

# Keimzahlreduktion von *Escherichia coli* durch den Einsatz von Colizinen

Alina Rößner<sup>1</sup>, Jennifer Andrack<sup>1</sup>, Greta Gölz<sup>1</sup>, Yesica Schulze<sup>1</sup>, Tassilo Seidler<sup>2</sup>, Thomas Forbrig<sup>3</sup>, Thomas Alter<sup>1</sup>, Stefanie Orquera<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, Freie Universität Berlin

<sup>2</sup>Beuth Hochschule für Technik Berlin

<sup>3</sup>Dr. Felgenträger & Co. – Öko-chem. und Pharma GmbH

## Hintergrund

Der Einsatz von Colizinen stellt eine Möglichkeit zur Reduzierung der *E. coli*-Keimzahl in Lebensmitteln dar. Colizine gehören zur Gruppe der Bakteriozine und sind von *E. coli* gebildete Proteine, die eine antimikrobielle Wirkung gegen Stämme der gleichen oder nah verwandter bakterieller Arten aufweisen. Sie kommen ubiquitär in der Umwelt, somit auch natürlicherweise in Lebensmitteln, vor.

In Vorversuchen konnte der mittels Tangentialflussfiltration (TFF) aufkonzentrierte Überstand des Hackfleisch-Isolates *E. coli* 2116 (Colizin-Gene E2, K, Phylogruppe B1) die Keimzahl des *E. coli* K12 DH5 $\alpha$  unverdünnt sowie 1:50 verdünnt bei 4° C in Medium um sechs Log-Stufen senken. Das Konzentrat wurde über eine Filtration bei 100 kDa, eine Ammoniumsulfat (AMS)-Fällung sowie Dialyse weiter aufgereinigt und aufkonzentriert.

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob das aufgereinigte Konzentrat eine vergleichbare oder sogar stärkere Keimzahlreduktion erzielen kann.

Des Weiteren wurde der Überstand des *E. coli* 2116-Isolates sowie das aufgereinigte Konzentrat auf ihr Lyse-Spektrum gegenüber 122 Isolaten aus Lebensmitteln und Geflügel hin untersucht.

## Material und Methoden

### Konzentrat 1

Der Überstand einer 20 l Übernachtskultur in Luria Bertani (LB)-Medium des *E. coli*-Isolates 2116 wurde mittels Tangentialflussfiltration (TFF) bei einem Cut Off von 10 kDa auf ca. 600 ml aufkonzentriert. Die Lagerung erfolgte bei -20° C.

### Konzentrat 2

Der Überstand einer 20 l Übernachtskultur in LB-Medium des *E. coli* 2116 wurde mittels TFF bei einem Cut Off von 100 kDa filtriert. Das Filtrat wurde mittels TFF bei einem Cut Off von 30 kDa auf ca. 300 ml aufkonzentriert. Zur weiteren Aufreinigung der Colizine wurde eine Fällung mit 30 % - 70 % AMS und eine Dialyse gegen PBS durchgeführt. Die Lagerung erfolgte bei -20° C.

### Bestimmung der *E. coli*-Keimzahl in Medium

Die Übernachtskultur des *E. coli* K12 DH5 $\alpha$  ( $10^6$ - $10^7$  KbE/ml) wurde 1:1

- mit dem unverdünnten Konzentrat 1 ( $10^4$  AU/ml)
- mit dem 1:50 verdünnten Konzentrat 1 ( $10^2$  AU/ml)
- mit dem 1:100 verdünnten Konzentrat 2 ( $10^2$  AU/ml)
- mit PBS

bei 4° C gelagert. Zu definierten Zeitwerten wurde die Keimzahl bestimmt.

### Spot Assay zur Bestimmung des Lyse-Spektrums

LB-Agar Platten wurden mit 0,5% LB-Softagar überschichtet, welcher mit je 200  $\mu$ l der Wildstämme (122 *E. coli*-Isolate) inokuliert wurde. 5  $\mu$ l des Überstandes bzw. des Konzentrates 2 des *E. coli*-Isolates 2116 wurden auf den Overlay gespottet. Die Platten wurden aerob bei 37° C für 24 h inkubiert und die Lyseaktivität nach 24 h ermittelt.

## Ergebnisse

### Bestimmung der *E. coli*-Keimzahl in Medium bei 4° C mit Konzentrat 1

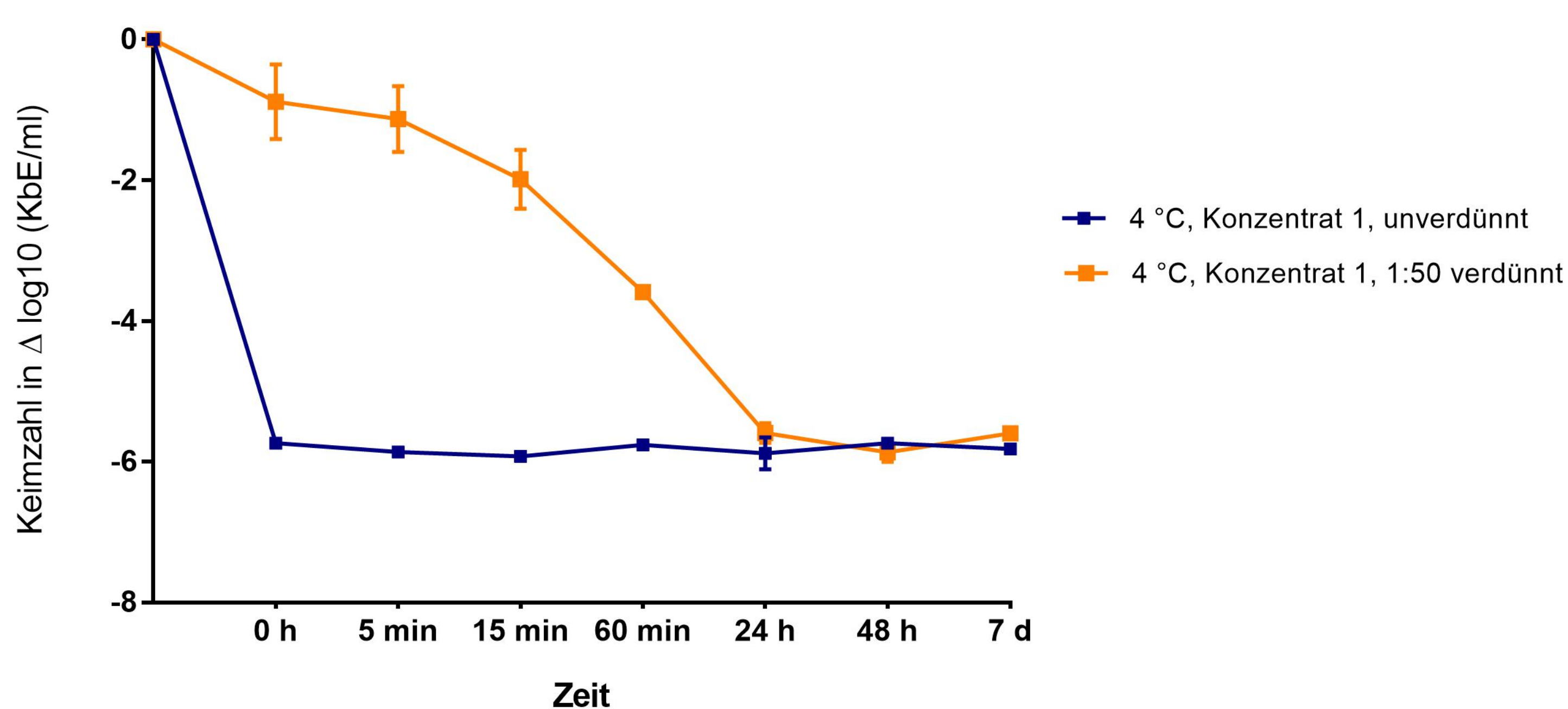


Abb. 1: Dargestellt ist die Keimzahl des *E. coli* DH5 $\alpha$  mit Konzentrat 1 unverdünnt und 1:50 verdünnt (4° C)

Bei 4° C Lagerung wurde die *E. coli*-Keimzahl unmittelbar nach der Zugabe des unverdünnten Konzentrates 1 um sechs Log-Stufen reduziert und blieb dann konstant bei  $10^1$  KbE/ml. Unmittelbar nach der Zugabe des 1:50 verdünnten Konzentrates 1 wurde die *E. coli*-Keimzahl um eine und innerhalb von 60 min um drei Log-Stufen gesenkt. Nach 24 h wurde die Keimzahl um weitere zwei Log-Stufen reduziert und blieb über sieben Tage konstant (Abb. 1).

### Bestimmung der *E. coli*-Keimzahl in Medium bei 4° C mit dem Konzentrat 1 und dem Konzentrat 2

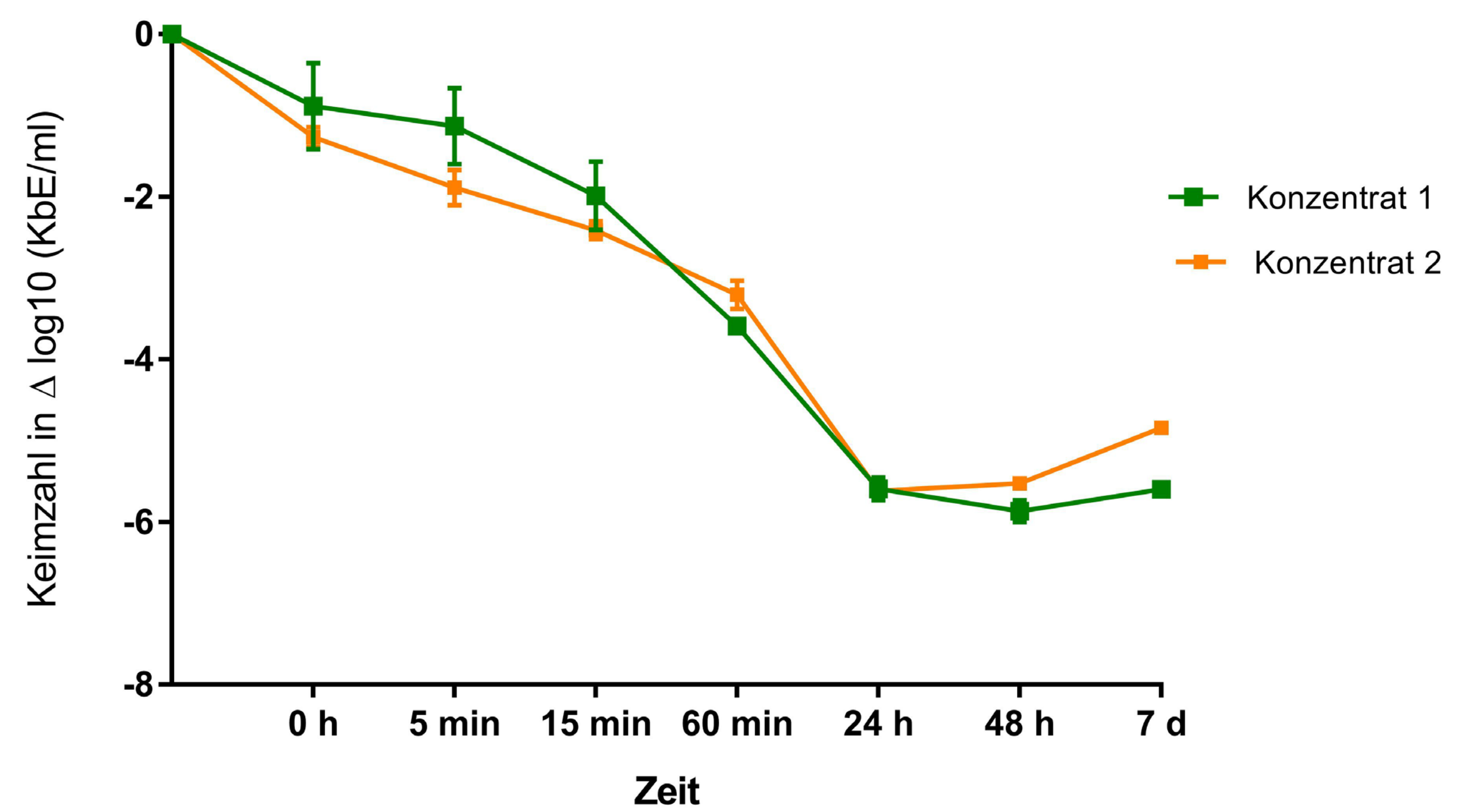


Abb. 2: Vergleich der verdünnten Konzentrate: Dargestellt sind die Keimzahl des *E. coli* DH5 $\alpha$  mit Konzentrat 1 1:50 verdünnt (4° C) und mit Konzentrat 2 1:100 verdünnt (4° C)

Die Keimzahl wurde von dem 1:100 verdünnten Konzentrat 2 ( $10^2$  AU/ml) wie bei dem 1:50 verdünnten Konzentrat 1 ( $10^2$  AU/ml) innerhalb von 24 h um sechs Log-Stufen reduziert (Abb. 2).

### Bestimmung des Lyse-Spektrums des *E. coli* Isolates 2116

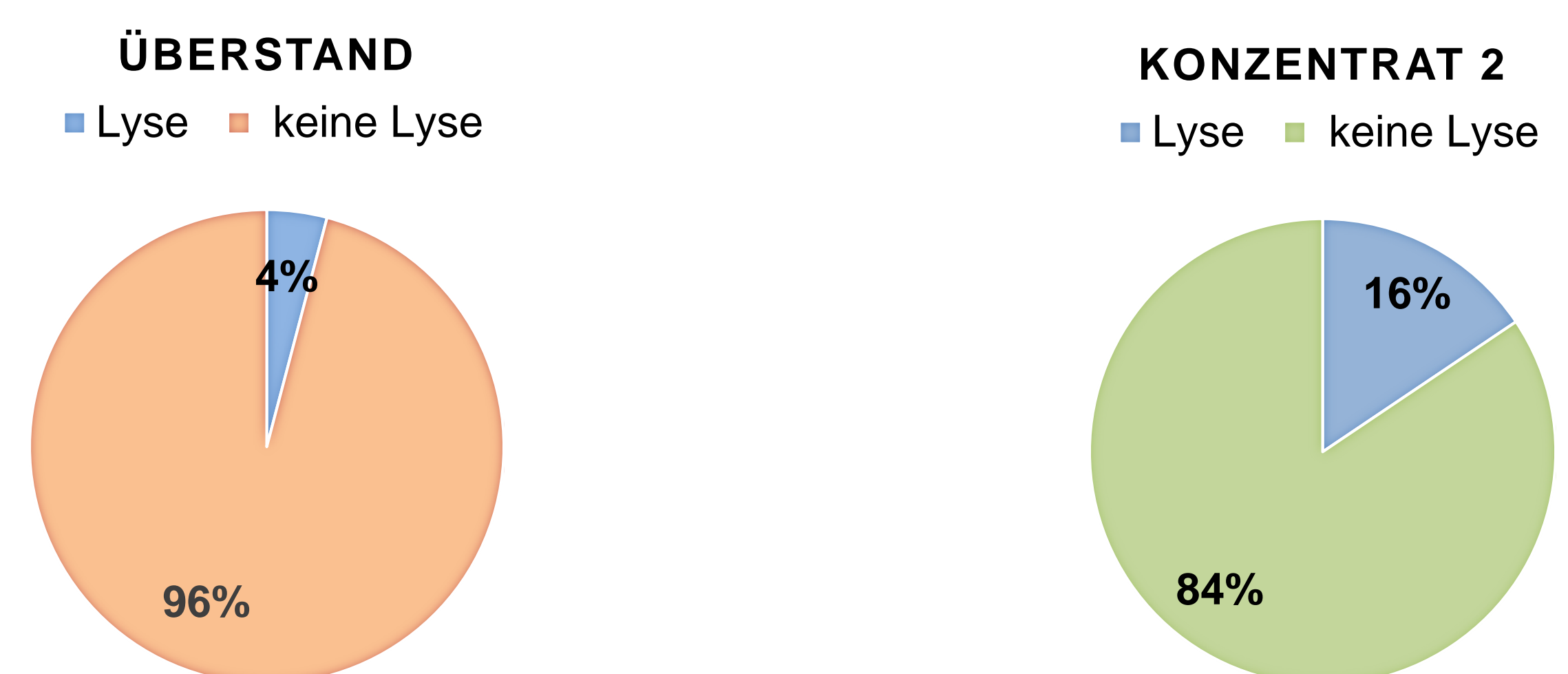


Abb. 3: Dargestellt ist das Lyse-Spektrum des Überstandes und des Konzentrates 2 des *E. coli*-Isolates 2116

Das Konzentrat 2 lysiert ein breiteres Spektrum (16 %) der 122 *E. coli*-Isolate im Vergleich zum Überstand (4 %) (Abb. 3).

## Zusammenfassung

Unmittelbar nach der Zugabe des unverdünnten Konzentrates 1 ( $10^4$  AU/ml) konnte die *E. coli*-Keimzahl bei 4° C um sechs Log-Stufen reduziert werden. Auch das 1:50 verdünnte Konzentrat 1 ( $10^2$  AU/ml) sowie das 1:100 verdünnte Konzentrat 2 ( $10^2$  AU/ml) senkten die Keimzahl um sechs Log-Stufen, allerdings erst innerhalb von 24 h. Hier treffen die Colizine bei dieser geringen Konzentration wahrscheinlich nicht sofort auf die Bakterien und lysieren diese erst über einen längeren Zeitraum hinweg.

Das Konzentrat 2 weist ein breiteres Lyse-Spektrum (16 %) als der Überstand (4 %) des *E. coli*-Isolates 2116 auf, da die Colizine in einer höheren Konzentration vorliegen.

Zusammenfassend ist der Einsatz von Colizinen zur *E. coli*-Keimzahlreduktion bei 4° C sehr gut geeignet. Die Keimzahlreduktion um sechs Log-Stufen wird über einen Zeitraum von sieben Tagen beibehalten. Das Konzentrat 2 weist eine stärkere Aufreinigung und damit Konzentration auf. Daher erzielt es auch bei einer höheren Verdünnung (1:100 Verdünnung) vergleichbare Ergebnisse wie das Konzentrat 1 (1:50 Verdünnung).

Zur Zeit werden weitere Versuche zur Keimzahlreduktion von ausgewählten *E. coli*-Wildstämmen über den Einsatz von Konzentraten nach AMS-Fällung und Dialyse bei Kühltemperaturen in Fleisch und auf Oberflächen durchgeführt.