske analyser, eller hvordan kombinationen af klassiske analyser og molekylærbiologiske analyser vil give værdifuld øget viden om produktionsprocesser og produkter.



Figur 1. Forskel på klassiske mikrobiologiske metoder og molekylærbiologiske metoder

Projektets resultater

Projektet bestod af følgende aktivitetsfaser:

- Optimering af 16S rRNA gensekventeringsprotokoller, inklusive prøveforberedelse og DNA-ekstraktion
- Indsamling og analyse af prøver fra produktionsvirksomheder
- Optimering af dataanalyse med henblik på senere implementering i en produktionsvirksomhed
- Vurdering og perspektivering af 16S-metoden

Metodeoptimering

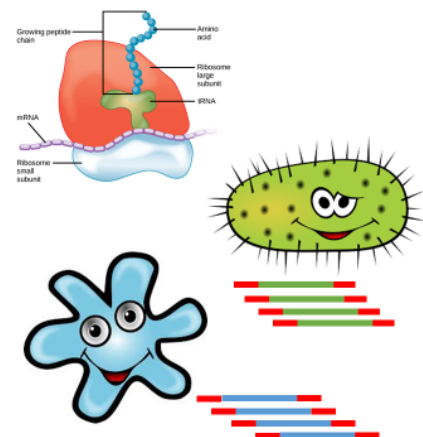
Under metodeoptimeringen har fokus været på at reducere detektionsgrænsen, så prøver med lave kimalt også kunne analyseres med 16S-metoden. For miljøprøver kunne detektionsgrænsen reduceres ved at svabre store områder, evt. kombineret med centrifugering eller filtrering. Herefter var det muligt at identificere, hvilke bakterier der var i prøven og dette ned til 1 log cfu/ml prøve.

16S rRNA gensekventering er en semikvantitativ metode, der viser den relative mængde af de identificerede bakterier. Det er således ikke muligt at vurdere, om fx 10% Brochotrix svarer til 10 CFU eller 10.000 CFU pr. gram prøve. Derfor bør en 16S rRNA gensekventering altid ledsages af et kimalt, dersom man ønsker en vurdering af, i hvor stort et antal de identificerede bakterier forekommer. Er der blot behov for at identificere, hvilke bakterier der er til stede (uden vurdering af antal), da kan kimaltet udelades, dersom man er sikker på, at der er mindst 2-3 log levedygtige bakterier i prøven. Ved lavere kimalt bør der altid medtages en kimaltsbestemmelse.

Ved optimeringen blev metodens robusthed også vurderet. Den omfattede:

- Sikring af, at der blev anvendt en robust og effektiv oprensning af DNA, hvilket er essentielt for korrekt kvantificering af den relative fordeling af bakterie-species i en prøve/den mikrobielle komposition.
- Fastsættelse af kriterier for, hvordan interaktion fra DNA fra inaktiverede/døde celler undgås eller minimeres.
- Fastsættelse af kriterier for, hvordan data skal håndteres i forhold til, at nogle bakterieceller har væsentligt flere kopier af 16S rRNA genet end andre.
- Optimering af datahåndteringen, så DNA fra andre typer celler end bakterier fx kloroplast og mitokondrier fra krydderier, soja og kød ikke påvirker resultatet for bakteriesammensætning.

- 16S rRNA genet koder for et stykke RNA i ribosomerne
 - Ribosomer: Der hvor den genetiske kode "oversættes" til protein.
- 16S rRNA genet består af **konservede** OG **variable regioner**, der er unikke for forskellige bakteriearter
- De variable regioner fungerer som unik stregkode for bakteriearten
- Sekventering og analyse kan give et udtryk for, hvilke arter der er tilstede i prøven samt deres mængdeforhold
- 16S teknikken er ikke dyrkningsbaseret, derfor identificeres der også de bakterier, der ikke kan dyrkes
- 18S/ITS (som 16S), bruges til gær og skimmel (eukaryoter)



Figur 2. Fakta om 16S rRNA gensekventering.

Prøveindsamling på virksomheder Der blev indsamlet prøver fra to forskellige virksomheder, som producerer forædlede kødprodukter. Fra hver virksomhed blev der hen over en toårig periode indsamlet prøver 4-5 gange. Ved hver prøveindsamling blev der indsamlet prøver fra produktionsmiljøet (svaberprøver) samt produktprøver, der blev lageret ved 5°C, indtil prøverne var sensorisk uacceptable.

Analyser

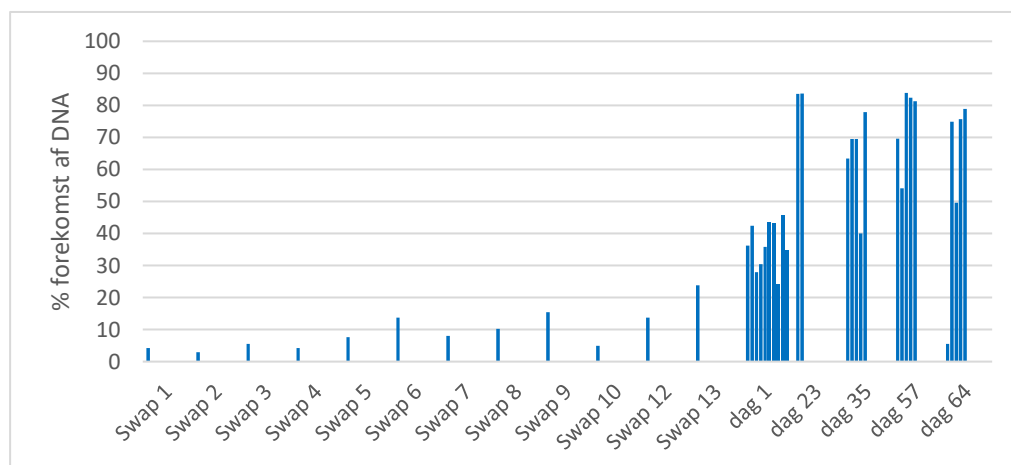
Alle prøver blev analyseret for:

- Traditionelle "totalkim" på BHI og APT
- Sensorisk accept i relation til mikrobielt fordærv (lugt)
- Mikrobiel sammensætning, der inkluderede følgende trin:
 - DNA-oprensning (Qiagens Blood and Tissue kit)
 - PCR af 16S rRNA genet (V3-V4 regionen)
 - 16S rRNA gensekventering (Illumina MiSeq)
 - Sekvensanalyse (BION pipeline samt R *phyloseq*+*Ampvis2*)
 - Udarbejdelse af kvalitetsrapport version 1.0

Resultatbearbejdning pr. forsøgsserie

Prøveindsamling med dataanalyse viste, at det var muligt at identificere, hvilke bakterier der blev dominerende i et produkt under lagring, og hvilke der var dominerende, når produktet var fordærvet. Når fordærvelsesorganismene var identificerede ved afslutningen af holdbarhedsforsøgene, var det muligt at gennemgå de analyserede miljøprøver fra produktionen og påvise, hvor de holdbarhedsbegrænsende bakterier kunne identificeres. Eksempler er vist i figur 3 og 4.

I figur 3 ses et eksempel, hvor den holdbarhedsbegrænsende organisme kunne påvises i stort set alle miljøprøver, mens figur 4 viser et eksempel, hvor den begrænsende bakterie kun blev fundet nogle steder i produktionsmiljøet.



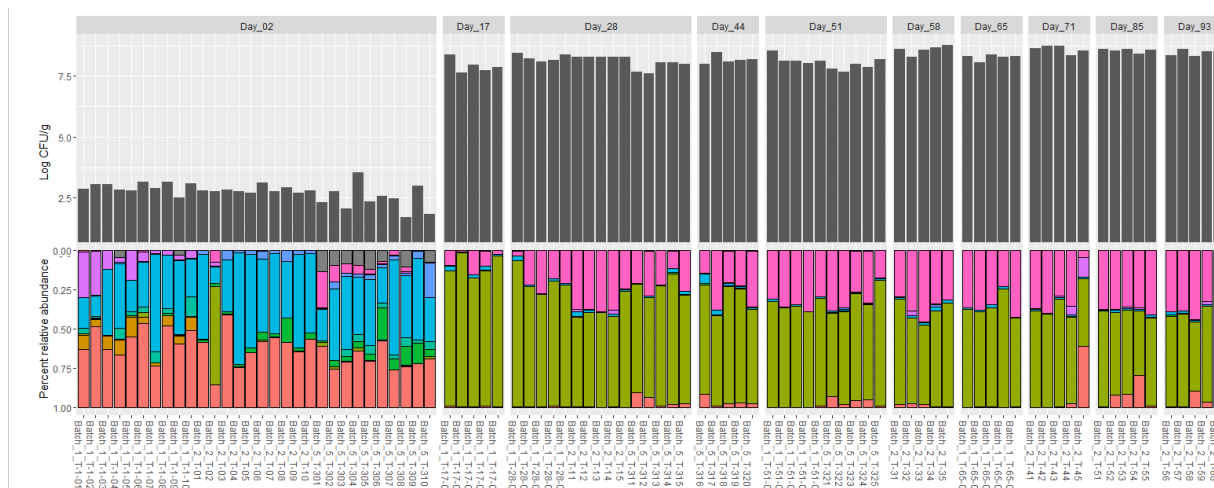
Figur 3. Den identificerede fordærvelsesbakterie udgjorde 80% af alt bakterie-DNA (fra produktet) på dag 23, mens den på dag 1 udgjorde 40%. Bakterien kunne påvises i alle svaberprøver fra produktionsmiljøet.



Figur 4. Den identificerede fordævelsesbakterie udgjorde 90% af alt bakterie-DNA (fra produktet) på dag 17, mens den på dag 1 kun udgjorde 1%. Bakterien kunne påvises i nogle svaberprøver fra miljøet, men ikke i alle.

Resultatbearbejdning over tid

De samme produktionslinjer og produkttyper blev analyseret flere gange i perioden. Et eksempel på resultater fra produkt/produktionslinje analyseret 3 forskellige gange ses i figur 5. Heraf ses, at de samme 2 bakterier er årsag til produktets fordærv (længde efter sidste holdbarhedsdato). Figur 5 viser også, hvor i produktionsmiljøet den/de pågældende bakterier findes (hver bakterie med en farve i figuren). Det er således muligt over tid at kontrollere, om den florasammensætning, et givent produkt eller produktionsmiljø har, forbliver den samme. Dette kan måske i fremtiden bruges som en proceskontrol og analyse af, om et produktionsmiljø er i balance – dvs. uændret over tid.



Figur 5. Ændring i mikrobiom sammensætning over tid i produkter og miljøprøver. Hver bakterie er illustreret med en farve.

Dataanalyse

Ved sekventering fås store mængder sekvensdata og data for bakterieidentifikationer. Kvaliteten af disse data skal vurderes og renses for DNA-sekvenser, der fx tilhører andre organismer end bakterier. Data skal herefter systematiseres og visualiseres samt sammenholdes med relevante procesdata fra den pågældende produktion, så det let kan anvendes i fx proceskontrol eller ved troubleshooting. I projektet er software fra BION anvendt, og programmering er gennemført i R (*phyloseq* samt *Ampvis2*).

Analyse

Fremtidens brug af 16S rRNA gensekventering

For at fødevarerindustrien skal kunne bruge 16S-metoden i fremtiden, er der behov for billigere og hurtigere instrumenter til sekventering end fx Illumina Miseq. Miseq benyttes især til helgenomsekventering, der er langt mere omfattende end en 16S-analyse. Håndholdte sekventeringsinstrumenter med hurtig svartid vil derfor være interessante til industriel anvendelse, og et bud er MinION fra Oxford nanopore, der ikke er større end en chokoladebar og kan producere sekvensdata på mindre end 1 time. Indledende test har været lovende, og den håndholdte sekventeringsteknologi (figur 6) kan identificere bakteriesammensætninger inkl. identificere holdbarhedsbegrænsende bakterier.

For at teknologien for alvor kan implementeres i produktionsvirksomheder, er en samlet optimering af de forskellige trin vigtig, således at prøveudtag og -håndtering, PCR og sekventering forgår så hurtigt og så nemt som muligt.

Datahåndtering

Udover et optimeret og brugervenligt analysekoncept skal databehandlingen systematiseres i et IT-værktøj, således at de meget store datamængder analyseres og visualiseres på en nem og overskuelig måde. Et sådant brugervenligt IT-værktøj til dataanalyse er under udvikling i et igangværende projekt. Datahåndtering vil fortsat foregå med koder i R; Phyloseq, men der udvikles en brugervenlig brugerflade, hvor data analyseres i en software, hvor der med drop down-bokse kan vælges forskellige data til figurer og kontrolkort, ligesom det bliver muligt for brugeren at sammenholde 16S-data med forskellige procesparametre fra den enkelte virksomheds egenkontrolldata.



Figur 6. Håndholdt 16S rRNA gensekventering. Oxford Nanopore MinION sekventeringsmaskine (tv). Oxford Nanopore Voltrax instrument til forberedelse af sekventeringsmateriale (PCR m.m.) (th).

Konklusion

Den optimerede analysemetode med DNA-oprensning, amplificering af en del af 16S rRNA-genet og efterfølgende sekventering giver en god beskrivelse af bakteriesammensætningen i en prøve. Dette er vist for prøver med designede blandinger af bakterier samt miljø- og produktprøver fra fødevarer virksomheder. Med 16S-metoden er det muligt at identificere bakterier, der har en holdbarhedsforringende effekt på forædlede kødprodukter. Metoden kan måle lave antal af bakterieceller i en prøve, men dog ikke i niveauet 1 cfu/25 g. Med den efterfølgende databehandling kan bakterierne identificere ned til slægtsniveau med stor nøjagtighed, og ofte til artsniveau med acceptabel nøjagtighed.

Metoden 16S rRNA gensekventering kan anvendes til at:

- påvise ikke-dyrkbare bakterier i produkter og miljøprøver
- beskrive bakteriefloraen i produktionsmiljø og produkter
- identificere, hvilken bakterie der har forårsaget fordærv uden at isolere bakterien (fordærv ses fx som misfarvninger, pustning/gasdannelse i produkter eller dårlig smag og lugt)
- finde kontaminationsveje for "ukendte" fordærvere
- kontrollere/validere en proces (fx fermentering, biokonservering)
- verificere kolonier på agarplader fx sorte kolonier på TSC-agar (sulfitreducerende clostridier)

Perspektivering

Fremtidens brug af 16S rRNA gensekventering har flere muligheder, men skal teknologierne anvendes til proceskontrol, kræver det overvejelser:

- Skal metoden være en specialanalyse eller driftsanalyse?
- Hvilken analysehastighed er acceptabel?
- Hvordan håndteres databehandling?
- Hvad er en acceptabel analyse/prøvepris?

Skal der anvendes on-line/at-line analyse med håndholdt sekventeringsudstyr som fx MinION, Two Pore Guy m.fl., skal metoden kunne:

- kortlægge bakteriesammensætningen i produktionsmiljø og produkter
- give svar på få timer
- vise, om uønskede fordærvere er til stede
- vise, om bakteriesammensætningen ændres over tid
- have en rimelig detektionsgrænse, som afhænger af kravet til analyseresultatets detaljeringsgrad (mange/få arter) og tid
- kombineres med en organismespecifik metode, fx PCR eller anden hurtigmetode (hvis de samme organismer altid er problemet)