

Isolierung und Charakterisierung der Bakteriozine von *Escherichia coli*-Isolaten aus Lebensmittelproben

Stefanie Orquera¹, Jennifer Andrack^{1,2}, Greta Gölz¹, Tassilo Seidler², Thomas Alter¹

¹ Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, Freie Universität Berlin ² Beuth Hochschule für Technik Berlin

Hintergrund

Steigende bakterielle Resistenzraten gegen Dekontaminationsmittel und Antibiotika führen zu einem erhöhten Interesse an geeigneten antimikrobiellen Alternativen im Bereich der Lebensmittelherstellung und -konservierung. Eine Möglichkeit stellen Bakteriozine dar. Es sind ubiquitär in der Umwelt vorkommende, von Bakterien gebildete Proteine, die vornehmlich Stämme gleicher oder verwandter Art lysieren. Diese antimikrobiell wirkenden Proteine können auch den Anforderungen des Verbrauchers nach möglichst natürlichen Inhaltsstoffen nachkommen.

Ziel dieser Studie ist es, geeignete Bakteriozine gegen ein möglichst breites Spektrum an in Lebensmitteln vorkommenden *Escherichia (E.) coli*-Stämmen zu isolieren. Mit diesen Bakteriozinen soll ein effektives Dekontaminationsmittel für den Gebrauch auf Oberflächen, aber auch direkt im Lebensmittel entwickelt werden. Zunächst wurden 90 *E. coli*-Stämme aus Lebensmittelproben isoliert und auf die Bildung von Bakteriozinen über ihre lysierende Wirkung gegenüber acht Indikatorstämmen getestet. Die Bakteriozinbildner wurden mittels PCR auf das Vorhandensein bekannter Bakteriozingene hin untersucht und die Größe der Bakteriozine über eine SDS-PAGE bestimmt.

Material und Methoden

Spot-Assay

200 µl Übernachtskultur der jeweiligen Indikatorstämmen wurden mit 3 ml eines 0,5 % Luria Bertani (LB)-Softagars vermischt und auf eine LB-Platte aufgebracht. Auf diesen Overlay wurden 5 µl Übernachtskultur der 90 *E. coli*-Isolate aus Lebensmittelproben aufgespottet. Die Platten wurden 24 h bei 37 °C aerob bebrütet und die Lyse des Indikatorstammes bewertet. Als Indikatorstämmen wurden *E. coli* DH5α, C600, Cremehogs, Φ, P400, 5K, Row und *Shigella sonnei* 17 verwendet. Die Lebensmittelproben waren tierischen und pflanzlichen Ursprungs.

Bakteriozin-Extraktion

Die im Spot-Assay positiven Übernachtskulturen der *E. coli*-Stämme wurden 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl PBS mit 0,5 % Tween 80 und einem pH-Wert von 2 resuspendiert und für 5 min auf 99 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Suspension neutralisiert, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurde ein Spot-Assay mit dem Überstand durchgeführt und die Lyse-Eigenschaften gegenüber den Indikatorstämmen bewertet.

PCR zum Nachweis bekannter Colicin-Gene

Die DNA der in der Übernachtskultur lysierenden Isolate wurde mittels Chelex-Methode extrahiert und die PCR nach Smajs *et al.* (2010) zur Detektion der Gene der 23 Colicine A, B, D, E1-9, Ia, Ib, K, L, M, N, U, V, Y, 5, 10 und der 5 Microcine C7, Js, J25, B17 und H47 durchgeführt. Zur Bestätigung wurden die PCR-Produkte der Gene E1-E9, Y, U, Ia, Ib, 5, 10 anschließend sequenziert.

SDS-PAGE

Zur Größenbestimmung der Bakteriozine wurde eine SDS-PAGE nach Laemmli (1970) durchgeführt. 50 µg Protein der Extraktion wurden mit 2x Laemmli-Puffer 1:1 vermischt, 5 min auf 95 °C erhitzt und auf einem 7,5 % SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel auf einer LB-Platte mit einem Gemisch aus 600 µl einer Übernachtskultur des Indikatorstammes *E. coli* DH5α und 10 ml Softagar überschichtet. Die Platten wurden für 24 h bei 37 °C aerob inkubiert.

Ergebnisse

Lysespektrum der Übernachtskulturen

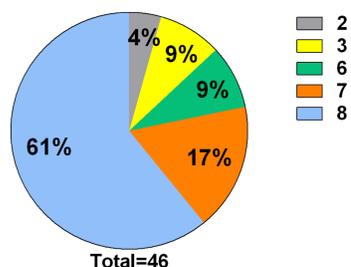


Abb. 1: Anzahl an Indikatorstämmen, die von den Bakteriozinen aus den Übernachtskulturen lysiert werden konnten

Spot Assay der Übernachtskulturen

Bei 46 der 90 *E. coli*-Isolate konnten Bakteriozine in der Übernachtskultur über ein Spot-Assay festgestellt werden. Von diesen 46 Isolaten lysierten die meisten (61 %) alle 8 Indikatorstämmen (Abb. 1).

Lysespektrum der Extrakte

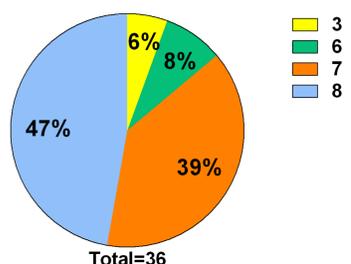


Abb. 2: Anzahl an Indikatorstämmen, die von den Bakteriozinen im Extrakt lysiert werden konnten

Spot Assay der Extrakte

Eine lytische Aktivität konnte in 36 der 46 getesteten Bakteriozin-Extrakte nachgewiesen werden. Das Lysespektrum umfasste auch bei den Extrakten meist (47 %) alle 8 Indikatorstämmen (Abb. 2). Die höchste Resistenz gegenüber den Bakteriozinen wies der Indikatorstamm *Shigella sonnei* 17 auf, der deutlich seltener lysiert werden konnte.

Anzahl an Bakteriozin-Genen pro Isolat

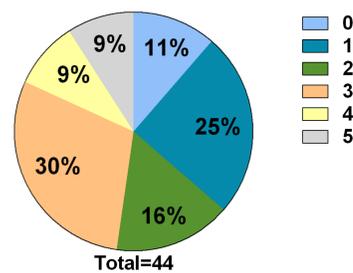


Abb. 3: Anzahl an Bakteriozin-Genen, die mittels PCR bei den Bakteriozinbildnern nachgewiesen werden konnten.

PCR

Von 44 in der Übernachtskultur lysierenden Isolaten, zeigten 91 % mindestens eines der 28 untersuchten Bakteriozin-Gene. Am häufigsten kamen ein bis drei Bakteriozin-Gene gleichzeitig vor (Abb. 3). Ein vermehrtes Vorkommen bestimmter Gen-Kombinationen konnte allerdings nicht festgestellt werden.

Anzahl der Isolate mit Bakteriozin-Genen

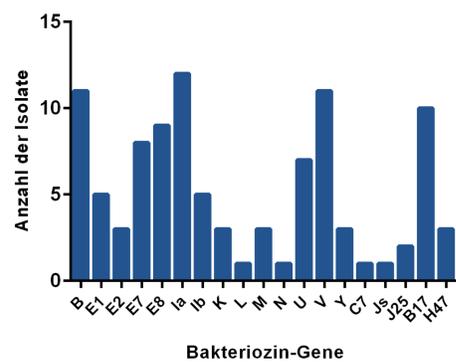


Abb. 4: Anzahl an Isolaten, bei denen die einzelnen Bakteriozin-Gene nachgewiesen werden konnten.

SDS-PAGE mit DH5α-Overlay

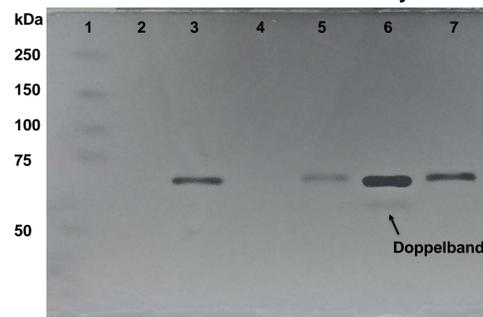


Abb. 5: Lytische Aktivität von Proteinextrakten nach der SDS-PAGE (1= Marker (BioRad), 2 = Negativkontrolle (DH5α), 3-7 Extrakte der Bakteriozinbildner)

SDS-PAGE

In der SDS-PAGE wiesen 12 von 24 Proben eine Lysebande in der Höhe zwischen 50 und 75 kDa auf. Bei einem Extrakt waren zwei Lysebanden sichtbar (Abb. 5).

Zusammenfassung

Im Spot-Assay konnte gezeigt werden, dass 61 % der 90 untersuchten *E. coli*-Isolate über Lyse-Eigenschaften gegenüber den verwendeten Indikatorstämmen verfügen. Dies stimmt mit Daten der Literatur überein, bei denen 14 % bis 64 % der untersuchten *E. coli*-Stämme Bakteriozinbildner waren.

Nach der Extraktion lysierten noch 82 % der Bakteriozinbildner mit ähnlichem Spektrum. Bei den restlichen 18 % wurden die Bakteriozine wahrscheinlich über die Extraktionsmethode inaktiviert. Auffällig ist die geringe Sensitivität gegenüber dem Stamm *Shigella sonnei* 17. Für weitere Untersuchungen könnte somit der Einsatz der acht Indikatorstämmen auf *Shigella sonnei* 17 (geringste Sensitivität) sowie einen Indikatorstamm mit hoher Sensitivität (z. B. DH5α bzw. K12-Row) reduziert werden.

Pro Isolat konnten bei 93 % 1-5 der untersuchten Bakteriozin-Gene nachgewiesen werden. Hauptsächlich handelte es sich hierbei um die Gene Ia und V. Es konnte keine häufig vorkommende Gen-Kombination festgestellt werden.

Die Proteine konnten mittels SDS-PAGE aufgetrennt und eine Lysebande auf der Höhe von 50 – 75 kDa nachgewiesen werden. Dementsprechend handelt es sich hierbei um Colicine, die in der Regel eine Größe von 25 bis 80 kDa aufweisen. Der Nachweis von zwei Colicinen in einem Isolat zeigt, dass auch mehr als ein Bakteriozin für die antimikrobielle Wirkung verantwortlich sein kann.

Die antimikrobielle Wirkung ausgewählter Bakteriozine auf kontaminierten Oberflächen und Lebensmitteln soll in Folgeversuchen untersucht werden.

Dieses Projekt wird vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie (ZIM Nr. KF2267305) gefördert.



Referenzen:
Smajs *et al.* (2010) Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor, BMC Microbiology 2010
Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227 (5259): 680-685

