

Keimzahlreduktion von *Escherichia coli* durch den Einsatz von Bakteriozinen

Jennifer Andrack, Greta Gölz, Thomas Alter, Stefanie Orquera
 Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, Freie Universität Berlin

Hintergrund

Tierische Lebensmittel sind häufig mit *Escherichia (E.) coli* kontaminiert. So wurden bei bis zu 93 % von untersuchtem Geflügelfleisch *E. coli* nachgewiesen (Chaudhari et al., 2007). Der Einsatz von Bakteriozinen stellt eine Möglichkeit zur Reduzierung der *E. coli*-Keimzahl in Lebensmitteln dar. Bakteriozine sind von Bakterien gebildete Proteine, die eine antimikrobielle Wirkung gegen Stämme der gleichen oder nah verwandter Arten aufweisen. Sie kommen ubiquitär in der Umwelt, somit auch natürlicherweise in Lebensmitteln, vor.

Ziel dieser Studie ist es, die Effizienz unterschiedlicher Bakteriozine in der Keimzahlreduktion des Indikatorstammes *E. coli* DH5 α bei 37°C (ideale Wachstumsbedingungen) und bei 4°C (Lagerungstemperatur für Fleisch) in Medium und später auf Fleisch und Oberflächen zu testen. Für die Versuche wurde das Konzentrat eines *E. coli*-Isolates aus Hackfleisch ausgewählt. Mittels PCR nach Smajs et al. (2010) konnten Gene der Colizine E2 und K sowie des Mikrozens B17 nachgewiesen werden.

Material und Methoden

Bakterienstämme und Bakteriozine

20 l Luria Bertani (LB)-Medium wurden mit den *E. coli*-Isolaten (Hackfleisch-Isolat bzw. DH5 α) inokuliert und bei 37°C aerob inkubiert. Nach 8 h wurde die Kultur zentrifugiert. Über die Tangentialflussfiltration wurden alle Substanzen unter 10 kDa abfiltriert und der Überstand auf 600 ml aufkonzentriert (Bakteriozinkonzentrat bzw. DH5 α -Konzentrat). Die Aufkonzentration wurde von Felgenträger & Co. durchgeführt. Die Konzentrate wurden bei -20°C gelagert.

Bestimmung der *E. coli*-Keimzahl in Medium

Die Übernachtskultur des *E. coli* DH5 α wurde mit LB-Medium auf eine Keimzahl von ca. 10⁷ KbE/ml eingestellt. Diese Kultur wurde 1:1 mit dem unverdünnten Bakteriozinkonzentrat, dem 1:50 verdünnten Bakteriozinkonzentrat bzw. dem DH5 α -Konzentrat bei 37°C bzw. 4°C gelagert. Parallel dazu wurde das Bakteriozinkonzentrat bzw. das 1:50 verdünnte Bakteriozinkonzentrat 1:1 mit LB-Medium bei 37°C bzw. 4°C gelagert. Zu definierten Zeitpunkten wurden jeweils 250 μ l entnommen, 5 min zentrifugiert und der Überstand für die AU-Bestimmung filtriert (0,2 μ m) sowie das Pellet für die KbE-Bestimmung in 250 μ l LB-Medium resuspendiert. Die KbE wurde im Drop plating Verfahren ermittelt.

Bestimmung der Bakteriozinkonzentration (AU/ml)

200 μ l Übernachtskultur des Indikatorstammes *E. coli* DH5 α wurden mit 0,5 % LB-Softagars auf eine LB-Platte aufgebracht. Jeweils 5 μ l einer seriellen 1:2-Verdünnungsreihe des sterilfiltrierten Überstandes wurden auf diesen Overlay gespottet und 24 h bei 37°C inkubiert. Die Activity Units (AU) berechnen sich aus dem Kehrwert der höchsten Verdünnungsstufe, bei der noch eine Lyse des Indikatorstammes erkennbar ist.

Ergebnisse

Bestimmung der *E. coli*-Keimzahl in Medium bei 37°C mit unverdünntem Bakteriozinkonzentrat

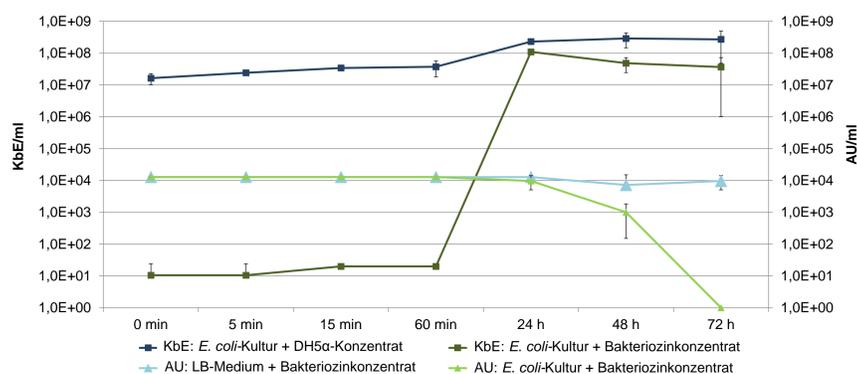


Abb. 1: Die Keimzahl des *E. coli* DH5 α mit (dunkelgrün) und ohne Bakteriozinkonzentrat (dunkelblau) sowie die Bakteriozinkonzentration in LB-Medium (hellblau) und in der Kultur des *E. coli* DH5 α (hellgrün) bei 37°C. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).

Bei 37°C konnte die *E. coli*-Keimzahl in Medium unmittelbar nach der Zugabe des Bakteriozinkonzentrats um 6 Log-Stufen gesenkt werden (Abb. 1). Diese Reduktion blieb über einen Zeitraum von 60 min konstant. Innerhalb von 24 h stieg die Keimzahl allerdings wieder auf das Niveau der Kultur mit dem DH5 α -Konzentrat an. Die Bakteriozinkonzentration in LB-Medium lag konstant bei 10⁴ AU/ml. Die Bakteriozinkonzentration in der *E. coli*-Kultur fiel hingegen nach 48 h um 1 Log-Stufe und nach 72 h unter die Nachweisgrenze.

Bestimmung der *E. coli*-Keimzahl in Medium bei 4°C mit unverdünntem Bakteriozinkonzentrat

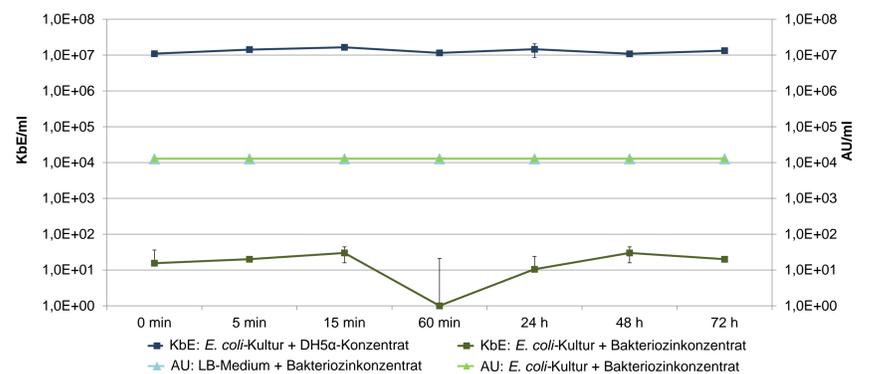


Abb. 2: Die Keimzahl des *E. coli* DH5 α mit (dunkelgrün) und ohne Bakteriozinkonzentrat (dunkelblau) sowie die Bakteriozinkonzentration in LB-Medium (hellblau) und in der Kultur des *E. coli* DH5 α (hellgrün) bei 4°C. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).

Auch bei 4°C Lagerung wurde die *E. coli*-Keimzahl unmittelbar nach der Zugabe des Bakteriozinkonzentrats um 6 Log-Stufen reduziert (Abb. 2). Die Keimzahl blieb über den gesamten Versuch geringfügig oberhalb bzw. unterhalb der Nachweisgrenze. Die Bakteriozinkonzentration in LB-Medium als auch in der *E. coli*-Kultur lag über den gesamten Zeitraum bei 10⁴ AU/ml.

Bestimmung der *E. coli*-Keimzahl in Medium bei 4°C mit 1:50 verdünntem Bakteriozinkonzentrat

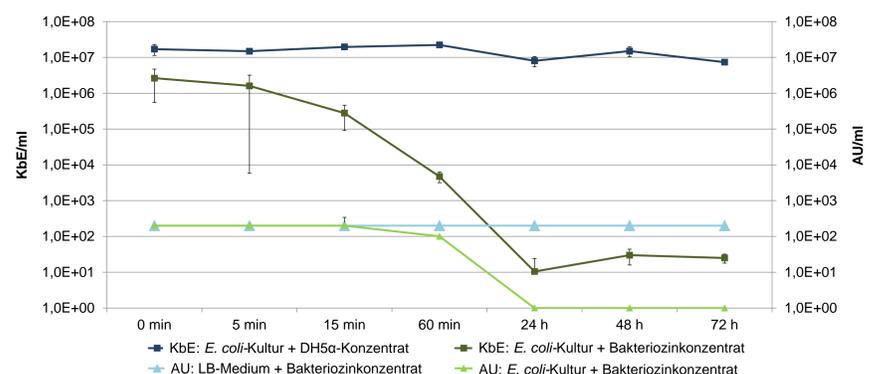


Abb. 3: Die Keimzahl des *E. coli* DH5 α mit (dunkelgrün) und ohne 1:50 verdünntes Bakteriozinkonzentrat (dunkelblau) sowie die Bakteriozinkonzentration in LB-Medium (hellblau) und in der Kultur des *E. coli* DH5 α (hellgrün) bei 4°C. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).

Unmittelbar nach der Zugabe des 1:50 verdünnten Bakteriozinkonzentrats wurde die *E. coli*-Keimzahl bei 4°C um eine und innerhalb von 60 min um 3 Log-Stufen gesenkt (Abb. 3). Nach 24 h stieg die Keimzahl allerdings um weniger als eine Log-Stufe an und blieb dann bis zum 72 h-Zeitpunkt konstant. Die Bakteriozinkonzentration in LB-Medium blieb konstant bei 10² AU/ml. Bei der *E. coli*-Kultur blieb die Bakteriozinkonzentration bis zu 60 min bei 10² AU/ml und fiel nach 24 h unter die Nachweisgrenze.

Zusammenfassung

Unmittelbar nach der Zugabe des unverdünnten Bakteriozinkonzentrats konnte die *E. coli*-Keimzahl bei 37°C und 4°C um 6 Log-Stufen gesenkt werden. Bei 37°C Lagerung stieg die Keimzahl allerdings innerhalb von 24 h wieder auf 10⁸ KbE/ml an. Bei 4°C Lagerung blieb die Keimzahl über den gesamten Versuch konstant bei ca. 10 KbE/ml. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um resistente Klone des *E. coli* DH5 α , die sich bei 37°C im Gegensatz zu 4°C wieder vermehren.

Um zu testen, ob auch geringere Bakteriozinkonzentrationen für eine Lyse ausreichen, wurde das Konzentrat 1:50 verdünnt (letzte Verdünnung mit lytischer Aktivität). Bei dem Einsatz des 1:50 verdünnten Konzentrats wurde die *E. coli*-Keimzahl ebenfalls um 6 Log-Stufen gesenkt, allerdings erst innerhalb von 24 h. Danach blieb die Keimzahl wieder konstant bei ca. 10 KbE/ml. Die Bakteriozine treffen wahrscheinlich bei dieser geringen Konzentration nicht sofort auf die Bakterien und lysieren diese erst über einen längeren Zeitraum hinweg.

Zusammenfassend ist der Einsatz von Bakteriozinen zur *E. coli*-Keimzahlsenkung bei 4°C im Gegensatz zu 37°C sehr gut geeignet. Die Keimzahlsenkung um 6 Log-Stufen wird über einen Zeitraum von 72 h beibehalten. Daher sind weitere Versuche zur *E. coli*-Keimzahlsenkung über den Einsatz von Bakteriozinkonzentraten bei Kühltemperaturen in Fleisch und auf Oberflächen geplant.

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
 Chaudhari, S. P.; Tiwari, J. G. and Roychoudhury, P. Occurrence of *Escherichia coli* in smoked meat, *Indian Journal of Animal Sciences* 2007