

Aus dem Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Reduktion von *Escherichia coli*
durch den Einsatz von Bakteriozinen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Alina Tabea Rößner
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2021
Journal-Nr.: 4307

Aus dem Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

**Reduktion von *Escherichia coli*
durch den Einsatz von Bakteriozinen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Alina Tabea Rößner

Tierärztin

aus Berlin

Berlin 2021

Journal-Nr.: 4307

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Alter
Zweiter Gutachter: PD Dr. Martin Schulze
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Tassilo Seidler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

escherichia coli; colicins; bacteriocins; MALDI-TOF; polymerase chain reaction; meat;
food hygiene; food safety

Tag der Promotion: 09.09.2021

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <https://dnb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-133-9

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2021

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2021 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1. Einleitung.....	1
2. Literatur.....	2
2.1 <i>Escherichia coli</i>	2
2.1.1 Phylogenetik von <i>E. coli</i>	4
2.1.2 <i>E. coli</i> -Prävalenz im Lebensmittel.....	4
2.2 Charakterisierung von Bakteriozinen.....	6
2.2.1 Bakteriozine grampositiver Bakterien.....	6
2.2.1.1 Nisin.....	8
2.2.2 Bakteriozine gramnegativer Bakterien.....	8
2.2.2.1 Colizine.....	9
2.2.2.2 Mikrozine.....	15
2.3 Dekontaminationsmaßnahmen von Lebensmitteln: Welche Rolle spielt der Einsatz von Bakteriozinen?.....	17
3. Material und Methoden.....	20
3.1 Material.....	20
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	20
3.1.2 Nährmedien.....	21
3.1.3 Bakterienstämme.....	21
3.1.4 Bakteriozinkonzentrat.....	21
3.1.5 Primer.....	22
3.1.6 Kits.....	23
3.1.7 Geräte und Software.....	24
3.1.8 Verbrauchsmaterialien.....	24
3.2 Methoden.....	25

3.2.1 Isolierung der Bakterienstämme.....	25
3.2.2 Genus- und Speziesbestimmung der Bakterienisolate mittels MALDI-TOF	26
3.2.3 Kultivierung der Bakterienisolate.....	27
3.2.4 Detektion der Bakteriozinbildung im Spot-Assay.....	27
3.2.5 DNA-Extraktion mit Chelex® 100 Resin-Lösung	30
3.2.6 Nachweis bekannter Colizin- und Mikrozin-Gene.....	30
3.2.6.1 Multiplex-PCR.....	31
3.2.6.2 Singleplex-PCR.....	34
3.2.6.3 Gelelektrophorese.....	34
3.2.6.4 Bestätigung der PCR-Produkte durch Sequenzierung.....	35
3.2.7 Phylogruppenbestimmung der <i>E. coli</i> -Isolate	36
3.2.8 Bestimmung des Molekulargewichtes mittels SDS-PAGE.....	41
3.2.9 Konzentratherstellung	42
3.2.10 Zellzahlreduktion im Medium mittels <i>E. coli</i> 2116-Konzentrat.....	43
3.2.11 Zellzahlreduktion im Lebensmittel mittels <i>E. coli</i> 2116-Konzentrat	45
4. Ergebnisse	48
4.1 Genus- und Speziesbestimmung der Bakterienisolate mittels MALDI-TOF	48
4.2 Detektion der Bakteriozinbildung im Spot-Assay.....	49
4.3 Lyse-Spektrum und Sensitivität der Referenzstämmе.....	51
4.4 Nachweis bekannter Colizin- und Mikrozin-Gene	53
4.5 Phylogruppenbestimmung der <i>E. coli</i> -Isolate	54
4.6 Bestimmung des Molekulargewichtes der <i>E. coli</i> -Extrakte	57
4.7 Zellzahlreduktion von <i>E. coli</i> K-12 DH5 α durch den Einsatz von <i>E. coli</i> 2116 Konzentrat	58
4.7.1 Zellzahlreduktion von <i>E. coli</i> K-12 DH5 α in LB-Medium bei 37°C.....	59
4.7.2 Zellzahlreduktion von <i>E. coli</i> K-12 DH5 α in LB-Medium bei 4°C.....	61
4.7.3 Zellzahlreduktion von <i>E. coli</i> K-12 DH5 α in Hackfleisch bei 4 °C.....	65
5. Diskussion.....	67
5.1 Genus- und Speziesbestimmung der Bakterienisolate	67

5.2 Detektion der Bakteriozinbildung im Spot-Assay	69
5.3 Lyse-Spektrum und Sensitivität der Referenzstämme	70
5.4 Nachweis bekannter Colizin- und Mikrozin-Gene	71
5.5 Phylogruppenbestimmung der <i>E. coli</i> -Isolate	72
5.6 Bestimmung des Molekulargewichtes der Bakteriozine.....	72
5.7 Zellzahlreduktion von <i>E. coli</i> K-12 DH5 α durch den Einsatz von <i>E. coli</i> 2116 Colizin-Konzentrat	73
5.8 Fazit und Ausblick.....	75
6. Zusammenfassung.....	76
7. Summary.....	78
8. Literaturverzeichnis	80
Anhang.....	XIII
Publikationen.....	XV
Danksagung	XVI
Selbstständigkeitserklärung.....	XVII

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Translokation der Colizine in eine <i>E. coli</i> -Zielzelle, modiziert nach Kleanthous (2010): Colizine benötigen sowohl einen Rezeptor als auch einen Translokator um die äußere Membran zu überwinden und entfalten mithilfe des Tol- bzw. Ton-Proteinsystems ihre lytische Aktivität.	12
Abb. 2 Operonorganisation der Gruppe A- und B-Colizine modifiziert nach Cascales et al. (2007):.....	13
Abb. 3 Colizin-Translokation im Detail, modifiziert nach Cascales et al. (2007):	15
Abb. 4 Synthese und Wirkungsmechanismen von Bakteriozinen gramnegativer Bakterien, modifiziert nach Yang et al. (2014)	17
Abb. 5 Hürdenmodell modifiziert nach Leistner (1992): Dargestellt sind verschiedene äußere Einflussfaktoren, welche synergistisch wirken und mikrobiellen Verderb verzögern oder verhindern können.....	18
Abb. 6 Versuchsschritte Methoden: TFF (Tangentialflussfiltration), AMS (Ammoniumsulfat)	25
Abb. 7 Spot-Assay-Schema: Dargestellt ist eine mit Softagar überschichtete und mit Referenzstamm inokulierte Agar-Platte, sowie Spots der <i>E. coli</i> -Isolate	27
Abb. 8 qxPCR Positivkontrollen: Abgebildet ist ein Agarose-Gel mit Marker (GeneRuler™ Low Range) und der Positivkontrolle 55-6#4 zur Detektion der Gene arpA, chuA und TspE4.C2 und der Positivkontrolle 75-7#1 zur Detektion des Gens yjaA, sowie Beispiele der analysierten <i>E. coli</i> -Isolate.....	37
Abb. 9 Dichotomischer Entscheidungsbaum qxPCR: Dargestellt sind die bekannten <i>E. coli</i> Phylogruppen A, B1, B2, C, D, E, F, Clade I – II und ihre zugehörigen Gene. U steht für bisher unbekannte Phylogruppen (Clermont et al. 2013).....	37
Abb. 10 dPCR C: Abgebildet ist ein Agarose-Gel mit Marker (GeneRuler™ Low Range), der Positivkontrolle 1127/2 für die Phylogruppe C (trpAgpC +, 219 bp) und der Positivkontrolle für die Phylogruppe A (trpAgpC -) sowie drei Beispiele der <i>E. coli</i> -Isolate für die Phylogruppe C.	39
Abb. 11 dPCR C: Abgebildet ist ein Agarose-Gel mit Marker (GeneRuler™ Low Range), der Positivkontrolle S-228-1 für die Phylogruppe E (trpBA +, 489 bp und ArpAgpE +, 301 bp) und der Positivkontrolle für die Phylogruppe D (trpBA +) sowie drei Beispiele der <i>E. coli</i> -Isolate für die Phylogruppe D und ein Beispiel für die Phylogruppe E.	40
Abb. 12 Übersicht über Vorversuch 1-3 zur Zellzahlreduktion im Lebensmittel.....	45
Abb. 13 Hauptversuch-Aufbau Zellzahlreduktion im Lebensmittel: Probe, Negativkontrolle 1 und 2.....	46

Abb. 14 <i>E. coli</i> -Prävalenz der untersuchten Lebensmittelmatrices (n = 83) mittels MALDI-TOF: Fleisch (n = 41), Fertiggerichte und Backwaren (n = 30), Fisch (n = 3), Gemüse (n = 9), Käse (n = 3).....	48
Abb. 15 Bakterizide Wirkung der Übernachtskulturen der <i>E. coli</i> -Lebensmittel-Isolate (n = 80) im Spot-Assay: Die <i>E. coli</i> -Isolate, isoliert aus verschiedenen Lebensmittel-Matrices, wurden im Duplikat auf ihre Lyse-Eigenschaften getestet. Fleisch (n = 41), Fertiggerichte und Backwaren (n = 24), Fisch (n =3), Gemüse (n = 9), Käse (n = 3).....	49
Abb. 16 Bakterizide Wirkung der Extrakte der <i>E. coli</i> -Lebensmittel-Isolate (n = 80) im Spot-Assay: Die Extrakte der <i>E. coli</i> -Isolate, isoliert aus verschiedenen Lebensmittel-Matrices, wurden im Duplikat auf ihre Lyse-Eigenschaften getestet. Fleisch (n = 41), Fertiggerichte und Backwaren (n = 24), Fisch (n =3), Gemüse (n = 9), Käse (n = 3).....	50
Abb. 17 Anzahl der Referenzstämme, welche durch Übernachtskulturen der <i>E. coli</i> -Isolate (n = 42) lysiert worden sind; Referenzstämme (St.)	51
Abb. 18 Anzahl der Referenzstämme, welche durch Extrakte der <i>E. coli</i> -Isolate (n = 33) lysiert worden sind; Referenzstämme (St.)	51
Abb. 19 Sensitivität der einzelnen <i>E. coli</i> -Referenzstämme K-12 DH5 α , K-12 P400, K-12 5K, K-12 ϕ , K- 12 row, sowie Shigella sonnei 17 gegenüber den aufgetragenen <i>E. coli</i> -Übernachtskulturen (n = 42).....	52
Abb. 20 Sensitivität der einzelnen <i>E. coli</i> -Referenzstämme K-12 DH5 α , K-12 P400, K-12 5K, K-12 ϕ , K- 12 row, sowie Shigella sonnei 17 gegenüber den aufgetragenen Extrakten (n = 33)	52
Abb. 21 Nachweis der Bakteriozin-Gene in den lysierenden <i>E. coli</i> -Isolaten. Dargestellt ist die Anzahl der Isolate, bei denen der Nachweis von Colizin- und/oder Mikrozin-Genen erfolgte (n = 42).....	53
Abb. 22 Anzahl der Bakteriozin-Gene pro Isolat. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Bakteriozin-Gene pro Isolat an den Gesamtisolaten (n=42).....	54
Abb. 23 Phylogruppenverteilung der mittels PCR nach Clermont et al. (2013) untersuchten <i>E. coli</i> -Isolate. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der einzelnen Gruppen an den Gesamtisolaten (n=80); Phylogruppen A, B1, B2, D, E, C; Unbekannte Phylogruppe; Clade I („Escherichia cryptic clade“)	56
Abb. 24 Auswertungsbeispiel SDS-PAGE: Marker Protein™ Dual Color Standards in kDa (1), Negativkontrolle (2) <i>E. coli</i> -Extrakte (3-7), SDS-PAGE Gel mit Referenzstamm-Overlay (<i>E. Coli</i> K-12 DH5 α).....	57
Abb. 25 Lyse-Eigenschaften von Konzentrat 1 und Konzentrat 2 auf dem Referenzstamm <i>E. coli</i> K-12 DH5 α im Spot-Assay.....	59

Abb. 26 Zellzahlreduktion bei 37°C, unverdünntes Konzentrat 1. Dargestellt sind die Zellzahlen in KbE/ml von K-12 DH5 α mit und ohne Zusatz von Konzentrat 1 zu definierten Zeitpunkten. NK = Negativkontrolle (K-12 DH5 α + LB-Medium). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).....	60
Abb. 27 Aktivitätsbestimmung bei 37°C, unverdünntes Konzentrat 1. Dargestellt sind die Aktivitätseinheiten (AU/ml) von Konzentrat 1 in K-12 DH5 α -Kultur zu definierten Zeitpunkten. NK = Negativkontrolle (Konzentrat 1 + LB-Medium). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).....	60
Abb. 28 Aktivitätsbestimmung bei 4°C, unverdünntes Konzentrat 1. Dargestellt sind die Aktivitätseinheiten (AU/ml) von Konzentrat 1 in K-12 DH5 α -Kultur zu definierten Zeitpunkten. NK = Negativkontrolle (Konzentrat 1 + LB-Medium). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).....	61
Abb. 29 Zellzahlreduktion bei 4°C, unverdünntes Konzentrat 1. Dargestellt sind die Zellzahlen in KbE/ml von K-12 DH5 α mit und ohne Zusatz von Konzentrat 1 zu definierten Zeitpunkten. NK = Negativkontrolle (K-12 DH5 α + LB-Medium). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).....	61
Abb. 30 Zellzahlreduktion bei 4°C, 1:50 verdünntes Konzentrat 1. Dargestellt sind die Zellzahlen in KbE/ml von K-12 DH5 α mit und ohne Zusatz von Konzentrat 1 zu definierten Zeitpunkten. NK = Negativkontrolle (K-12 DH5 α + LB-Medium). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).....	62
Abb. 31 Aktivitätsbestimmung bei 4°C, 1:50 verdünntes Konzentrat 1. Dargestellt sind die Aktivitätseinheiten (AU/ml) von Konzentrat 1 in K-12 DH5 α -Kultur zu definierten Zeitpunkten. NK = Negativkontrolle (Konzentrat 1 + LB-Medium). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).....	62
Abb. 32 Zellzahlreduktion durch Konzentrat 1 unverdünnt und verdünnt (1:50) bei 4°C. Dargestellt sind die Zellzahlen in $\Delta\log_{10}$ (KbE/ml) von K-12 DH5 α mit Zusatz von Konzentrat 1 zu definierten Zeitpunkten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).	63
Abb. 33 Zellzahlreduktion durch Konzentrat 1 und 2, verdünnt, bei 4°C. Dargestellt sind die Zellzahlen in $\Delta\log_{10}$ (KbE/ml) von K-12 DH5 α mit Zusatz von Konzentrat 1 bzw. 2 zu definierten Zeitpunkten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2). ...	64
Abb. 34 Aktivitätsbestimmung bei 4°C, 1:100 verdünntes Konzentrat 2. Dargestellt sind die Aktivitätseinheiten (AU/ml) von Konzentrat 2 in K-12 DH5 α -Kultur zu definierten Zeitpunkten. NK = Negativkontrolle (Konzentrat 2 + LB-Medium). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).....	64

Abb. 35 Zellzahreduktion durch 1 ml Konzentrat 2 im Lebensmittel bei 4°C. Dargestellt sind die Zellzahlen in KbE/ml von K-12 DH5 α mit und ohne Zusatz von Konzentrat 2 zu definierten Zeitpunkten. NK = Negativkontrolle (K-12 DH5 α + LB-Medium). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.....65

Abb. 36 Zellzahlreduktion durch 0,1 ml Konzentrat 2 im Lebensmittel bei 4°C. Dargestellt sind die Zellzahlen in KbE/ml von K-12 DH5 α mit und ohne Zusatz von Konzentrat 2 zu definierten Zeitpunkten. NK = Negativkontrolle (K-12 DH5 α + LB-Medium). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).....66

Abb. 37 Zellzahlreduktion durch Konzentrat 2 im Lebensmittel bei 4°C. Dargestellt sind die Zellzahlen in $\Delta\log_{10}$ (KbE/ml) von K-12 DH5 α mit Zusatz von Konzentrat 2 in unterschiedlichen Volumina (0,1 ml und 1 ml) zu definierten Zeitpunkten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).....66

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Einteilung der pathogenen <i>E. coli</i> nach Wieler et al. (2015) und Kayser et al. (2014).	2
Tab. 2 Klassifizierung von Bakteriozinen grampositiver Bakterien, modifiziert nach Yang et al. (2014).....	6
Tab. 3 Unterschiede von Colizinen und Mikrozinigen	9
Tab. 4 Übersicht über Colizine und Bakteriozine der <i>Enterobacteriaceae</i> , modifiziert nach Cursino et al. (2002) und Smarda und Smajs (1998).....	10
Tab. 5 Klassifizierung von Mikrozinigen gramnegativer Bakterien, modifiziert nach Yang et al. (2014) und Duquesne et al. (2007a).....	16
Tab. 6 Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.....	20
Tab. 7 Übersicht der Nährmedien.....	21
Tab. 8 Übersicht der Referenzstämme und deren Herkunft.....	21
Tab. 9 Bakteriozinkonzentrat und Ursprungsisolat.....	21
Tab. 10 Übersicht der Mikrozin- und Colizin-Primer.....	22
Tab. 11 Übersicht der Phylo-PCR-Primer.....	23
Tab. 12 Übersicht der Kits	24
Tab. 13 Übersicht Geräte	24
Tab. 14 Übersicht Software	24
Tab. 15 Übersicht weiterer Materialien	24
Tab. 16 MALDI-Ergebnisse	26
Tab. 17 Auswertungsgrundlage Spot-Assay.....	29
Tab. 18 mPCR I, Mastermix für 1x Probe	31
Tab. 19 mPCR I, Primermix.....	31
Tab. 20 mPCR II, Mastermix für 1x Probe	31
Tab. 21 mPCR II, Primermix.....	32
Tab. 22 mPCR III, Mastermix für 1x Probe	32
Tab. 23 mPCR III, Primermix.....	32
Tab. 24 mPCR IV, Mastermix für 1x Probe.....	33
Tab. 25 mPCR IV, Primermix	33
Tab. 26 mPCR V, Mastermix für 1x Probe.....	33
Tab. 27 mPCR V, Primermix	33
Tab. 28 sPCR, Mastermix für 1x Probe	34
Tab. 29 Temperatur-Zeit-Profil, mPCR und sPCR.....	34
Tab. 30 Mastermix für 1x Probe, sPCR (Sequenzierung).....	35
Tab. 31 qxPCR, Mastermix für 1x Probe	36
Tab. 32 qxPCR, Primermix.....	36

Tab. 33 Temperatur-Zeit-Profil, qPCR	36
Tab. 34 Mastermix für 1x Probe, dPCR C.....	38
Tab. 35 Temperatur-Zeit-Profil, dPCR C	38
Tab. 36 Mastermix für 1x Probe, dPCR E.....	39
Tab. 37 Temperatur-Zeit-Profil dPCR E.....	40
Tab. 38 Pipettierschema SDS-PAGE, 1mm Spacer, 2 Gele	41
Tab. 39 Probe und Negativkontrollen Zellzahlreduktion im Medium.....	43
Tab. 40 Probe und Negativkontrollen Zellzahlreduktion im Lebensmittel	47
Tab. 41 Übersicht über die für Bakteriozine kodierenden Isolate und deren Lyse-Eigenschaften in Abhängigkeit zur Phylogruppenverteilung.....	55
Tab. 42 Bakteriozide <i>E. coli</i> -Isolate mit Nachweis von Bakteriozin-Genen und deren Phylogruppenverteilung.....	56
Tab. 43: Zusammenfassung der Ergebnisse von neun Isolaten, welche eine Lysebande in der SDS-PAGE zeigten	58

Abkürzungsverzeichnis

add	hinzufügen
APS	Ammonium Persulfate
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AU	activity units
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bp	Basenpaare
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
Col	Colizin
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dPCR	Duplex-PCR
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ex.	Extrakt
F	Forward
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm
<i>g</i> -Zahl	relative Zentrifugalbeschleunigung in m/s
GRAS	Generally Recognized as Safe
GRN	GRAS Notice
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser (destilliert)
ILSH	Institut für Lebensmittelsicherheit und –hygiene, Freie Universität Berlin
KbE	Koloniebildende Einheit
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
M	Mol
MALDI-TOF	Matrix–Assistierte Laser–Desorption–Ionisierung mit Flugzeitanalyse (Time-of-Flight)
Mc	Mikrozin
MG	Molekulargewicht
ml	Milliliter
mPCR	Multiplex-PCR
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)

PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
qPCR	Quadruplex-PCR
R	Reverse
RKI	Robert Koch-Institut
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sPCR	Singleplex-PCR
Syn.	Synonym
TEMED	Tetramethylethylendiamin
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UV	Ultra-Violett
ÜNK	Übernachtkultur
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter

1. Einleitung

Steigende Antibiotikaresistenzen fordern weltweit eine Reduktion des Antibiotikaeinsatzes in der Praxis und verlangen nach Alternativen. Vor allem gramnegative Bakterien der Gattungen *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* und *Campylobacter* entwickeln immer mehr Resistenzen gegenüber Antibiotika. Dabei spielt auch *Escherichia (E.) coli* als potenzieller lebensmittelassoziierter Krankheitserreger eine bedeutende Rolle. Lebensmittel kommen entlang der Lebensmittelproduktionskette oft mit mikrobiellen Erregern in Berührung, sodass Lebensmittel tierischen Ursprungs häufig mit *E. coli* kontaminiert sind. Kagambega et al. (2011) beschreibt beispielsweise eine *E. coli*-Prävalenz von 100 % in Fleisch auf Märkten im außereuropäischen Ausland. Zur Verlängerung der Haltbarkeit von Lebensmitteln kommen bereits chemische und physikalische Konservierungsmethoden zum Einsatz, jedoch gehen Tendenz und Akzeptanz des Verbrauchers in Richtung natürlicher Zusätze in Lebensmitteln. Bakteriozine stellen als antimikrobielle Proteine eine vielversprechende Alternative dar, da sie nicht toxisch auf eukaryotische Zellen wirken und ubiquitär in der Umwelt und somit auch natürlicherweise im Lebensmittel vorkommen. In der Lebensmittelindustrie findet bereits das von Milchsäurebakterien produzierte Bakteriozin Nisin Anwendung. Nisin besitzt seit 1988 den „Generally Recognized As Safe“ (GRAS)-Status in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) und ist in Deutschland als Zusatzstoff E234 seit 1998 in der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZZuV) für den Einsatz in bestimmten Lebensmitteln, wie zum Beispiel gereifter Käse und Schmelzkäse, gelistet (Deutschland, ZZuV, Anlage 5, Teil C, Liste 2). Colizine, von *E. coli* produzierte Bakteriozine, gelten als große Hoffnung, um pathogene *E. coli* im Lebensmittel zu reduzieren. Studien zeigen, dass Colizine in Pflanzen exprimiert werden und diese erfolgreich zur Reduktion von *E. coli* im Lebensmittel eingesetzt werden können (Hahn-Lobmann et al. 2019).

Im Zuge dieser Arbeit sollten zunächst *E. coli* aus verschiedenen Lebensmittelmatrices isoliert und deren Bakteriozine (Colizine und Mikroazine) detektiert, sowie charakterisiert werden. Wirksame Bakteriozine wurden anschließend zur Zellzahlreduktion von *E. coli* in einem Zellzahlreduktionsmodell eingesetzt („Proof of Principle“).

2. Literatur

2.1 *Escherichia coli*

Die Gattung *Escherichia* gehört neben anderen pathogenen und fakultativ pathogenen Bakterien, wie zum Beispiel *Salmonella*, *Klebsiella*, *Citrobacter* und *Enterobacter*, zur Familie der *Enterobacteriaceae* innerhalb der Klasse der *Gammaproteobacteria*. Die Gattung *Escherichia* umfasst sieben Spezies, von denen vier Spezies eine klinische Bedeutung haben (*E. albertii*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* und *E. coli*). Die Spezies *E. coli* wurde 1885 von Theodor Escherich im Säuglingsstuhl entdeckt und hat medizinisch gesehen die wichtigste Bedeutung (Wieler et al. 2015). *E. coli* sind gerade, fakultativ anaerobe, gramnegative Stäbchen und gehören zur Gruppe der koliformen *Enterobacteriaceae*, welche als Eigenschaft Laktose verstoffwechseln können und Cytochromoxidase-negativ sind. *E. coli* ist ein Kommensale im Intestinaltrakt von Menschen und Tieren und gilt als Indikator für fäkale Verunreinigungen von Wasser und Lebensmitteln (Kayser et al. 2014). Dabei lässt sich die Spezies in kommensale und pathogene *E. coli* unterteilen. Bei Letzteren unterscheidet man wiederum die intestinalen pathogenen *E. coli* (InPEC) von den extraintestinalen pathogenen *E. coli* (ExPEC) (Tab. 1), welche sowohl für Menschen als auch für Tiere klinisch relevant sind (Wieler et al. 2015).

Tab. 1 Einteilung der pathogenen *E. coli* nach Wieler et al. (2015) und Kayser et al. (2014)

Pathogene <i>E. coli</i>	
InPEC	EPEC – enteropathogene <i>E. coli</i>
	ETEC – enterotoxische <i>E. coli</i>
	EIEC – enteroinvasive <i>E. coli</i>
	EHEC – enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (Syn. STEC – Shigatoxin-bildende <i>E. coli</i>)
	EDEC – Ödemkrankheits- <i>E. coli</i>
	EAEC-I – enteroaggregative <i>E. coli</i>
ExPEC	UPEC – uropathogene <i>E. coli</i>
	APEC – aviäre pathogene <i>E. coli</i>
	SEPEC – septikämische <i>E. coli</i>

Intestinale pathogene *E. coli* (InPEC):

Enteropathogene *E. coli* (EPEC) verursachen Diarrhö bei Tieren (Hund, Katze, Kaninchen, Schwein und Kalb) und bei Säuglingen (Wieler et al. 2015; Kayser et al. 2014). EPEC heften sich Adhäsionsfaktor-vermittelt an Epithelzellen des Dünndarms. Das Adhäsion EsPA (*E. coli*-sezerniertes Protein A) vermittelt die initiale Anheftung von EPEC an das Darmepithel. Intimin,

ein äußeres Membranprotein, induziert als sekundärer Adhäsionsfaktor Attaching-and-effacing (AE)-Läsionen in den Epithelzellen. Als Folge verstreichen Mikrovilli am Ort der Bakterienanhaftung (Wieler et al. 2015).

Enterotoxische *E. coli* (ETEC) führen zur sekretorischen Diarrhö bei Kalb, Saugferkel, Lamm, Ziege, Hund und Katze und spielen beim Menschen eine Rolle als Verursacher der Reisediarrhö (Wieler et al. 2015; Kayser et al. 2014). Die Pathogenität der ETEC beruht im Wesentlichen auf der Sekretion zweier Toxine: dem hitzelabilen Enterotoxin LT und dem hitzestabilen Enterotoxin ST (Wieler et al. 2015). Diese Toxine führen zu starken wässrigen Durchfällen mit zum Teil heftigem Erbrechen. Infektionen mit ETEC sind meist auf Hygienemängel bei Lebensmitteln und Trinkwasser zurückzuführen (Tschäpe et al. 2009).

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) verursachen ein Krankheitsbild, welches schwer von dem der Shigellose (Ruhr, Dysenterie) zu unterscheiden ist. Sie werden wegen ihrer engen biochemischen und Antigenverwandtschaft zu *Shigella* auch als Shiga-like-*E. coli* bezeichnet. Sie verursachen lokale, entzündliche Prozesse im Dickdarm und werden ausschließlich fäkal-oral verbreitet (Tschäpe et al. 2009).

Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC, Syn. STEC) verursachen hämorrhagische Kolitiden. Eine schwerwiegende Komplikation ist das hämolytische Urämie-Syndrom (HUS). Seine Klinik ist gekennzeichnet durch akutes Nierenversagen, Thrombozytopenie und Anämie. EHEC besitzen Fimbrien für die Adhärenz an Darmzellen. Außerdem produzieren sie shigaähnliche Toxine (Vero-Zytotoxine), weshalb sie auch als verozytotoxinbildende *E. coli* (VTEC) bekannt sind (Kayser et al. 2014). Beim Tier sind sie Verursacher von osmotischer Diarrhö bei Kalb, Lamm, Ziege und Dammwild, sowie sporadisch auch bei Hund und Katze. Sie produzieren die Shigatoxine Stx, Stx1 und Stx2, das Enterohämolysin, sowie eine Serinprotease. Als Virulenzfaktoren sind *E. coli*-sezerniertes Protein A, Intimin und lange Fimbrien zu nennen (Wieler et al. 2015). Im Jahr 2011 gab es ein erhöhtes Aufkommen von HUS-Fällen in Deutschland (Harendza 2011), welche im Zusammenhang mit EHEC-Infektionen des Serotyps O104:H4 standen. Als Infektionsüberträger wurden Bockshornklee-Sprossen identifiziert und ein Zusammenhang zwischen deren Verzehr und dem Risiko zu erkranken festgestellt (RKI 2011).

Ödemkrankheits-*E. coli* (EDEC) sind Erreger der Ödemkrankheit beim Schwein. Betroffen sind Absatzferkel, welche typischerweise Ödeme am Nasenrücken, den Augenlidern und am Unterbauch aufweisen. Lungen- bzw. Gehirnödeme führen zu Dyspnoe und ZNS-Symptomatiken. Als Virulenzfaktoren sind F18ab- und AIDA-I-Fimbrien bekannt. STEC bilden

das Endothelzellen-zerstörende Shigatoxin 2e (Stx2e) und zum Teil auch α -Hämolysin (Wieler et al. 2015).

Enteroaggregative *E. coli* (EAEC-I) sind Verursacher von akuten und persistierenden Durchfällen vor allem bei Kindern. EAEC-I verursachen Darmstörungen und rufen eine verstärkte Mukusproduktion hervor, was zur Biofilmbildung führt. Sie besitzen Virulenzplasmide, welche für verschiedene aggregative Fimbrien kodieren können (Tschäpe et al. 2009).

Extraintestinale pathogene *E. coli* (ExPEC):

Häufigstes Krankheitsbild bei extraintestinalen pathogenen *E. coli* sind Harnwegsinfektionen (Zystitis, Urethritis, Urethrozystitis, Pyelonephritis) bei Menschen und Tieren (Hund und Katze). Verursacht werden diese durch uropathogene *E. coli* (UPEC). Den ExPEC ebenfalls zugehörig sind die septikämischen *E. coli* (SEPEC), welche für Septikämien bei Menschen, Kälbern und Lämmern verantwortlich sind. Aviäre pathogene *E. coli* (APEC) sind Verursacher der Colibakteriose, eine systemische *E. coli*-Infektion beim Wirtschaftsgeflügel (Wieler et al. 2015).

2.1.1 Phylogenetik von *E. coli*

Für *E. coli* sind acht Phylogruppen nach Clermont et al. (2013) bekannt: A, B1, B2, C, D, E, F und Clade I. Diesen acht Hauptgruppen lassen sich 95 % der *E. coli*-Isolate zuordnen. Ursprünglich wurden *E. coli*-Isolate den vier Phylogruppen A, B1, B2 oder D zugeordnet. Dafür wurde eine Phylo-PCR zum Nachweis von den zwei Genen *chuA* und *yjaA*, sowie des DNA-Fragments TspE4.C2 durchgeführt (Clermont et al. 2000). Durch den Einsatz von Multi-Locus-Sequenz-Typisierungen (MLST) konnten *E. coli*-Isolate genauer bestimmt und eingeordnet werden, weshalb die Phylogruppeneinordnung nach Clermont et al. (2000) von vier auf acht Phylogruppen ausgeweitet worden ist. Die Triplex-PCR nach Clermont et al. (2000) war nur darauf ausgelegt *E. coli*-Isolate in eine der vier Phylogruppen A, B1, B2 oder D einzuordnen, weshalb die Phylo-PCR nach Clermont et al. (2000) im Jahr 2013 überholt und angepasst wurde (Clermont et al. 2013).

2.1.2 *E. coli*-Prävalenz im Lebensmittel

Lebensmittelhygiene ist ein wichtiger Faktor des Verbraucherschutzes. Kontaminierte Lebensmittel können zu schwerwiegenden Erkrankungen führen und stellen ein Risiko für Verbraucher dar. Insbesondere junge, alte und immunsupprimierte Menschen, sowie schwangere Frauen sind gefährdet und werden auch als YOPIs bezeichnet. YOPIs steht als Abkürzung für die englischen Wörter „young“, „old“, „pregnant“ und „immunosuppressed“.

Unter den tierischen Lebensmitteln hat Fleisch ein hohes Übertragungspotential von Lebensmittelerregern auf den Menschen. Es ist nicht möglich jeden Erreger im Fleisch zu überwachen, weshalb es sogenannte Fäkalindikatoren gibt. Zu diesen gehören *E. coli* und andere koliforme Bakterien wie *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Cronobacter* und *Klebsiella*. Wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben, ist *E. coli* ein Kommensale des Darmtraktes bei Menschen und Tieren. Das Vorkommen von *E. coli* außerhalb des Darmtraktes lässt daher auf eine fäkale Verunreinigung des Trinkwassers bzw. des Lebensmittels schließen. Mit dem Vorhandensein oder Nichtvorhandensein der Fäkalindikatoren kann die Wirksamkeit der Hygienemaßnahmen bei der Aufbereitung des Trinkwassers bzw. bei der Verarbeitung des Lebensmittels überprüft werden. *E. coli* kann auf verschiedenen Wegen das Lebensmittel entlang der Lebensmittelkette und während der Lebensmittelherstellung kontaminieren. So kann es beispielsweise durch Berührung zu einer direkten Kontamination des Lebensmittels kommen. Des Weiteren kann der Darm zerreißen oder bei der Schlachtung beschädigt werden, sodass es zu einer indirekten Kontamination durch kontaminierte Arbeitsgeräte oder kontaminiertes Trinkwasser kommen kann. Außerdem können Erreger beim Verpackungsprozess bei Nichteinhaltung von Personalhygiene, sowie durch Kreuzkontaminationen auf das Lebensmittel gelangen (Schroeder et al. 2004). Die zu den enteropathogenen *E. coli* zugehörigen STEC und EHEC kommen natürlicherweise im Darmtrakt von (Wild-)Wiederkäuern vor und können beim Schlachtungs- und Verarbeitungsprozess auf das Lebensmittel gelangen. Laut dem Zoonosen-Monitoring-Bericht 2020 vom BVL waren 30 % der Kotproben von Mastkälbern und Jungrindern, sowie 20 % der Kotproben von Mastrindern positiv auf die pathogenen STEC getestet worden. Bei den Wildwiederkäuern waren vor allem Rehe STEC-Träger mit einem Anteil von 40,2 %. Durch fäkale Verunreinigungen mit enteropathogenen *E. coli* stellen Fleisch und verarbeitete Fleischprodukte eine Infektionsquelle für den Menschen dar. Die Kontamination mit STEC von Schlachtkörpern bei Mastkälbern, Jungrindern und Mastrindern lag bei 2 bis 6 %, die Kontamination von Kalb- und Jungrindfleisch bei bis zu 2 % (BVL 2020). Wildwiederkäuerfleisch, welches 2017 beprobt wurde, war zu 29,8 % mit STEC kontaminiert (BVL 2020). Die Jahresstatistik meldepflichtiger Krankheiten in Deutschland vom RKI zeigt, dass die Inzidenz von EHEC (STEC)-Erkrankungen (ohne HUS-Erkrankungen) im Jahre 2018 von 2,3 auf 2,7 gestiegen ist. Im Jahre 2019 sank der Inzidenzwert wieder auf 2,3. Die Inzidenz von HUS-Erkrankungen blieb in den Jahren 2018 und 2019 unverändert bei 0,1 (RKI 2019).

2.2 Charakterisierung von Bakteriozinen

Bakteriozine sind biologisch aktive, bakterizide Proteine, die ubiquitär vorkommen. Innerhalb einer Bakterien-Spezies können bis zu hundert verschiedene Bakteriozine produziert werden (Riley 2009). Bakteriozine werden ribosomal synthetisiert und wirken aktiv gegen gleiche oder nahe verwandte Bakterien-Spezies des Bakteriozin-bildenden Stammes, ohne diesen selbst abzutöten (Cascales et al. 2007). Der wesentliche Unterschied zu Antibiotika ist ihr enges Wirkungsspektrum und ihre ribosomale Synthese. Bakteriozine werden von gramnegativen sowie grampositiven Bakterien synthetisiert und werden daher in zwei Hauptgruppen eingeteilt (Riley 2009).

2.2.1 Bakteriozine grampositiver Bakterien

Bakteriozine grampositiver Bakterien sind antimikrobielle Peptide mit einem geringen Molekulargewicht. Milchsäurebakterien sind unter den grampositiven Bakterien die bekanntesten Bakteriozinproduzenten und produzieren eine Vielzahl von Bakteriozinen, welche sich hinsichtlich ihrer Größe, Struktur und Wirkungsspektrum unterscheiden. Tab. 2 stellt eine Übersicht über Bakteriozine grampositiver Bakterien dar.

Tab. 2 Klassifizierung von Bakteriozinen grampositiver Bakterien, modifiziert nach Yang et al. (2014)

Klassifizierung	Eigenschaften	Bakteriozine	Molekulargewicht in kDa	Produzent	Referenz
Klasse I	post-translational modifizierte, lineare oder kugelförmige Peptide mit Lanthioninen	Nisin A	3.352	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactic</i>	Field et al. (2012)
		Nisin U	3.029	<i>Streptococcus uberis</i>	Wirawan et al. (2006)
		Nisin Z	3.493	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactic</i>	Mulders et al. (1991)
		Mersacidin	1.824	<i>Bacillus</i> sp. Y85,54728	Chatterjee et al. (1992)
		Labyrinthopeptin A2	1.922	<i>Actinomadura</i> sp.	Meindl et al. (2010)
		Subtilosin A	3.399	<i>Bacillus subtilis</i> 168	Babasaki et al. (1985)

Literatur

Klasse II	Hitzestabile, unmodifizierte kleine Peptide ohne Lanthionine				
Klasse IIa	Pediocin PA-1 ähnliche Bakteriozine	pediocin PA-1	4.629	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC- 1.0	Henderson et al. (1992)
		carno- bacteriocin X	3.602	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> C2	Tulini et al. (2014)
Klasse IIb	bestehend aus zwei Peptiden	lactacin F	4.755	<i>Lactobacillus</i> spp.	Fremaux et al. (1993)
		ABP-118	4.096	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> UCC118	Flynn et al. (2002)
Klasse IIc	runde Peptide	carnocyclin A	5.862	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> UAL307	Martin-Visscher et al. (2008)
		enterocin AS- 48	7.149	<i>Enterococcus faecalis</i>	Samyn et al. (1994)
Klasse IId	lineares, einzelnes Peptid, nicht Pediocin ähnlich	epidermicin NI01	6.074	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Sandiford und Upton (2012)
		lactococcin A	5.778	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Holo et al. (1991)
Klasse III	große, hitzelabile Proteine	Caseicin 80	~42.000	<i>Lactobacillus casei</i> B80	Muller und Radler (1993)
		Enterolysin A	34.501	<i>Enterococcus faecalis</i> LMG 2333	Nilsen et al. (2003)
		Helveticin J	37.511	<i>Lactobacillus helveticus</i> 481	Joerger und Klaenhammer (1990)

Das bekannteste Bakteriozin bei grampositiven Bakterien ist das Bakteriozin Nisin, weshalb im Folgenden detaillierter auf Nisin und dessen Einsatz im Lebensmittel eingegangen wird.

2.2.1.1 Nisin

Nisin ist ein Bakteriozin, welches von *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* produziert wird. Es gehört der Klasse I der grampositiven Bakteriozine an, die auch als Lantibiotika bezeichnet werden. Lantibiotika sind kleine Peptide (19 - 39 Aminosäuren) und zeichnen sich durch ihre Thermostabilität aus (Balciunas et al. 2013). Es gibt zwei Varianten von Nisin, welche von Laktokokken produziert werden: Nisin A und Nisin Z. Zusätzlich gibt es das Nisin U, eine neuere Variante, welche von *Streptococcus uberis* gebildet wird. Nisin A und Nisin Z weisen mit Ausnahme von einer Aminosäure die gleiche Molekularstruktur auf und bestehen aus 34 Aminosäuren (Balciunas et al. 2013; Güllüce et al. 2013). Nisin besitzt ein breites Wirkungsspektrum und weist antimikrobielle Aktivität gegenüber pathogenen Laktobazillen, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* und *Bacillus cereus* auf (Balciunas et al. 2013). Nisin bildet in der Zielzelle Poren, wodurch es zu einem Ausstrom von Kalium-Ionen, Aminosäuren und Adenosintriphosphat (ATP) kommt. Die Folge ist eine Permeabilitätsänderung der Zelle mit anschließendem Zelltod (Balciunas et al. 2013). Darüber hinaus nutzt Nisin das Lipid II, ein Vorläufermolekül des Peptidoglykans, als Bindungsstelle und verhindert damit eine korrekte Zellwandsynthese (Duquesne et al. 2007b). Nisin weist ein breites antimikrobielles Spektrum auf und eignet sich deshalb sehr gut zur Bekämpfung von Lebensmittelerregern (Balciunas et al. 2013). Nisin findet bereits erfolgreiche Anwendung in verschiedenen Lebensmitteln, beispielsweise gegen *Listeria monocytogenes* in Hütten- und Ricottakäse (Davies et al. 1997; Ferreira und Lund 1996). Wichtig bei dem Einsatz von Bakteriozinen ist die chemische Zusammensetzung sowie die natürlichen Eigenschaften des Lebensmittels, da diese einen Einfluss auf die Wirkung von Bakteriozinen haben können. So ist Nisin beispielsweise besser löslich bei niedrigen pH-Werten (Liu und Hansen 1990).

In den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) sind Antibiotikazusätze im Lebensmittel verboten. Nisin erhielt im Jahr 1988 von der „Food and Drug Administration“ (FDA) den „Generally Recognized as Safe“ (GRAS) Status (Cleveland et al. 2001). Um weitere Bakteriozine für den GRAS-Status anzumelden, müssen bestimmte Kriterien erfüllt sein. Zunächst muss das Bakteriozin identifiziert und charakterisiert sein und sich seine Effizienz in der Anwendung bewiesen haben. Darüber hinaus muss der Herstellungsprozess beschrieben werden sowie das Verfahren zur Quantifizierung und standardisierten Herstellung des Bakteriozins. Zudem müssen Berichte zur Toxizität und zur Wirkung des Bakteriozins im Körper nach oraler Aufnahme eingereicht werden (Cleveland et al. 2001).

2.2.2 Bakteriozine gramnegativer Bakterien

Bei Bakteriozinen gramnegativer Bakterien unterscheidet man vor allem zwischen Colizinen und Mikrozininen. Die wesentlichen Unterschiede sind in Tab. 3 aufgeführt. Sie unterscheiden

sich vor allem hinsichtlich ihres Molekulargewichtes und Wirkungsspektrums sowie ihrer Synthese und Freisetzung (Jack und Jung 2000).

Colizin V war das erste Bakteriozin, welches vor ungefähr 100 Jahren von Andre Gratia entdeckt wurde. Er beobachtete eine Wachstumshemmung von *E. coli* S durch Colizin V. Pierre Fredericq belegte 1946, dass Colizine Proteine sind und ihre hemmende Aktivität von spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche von sensiblen Zellen abhängig ist (Güllüce et al. 2013; Cascales et al. 2007). Nach heutigem Wissensstand ist Colizin V laut Definition ein Mikrozin und unter dem Namen Mikrozin V bekannt (Smarda und Smajs 1998).

Weitere relevante Bakteriozine gramnegativer Bakterien sind Klebicins produziert von *Klebsiella pneumoniae*, Marcescins produziert von *Serratia marcescens*, Cloacins produziert von *Enterobacter cloacae* und Pyocins produziert von *Pseudomonas* spp. (Güllüce et al. 2013; Cascales et al. 2007). Außerdem wurden erst kürzlich Salmocins, produziert von *Salmonella*, beschrieben (Schneider et al. 2018).

Tab. 3 Unterschiede von Colizinen und Mikrozinen

	Colizine	Mikrozine
Molekulargewicht	~ 60 kDa	< 10 kDa
Produktion	SOS-System induziert	kontinuierliche Sekretion
Zusammensetzung	3 Gene	6-7 Gene
Kodiert	plasmidkodiert	chromosomal- und plasmidkodiert
Freisetzung	nach Zellyse	ohne Zellyse
Wirkungsspektrum	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>

Die bekanntesten Vertreter von Bakteriozinen gramnegativer Bakterien sind Colizine, weshalb im Folgenden detaillierter auf die Nomenklatur und die Mechanismen von Colizinen eingegangen wird.

2.2.2.1 Colizine

In der Literatur sind bisher 34 Colizine beschrieben. Tab. 4 gibt einen Überblick über bereits bekannte Colizine, sowie deren Translokations- und Wirkungsmechanismen. Außerdem vermerkt sind das Molekulargewicht und der Ursprungstamm der jeweiligen Colizine.

Tab. 4 Übersicht über Colizine und Bakteriozine der *Enterobacteriaceae*, modifiziert nach Cursino et al. (2002) und Smarda und Smajs (1998)

Colizin	Translokation	Wirkungs- mechanismus	Molekular- gewicht in kDa	Produzent	Referenz
A	ToIA, B, Q, R	Porenbildung	62.989	<i>Citrobacter freundii</i>	Morlon et al. (1983); Fredericq (1948)
B	TonB/ExxB, D	Porenbildung	54.732	<i>E. coli</i>	Schramm et al. (1987); Fredericq (1948)
D	TonB/ExxB, D	Translations- hemmung	74.688	<i>E. coli</i>	Roos et al. (1989); Fredericq (1948)
E1	ToIA, B, Q, R	Porenbildung	52.279	<i>E. coli</i>	Chan et al. (1985); Fredericq (1948)
E2	ToIA, B, Q, R	DNA Endonuklease	61.561	<i>Shigella (Sh.) sonnei</i>	Cole et al. (1985); Fredericq (1948)
E3	ToIA, B, Q, R	rRNA Endonuklease	57.960	<i>E. coli</i>	Jakes und Zinder (1974);Fredericq (1948)
E4	ToIA, B, Q, R	rRNA Endonuklease	unbekannt	<i>E. coli</i>	Pugsley (1988); Hamon und Peron (1974)
E5	ToIA, B, Q, R	Translations- hemmung	unbekannt	<i>E. coli</i>	Lau und Condie (1989); Males und Stocker (1982)
E6	ToIA, B, Q, R	rRNA Endonuklease	58.011	<i>E. coli</i>	Akutsu et al. (1989); Males und Stocker (1982)
E7	ToIA, B, Q, R	DNA Endonuklease	61.349	<i>E. coli</i>	Chak et al. (1991); Males und Stocker (1980)
E8	ToIA, B, Q, R	DNA Endonuklease	70.000	<i>E. coli</i>	Toba et al. (1988); Cooper und James (1984)
E9	ToIA, B, Q, R	DNA Endonuklease	unbekannt	<i>E. coli</i>	James et al. (1987); Cooper und James (1984)
G	TonB/ExxB, D	Membranlyse	5.500	<i>E. coli</i>	Bradley (1991); Fredericq (1948)
H	TonB/ExxB, D	Membranlyse	100	<i>E. coli</i>	Bradley (1991); Fredericq (1948)
la	TonB/ExxB, D	Porenbildung	69.406	<i>E. coli</i>	Konisky und Richards (1970);Fredericq (1948)
lb	TonB/ExxB, D	Porenbildung	69.963	<i>Sh. sonnei</i>	Konisky und Richards (1970);Fredericq (1948)

Literatur

Js	unbekannt	unbekannt	46.000	<i>Sh. sonnei</i>	Smarda et al. (1987); Abbott und Graham (1961)
K	TolA, B, Q, R	Porenbildung	59.611	<i>Sh. sonnei</i>	Pilsl und Braun (1995c); Fredericq (1948)
L °	TolA, Q, unbekannt	Porenbildung	45.000	<i>Serratia marcescens</i>	Foulds und Shemin (1969); Hauduroy und Papavassiliou (1962)
Bakteriozin 28b °	TolA, B, Q, R	Porenbildung	47.462	<i>Serratia marcescens</i>	Viejo et al. (1992)
M	TonB/ExxB, D	Mureinsynthese- hemmung	29.453	<i>E. coli</i>	Olschlager und Braun (1987); Fredericq (1951)
N	TolA, Q, R	Porenbildung	41.696	<i>E. coli</i>	Pugsley (1987); Hamon und Peron (1964)
Q	TonB/ExxB, D	unbekannt	unbekannt	<i>E. coli</i>	Smarda und Obdrzalek (1966)
S1	TonB/ExxB, D	Porenbildung	unbekannt	<i>Sh. boydii</i>	Smajs et al. (1997); Fredericq (1948)
S4	TolA, B, Q, R	Porenbildung	unbekannt	<i>E. coli</i>	Smajs et al. (1997); Fredericq (1948)
U	TolA, B, Q, R	Porenbildung	66.289	<i>Sh. boydii</i>	Smajs et al. (1997)
5	TonB/ExxB, D	Porenbildung	53.137	<i>E. coli</i>	Pilsl und Braun (1995a); Bradley und Howard (1992)
10	TonB/ExxB, D	Porenbildung	53.342	<i>E. coli</i>	Pilsl und Braun (1995b)
Pesticin I	TonB/ExxB, D	Hydrolyse von Murein	40.043	<i>Yersinia pestis</i>	Pilsl et al. (1996); Ben-Gurion und Hertman (1958)
Cloacin DF13	TolA, Q, R	rRNA Endonuklease	59.283	<i>Enterobacter cloacae</i>	Van Den Elzen et al. (1983); Stouthamer und Tieze (1966)
V (Mikrococin V)	CvaA, CvaB, CvaA*	Porenbildung	9	<i>E. coli</i>	Hwang et al. (1997)

° Colizin L und Bakteriozin 28b sind sehr ähnlich, wenn nicht sogar identisch (Guasch et al. 1995)

Colizine werden in zwei Gruppen eingeteilt. Gruppe A-Colizine sind auf kleinen Plasmiden kodiert und besitzen ein Lyse-Gen. Sie nutzen das Tol-Proteinsystem, um die äußere Membran von empfindlichen Bakterien zu durchdringen. Beispiele für Gruppe A-Colizine sind Colizin E1 bis E9, A, K, N und S4. Gruppe B-Colizine sind auf großen Plasmiden kodiert und besitzen kein Lyse-Gen. Sie nutzen das Ton-System, um die äußere Membran von empfindlichen Bakterien zu durchdringen. Beispiele für Gruppe B-Colizine sind Colizin 5, 10, B, D, M, V, Ia und Ib (Kleanthous 2010; Cascales et al. 2007). Colizine variieren in Form und

Größe und besitzen ein Molekulargewicht zwischen 30 und 70 kDa. Vom Grundprinzip her sind Colizine dennoch gleich aufgebaut. Alle Colizine setzen sich aus drei Anteilen zusammen: einer aminoterminalen-Translokations-Bindungsstelle (T), einer zentralen Rezeptorbindungsstelle (R) und einer carboxyterminalen-zytotoxischen-Bindungsstelle (C). Während die T-Bindungsstelle am Transfer durch die äußere Membran beteiligt ist, nimmt die C-Bindungsstelle entweder die Gestalt eines Pore-bildenden Ionophors an oder die eines Enzyms, welches Peptidoglykan, rRNA, tRNA oder DNA spaltet (Kleanthous 2010; Cascales et al. 2007).

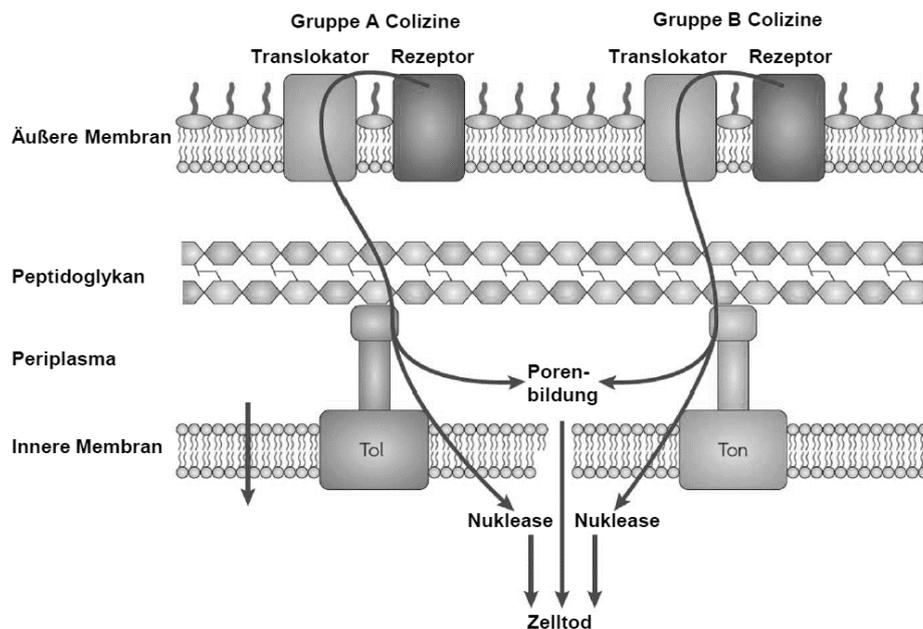


Abb. 1 Translokation der Colizine in eine *E. coli*-Zielzelle, modifiziert nach Kleanthous (2010): Colizine benötigen sowohl einen Rezeptor als auch einen Translokator, um die äußere Membran zu überwinden und entfalten mithilfe des Tol- bzw. Ton-Proteinsystems ihre lytische Aktivität.

Colizin-bildende Bakterien verhindern ihren eigenen Zelltod durch die Produktion eines Immunitäts-Proteins. Dieses Protein wird auf dem gleichen Plasmid wie die Colizine exprimiert (Kleanthous 2010; Cascales et al. 2007). Bei der Produktion von Peptidoglykan-spaltenden Colizinen befindet sich das Immunitäts-Protein an der inneren Membran der Colizin-bildenden Bakterienzelle (Olschlager et al. 1991). Bei der Produktion von Pore-bildenden Colizinen, befindet sich das Immunitäts-Protein in der inneren Membran der Produzentenbakterienzelle. Das Immunitäts-Protein blockiert die toxische Wirkung des Colizins auf die Colizin-bildende Bakterienzelle. Bei als Nuklease-wirkenden Colizinen wird das Immunitäts-Protein zeitgleich synthetisiert und bindet an die Nuklease-Bindungsstelle zur Neutralisierung der Nukleaseaktivität (Cascales et al. 2007; Kleanthous und Walker 2001).

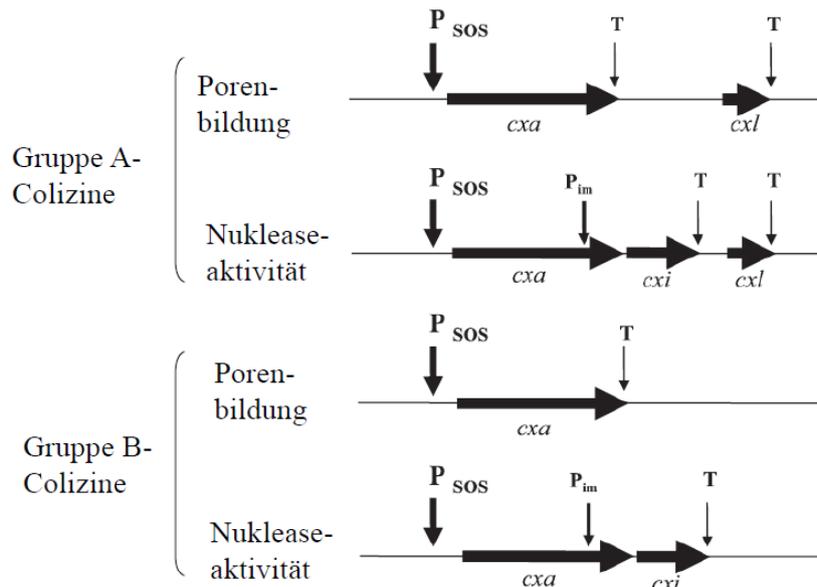


Abb. 2 Operonorganisation der Gruppe A- und B-Colizine modifiziert nach Cascales et al. (2007): SOS-Promoter (P_{sos}); Promoter für Immunität (P_{im}); Transkriptionsterminator (T); Colizin-Gen (cxa); Immunitäts-Gen (cxi); Lyse-Protein-Gen (cxl); bei den Genen steht das „x“ für das jeweilige Colizin

Die Organisation der Colizin-Operons ist in Abb. 2 dargestellt. Das erste Gen ist das Colizin-Gen (cxa), welches für das jeweilige Colizin kodiert. Bei Poren-bildenden Gruppe B-Colizinen ist es das einzige kodierende Gen. Bei Gruppe A- und B-Colizinen mit Nukleaseaktivität folgt auf das Colizin-Gen cxa immer das Immunitäts-Gen (cxi). Poren-bildende Gruppe A- und B-Colizine hingegen, weisen kein Immunitäts-Gen auf. Zur Regulation gibt es den Promotor für Immunität (P_{im}) und einen SOS-Promoter (P_{sos}). P_{sos} kommt sowohl bei ionophoren Colizinen als auch bei Colizinen mit Nukleaseaktivität vor, P_{im} dagegen nur bei Colizinen mit Nukleaseaktivität. Das letzte Gen im Operon ist das Lyse-Protein-Gen cxl . Ionophore Gruppe B-Colizine besitzen kein cxl . Das Lyse-Protein ist für die Freisetzung der Colizine und den Zelltod der Zielzelle verantwortlich (Cascales et al. 2007). Colizine der Gruppe A werden mithilfe eines Lyse-Proteins in das die Bakterienzelle umgebende Medium freigesetzt. Nuklease-Colizine werden zusammen mit ihrem Immunitäts-Protein als Heterodimere freigesetzt. Alle anderen Colizine werden als Monomere freigesetzt (Cascales et al. 2007). Reguliert wird das Colizin-Operon durch den LexA-Promoter und sein konstitutives Operon, welches das Immunitäts-Protein kontinuierlich produziert. Damit wird sichergestellt, dass kein freies Colizin vorliegt, welches die Colizinproduzenten angreifen könnte (Cascales et al. 2007).

Die Colizin-Expression ist SOS-System induziert (Gillor et al. 2008). Als Auslöser sind sogenannte Stressoren bekannt, welche Schäden an der DNA auslösen und somit das SOS-System aktivieren (Maslowska et al. 2019). Beispiele für Stressoren sind DNA-zerstörende

Substanzen (z. B. Mitomycin C), oxidativer Stress, extreme pH-Werte oder Temperaturen (Hitzeschock, Kälteschock), UV-Licht Bestrahlung, Nährstoffmangel, anaerobe Verhältnisse, extreme Osmolarität oder auch Katabolitrepression. Studien zeigen, dass vor allem mutagene Substanzen zu einer verstärkten Bakteriozinexpression führen (Ghazaryan et al. 2014).

Nach der Colizin-Expression folgt die Colizin-Translokation, welche den Durchtritt der Colizine durch die Membran beschreibt. Dabei wird zwischen der Translokation durch die äußere Membran und der Translokation durch die innere Membran unterschieden. Auf dem Weg von der äußeren zur inneren Membran liegt der Transit durch das Periplasma (Abb. 1). Bei Gruppe A-Colizinen, mit Ausnahme von Colizin N, gibt es zwei äußere Membranproteine für den Zelleintritt: einen Oberflächenrezeptor, der nicht an der Translokation beteiligt ist und OmpF oder TolC für den Eintritt in die Zelle. BtuB ist ein Rezeptor, welcher Colizin E1 – E9 und Colizin A bindet und mit OmpF ein BtuB-OmpF-Colizin-Translokon bildet (Cascales et al. 2007). In Abb. 3 ist die Translokation für Gruppe A- und B- Colizine dargestellt. Bei Colizin A-Colizinen bindet das Colizin an den äußeren Membranrezeptor. Diese Bindung führt dazu, dass sich ein Translokon bildet und das Colizin über seine Translokationsdomäne mit dem Tol-System in Verbindung treten kann (Abb. 3). Die für die Zielzelle letale Aktivitätsdomäne wird über einen bisher unbekanntem Mechanismus über das Periplasma transportiert und bildet entweder eine Pore oder wird ins Zytoplasma der Zielzelle transloziert, um dort seine Nukleaseaktivität zu entfalten (Cascales et al. 2007). Gruppe B-Colizine binden mit ihrer Rezeptordomäne an einen Tunnel, welcher TonB-abhängig ist. Durch die Bindung der Gruppe B-Colizine wird das Ton-System aktiviert. TonB bildet einen Komplex mit den inneren Membranproteinen ExbB und/oder ExbD. Dieser Komplex bringt Energie hervor, welche es der Translokationsdomäne des Colizins ermöglicht die äußere Membran zu passieren und direkt mit TonB zu interagieren. Auch bei Colizinen der Gruppe B ist der Mechanismus, der die letale Aktivitätsdomäne des Colizins in das Zytoplasma der Zielzelle bringt, bisher unbekannt (Cascales et al. 2007).

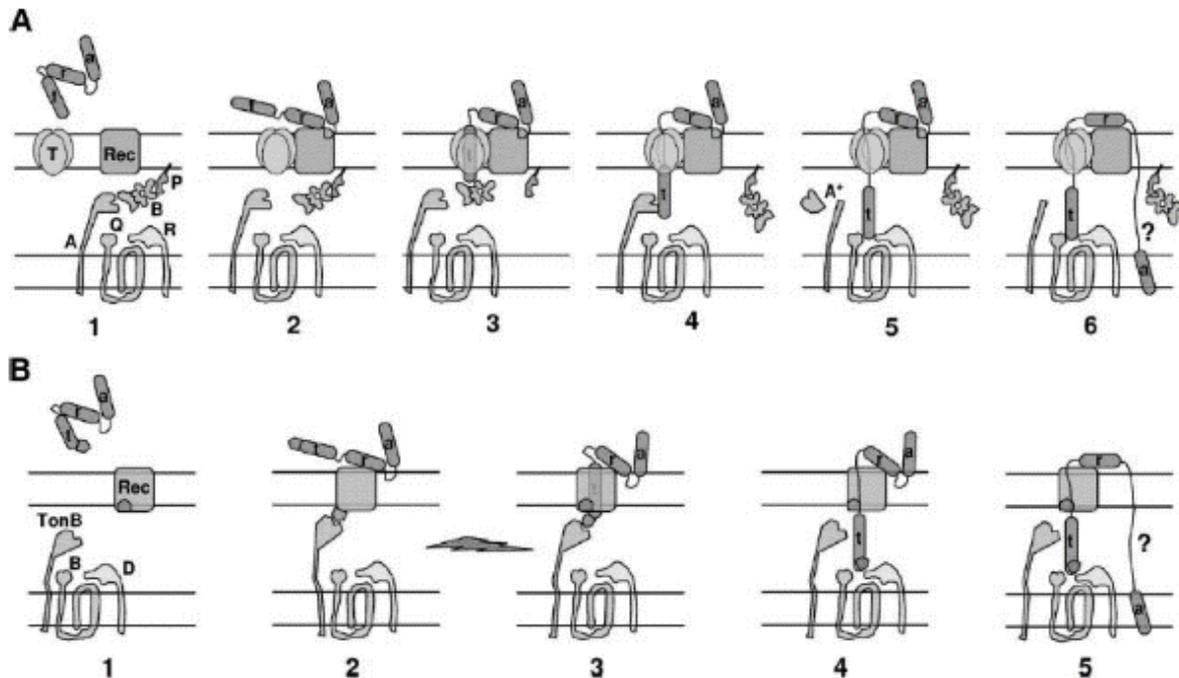


Abb. 3 Colizin-Translokation im Detail, modifiziert nach Cascales et al. (2007):

A: Gruppe A-Colizine; B: Gruppe B-Colizine; t,r,a: Colizin mit Translokations-, Rezeptor- und Aktivitätsdomäne; T: Translokon; Rec: äußerer Membranrezeptor; A, Q, B, P, R: Tol-System-Komplex; A*: Abbauprodukt von TolA; Ton B: Ton-System; B und D: ExbB und ExbD, innere Membranproteine; Pfeil in Reihe B: Energie

2.2.2.2 Mikrozine

Mikrozine sind ribosomal synthetisierte, hydrophobe antimikrobielle Peptide, welche durch ein geringes Molekulargewicht von bis zu 10 kDa gekennzeichnet sind. Sie werden hauptsächlich von der Gruppe der *Enterobacteriaceae* produziert und haben eine hohe Toleranz gegenüber Hitze, extremen pH-Werten und Proteasen (Rebuffat 2012). Mikrozine besitzen bakterizide Eigenschaften und verhindern das Wachstum der meisten *Enterobacteriaceae*. So erzielen sie antimikrobielle Wirkungen z. B. gegen *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* und *Shigella* (Duquesne et al. 2007b). Die Mechanismen sind denen der Colizine ähnlich. Sie bilden ebenfalls in empfänglichen Zellen Poren oder besetzen Rezeptoren von Eisen- oder Zuckertransportern und nutzen diese als Eintritt in die Zelle (Rebuffat 2013). Darüber hinaus besitzen Mikrozine Enzymaktivität und wirken als Nukleasen, wodurch sie die Proteinbiosynthese hemmen können. Mikrozine besitzen kein Lyse-Gen und werden kontinuierlich über das Type I ABC (ATP binding cassette)-Transporter-Sekretionssystem sezerniert (Duquesne et al. 2007b). Mikrozine lassen sich in zwei Klassen einteilen, welche sich hinsichtlich Molekulargewicht, Ausbildung von Disulfidbindungen und posttranslationalen

Modifikationen unterscheiden (Duquesne et al. 2007b). Klasse II gliedert sich zusätzlich in zwei Unterklassen (Tab. 5).

Tab. 5 Klassifizierung von Mikrozinigen gramnegativer Bakterien, modifiziert nach Yang et al. (2014) und Duquesne et al. (2007a)

Klassifizierung	Eigenschaften	Mikrozine	Molekulargewicht in kDa	Produzent	Referenz
Klasse I	Peptide mit geringem Molekulargewicht und post-translationaler Modifikation	B17	3.094	<i>E. coli</i>	Collin et al. (2013)
		C7/C51	1.177	<i>E. coli</i>	Severinov et al. (2007)
		D93	<1	<i>E. coli</i>	Martinez und Perez-Diaz (1986)
		J25	2.107	<i>E. coli</i>	Wilson et al. (2003)
Klasse II	5-10 kDa große Peptide mit oder ohne post-translationaler Modifikation				
Unterklasse IIa	> ein Gen wird benötigt, um funktionsfähige Peptide zu synthetisieren	L	8.884	<i>E. coli</i>	Pons et al. (2004)
		V	8.741	<i>E. coli</i>	Fath et al. (1994)
		N/24	7.274	<i>E. coli</i>	Corsini et al. (2010)
Unterklasse IIb	lineare Peptide mit oder ohne post-translationaler Modifikation am C-Ende	E492	7.886	<i>K. pneumoniae</i>	Pons et al. (2002)
		M	7.284	<i>E. coli</i>	Vassiliadis et al. (2010)
		H47	4.865	<i>E. coli</i>	Vassiliadis et al. (2010)

Mikrozine sind auf genetischer Ebene komplexer organisiert als Colizine und sind den Bakteriozinen grampositiver Bakterien ähnlich. Sie besitzen ein Strukturgen, welches für das Mikrozinvorläuferpeptid kodiert. Des Weiteren besitzen Mikrozine ein Immunitätsgen, welches für ein Immunitätsprotein kodiert. Dieses schützt die Produzentenzelle davor, selbst angegriffen zu werden. Außerdem besitzen Mikrozine Gene, welche für Peptide und Enzyme kodieren, die am Mikrozin-Export und an der posttranslationalen Modifikation beteiligt sind. Alle Mikrozine werden als inaktive Vorläuferpeptide produziert. Bevor das aktive Mikrozin vorliegt und sezerniert wird, unterlaufen die Mikrozinvorläuferpeptide posttranslationale Modifikationen (Rebuffat 2012). Eine Besonderheit weist das Mikrozin C auf, weil es die Zellmembran als unmodifiziertes Vorläuferpeptid überwindet. Erst in der Zielzelle findet der

letzte Modifikationsprozess statt, infolgedessen das Mikrozin C seine Toxizität entfaltet (Metlitskaya et al. 2009).

Abb. 4, modifiziert nach Yang et al. (2014), gibt einen zusammenfassenden Überblick über die Synthese von Bakteriozinen gramnegativer Bakterien, sowie deren antimikrobielle Wirkungsmechanismen.

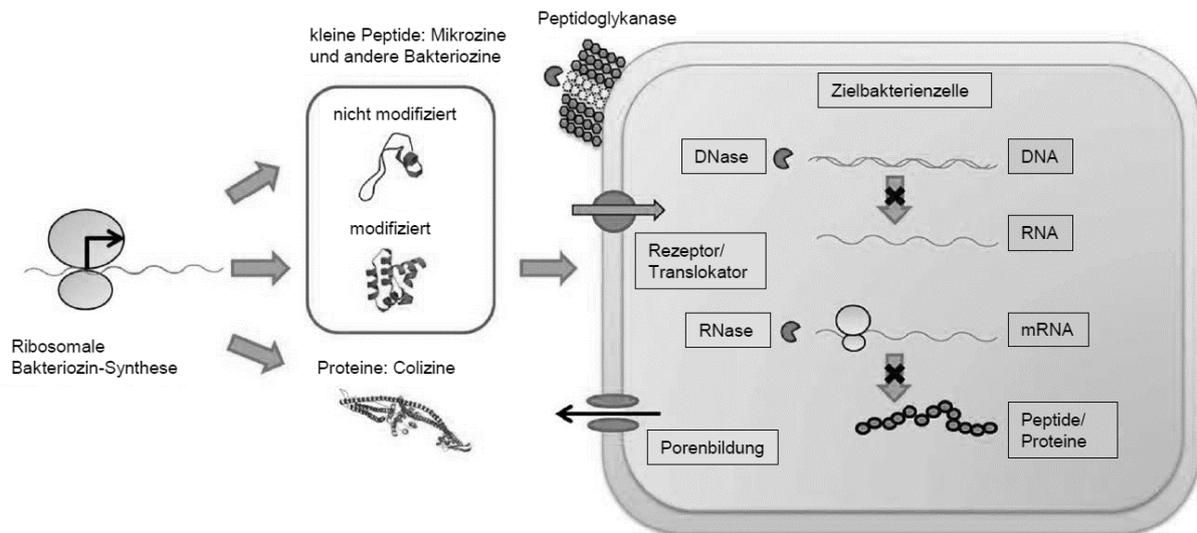


Abb. 4 Synthese und Wirkungsmechanismen von Bakteriozinen gramnegativer Bakterien, modifiziert nach Yang et al. (2014)

2.3 Dekontaminationsmaßnahmen von Lebensmitteln: Welche Rolle spielt der Einsatz von Bakteriozinen?

Die bisherigen Dekontaminationsmaßnahmen in der Lebensmittelindustrie dienen dazu die Haltbarkeit von Lebensmitteln zu verlängern. So kommen Konservierungsmittel wie z. B. Nitrite oder oxidiertes Schwefel zum Einsatz. Diese sollen das Bakterienwachstum und den damit einhergehenden Verderb verzögern. Bakteriozine besitzen antimikrobielle Eigenschaften und weisen ein enges Wirkungsspektrum auf. Außerdem sind bisher keine Nebenwirkungen oder toxischen Effekte bekannt (Cleveland et al. 2001). Das von Milchsäurebakterien produzierte Bakteriozin Nisin findet bereits weltweiten Einsatz in Lebensmittelsystemen und wird in Deutschland als Zusatzstoff E234 (ZZuIV, Anlage 5, Teil C, Liste 2) in der Lebensmittelproduktion eingesetzt. In Studien konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Nisin sicher ist und Potenzial als natürlicher Konservierungsstoff besitzt (Cleveland et al. 2001). Allerdings sollten Lebensmittel nicht durch den alleinigen Zusatz von Bakteriozinen konserviert werden. Bakteriozine eignen sich gut, um nach dem Hürdenmodell kombiniert zu werden. Beim Hürdenmodell nach Leistner (1992) werden verschiedene Einflussfaktoren kombiniert, welche den Verderb vom Lebensmittel verzögern. Beispiele für Einflussfaktoren

sind Temperatur, pH-Wert, aw-Wert oder Konservierungsstoffe, welche synergistisch wirken und in Kombination einen Konservierungseffekt im Lebensmittel erzielen. Das Hürdenmodell führt zur Beseitigung und Kontrolle von mikrobiellen Erregern im Lebensmittel (Cleveland et al. 2001).

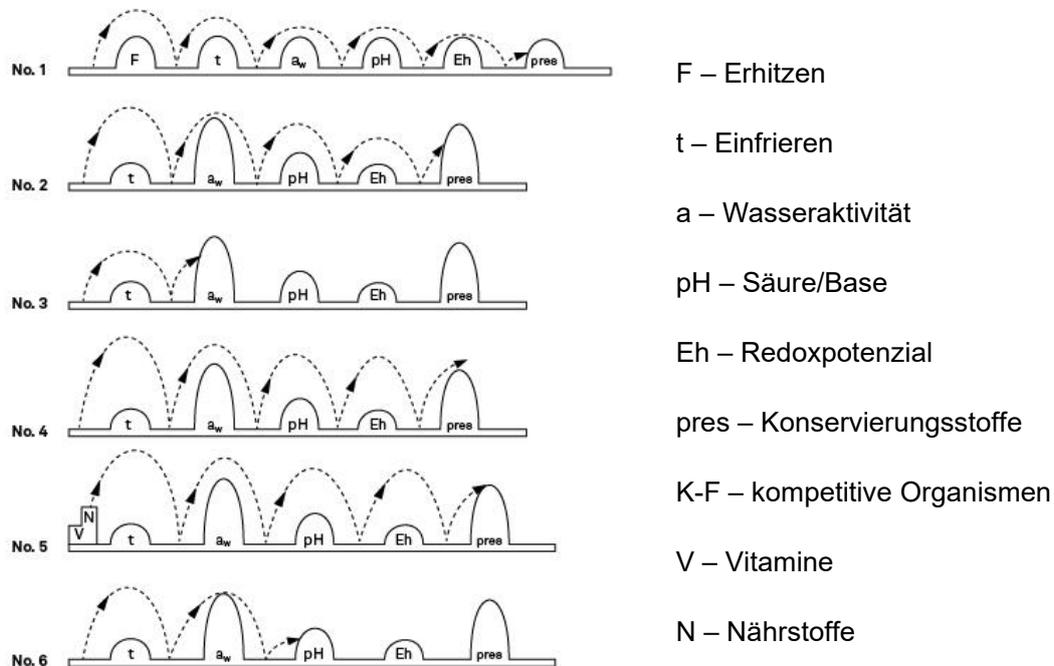


Abb. 5 Hürdenmodell modifiziert nach Leistner (1992): Dargestellt sind verschiedene äußere Einflussfaktoren, welche synergistisch wirken und mikrobiellen Verderb verzögern oder verhindern können.

In der europäischen Union (EU) sind Bakteriozine gramnegativer Bakterien noch nicht für den Einsatz im Lebensmittel zugelassen. Im Vergleich dazu finden sie in den USA bereits Anwendung. So erhielten bereits neun Colizine (Colizin E1, E7, Ia, M, N, K, U, 5, B) den GRAS-Status von der FDA im Jahr 2015 und 2016 (GRN 676. 2016; GRN 593. 2015). Die Verwendung der Colizine erfolgt dabei als antimikrobielles Agens in Lebensmitteln zur Abtötung von enteropathogenen *E. coli*. Die eingesetzten Colizine werden von Wirtspflanzen produziert, welche bei der FDA zugelassen sind. Als Wirtspflanzen kommen Spinatpflanzen (*Spinacia oleracea*), rote Beete (*Beta vulgaris*) und grüner Salat (*Lactuca sativa*) zum Einsatz (GRN 593. 2015). Es gibt zwei Methoden, damit diese Pflanzen Colizine produzieren. Zum einen werden Colizin-Gene mit Hilfe des Vektors *Agrobacterium tumefaciens* in die Wirtspflanze eingeschleust, welches einen natürlichen Gentransfer darstellt (Gleba et al. 2014). Zum anderen werden transgene Pflanzen verwendet, bei welchen die Colizin-Gene mit einem Ethanol-Promoter verknüpft sind, über welchen die Colizin-Produktion steuerbar ist. Das Ethanol wird vor Gewinnung der Proteine metabolisiert oder verdampft und ist im Endprodukt

nicht vorhanden (Werner et al. 2011). Im Jahre 2017 wurde eine Tabakpflanze (*Nicotiana benthamiana*) als weitere Wirtspflanze von der FDA zugelassen (GRN 775. 2017).

Laut GRN 593 (2015) ist der Einsatz der oben genannten Colizine einzeln oder in Kombination möglich. Der Vorteil einer Colizin-Kombination ist, dass verschiedene Colizine unterschiedliche Wirkungsmechanismen aufweisen und somit der Erfolg größer ist die Zielzellen von enteropathogenen *E. Coli* zu zerstören. Außerdem beschreibt GRN 593 (2015) den Einsatz von Colizinen auf verarbeitetem Obst und Gemüse. Hierzu werden die Colizine als Konzentrat oder als getrocknete Puder verkauft und in Wasser nach entsprechender Anleitung gemischt oder aufgelöst. Das fertige Produkt wird durch Sprühen bzw. durch einen Waschprozess auf Obst und Gemüse aufgebracht. Außerdem kann das Produkt als Verpackungsfüllstoff verwendet werden (GRN 593. 2015). Im Jahre 2016 wurde die Zulassung für den Einsatz von Colizinen auf Fleischprodukten, vor allem rotem Fleisch (Rind, Kalb, Fleisch, Lamm, Hammel), erweitert (GRN 676. 2016). Als Anwendungsart kam der Einsatz in der Marinade hinzu (GRN 676. 2016).

Ein weiterer Ansatz zur Reduktion von *Enterobacteriaceae* ist die Anwendung Colizin-ähnlicher Bakteriozine von *Salmonella*. In der Studie von Schneider et al. (2018) wurden fünf *Salmonella* Sequenzen identifiziert, welche für Bakteriozine kodieren. Diese *Salmonella*-Colizine („Salmocins“) zeigten sowohl Nukleaseaktivität (DNase und RNase) als auch Porenbildung in den Zielzellen. Die Proteine der Salmocin-Gene konnten ebenfalls in Nikotinpflanzen exprimiert werden (Schneider et al. 2018). *Escherichia* und *Salmonella* sind nah verwandte Gattungen und gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Schneider et al. (2018) beschreibt den erfolgreichen Einsatz von Salmocinen als antibakterielle Komponente auf Lebensmittel-Matrices (Fleisch) und deren Potenzial als neue „Nicht-Antibiotika-Bakterizide“. Darüberhinaus sind erste Erfolge des kombinierten Einsatzes von Colizinen und Salmocinen auf Lebensmitteloberflächen beschrieben worden (Hahn-Lobmann et al. 2019).

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

In Tab. 6 sind alle in den Versuchen verwendeten Chemikalien und Reagenzien aufgeführt.

Tab. 6 Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
Acetonitril	Roth, Karlsruhe, D
Acrylamid 40 %	Roth, Karlsruhe, D
Agar Agar	VWR Chemicals, Darmstadt, D
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt, D
Ammoniumsulfat (AMS)	Merck, Darmstadt, D
Bruker Matrix HCCA	Bruker Daltonik, Bremen, D
Chelex® 100 Resin	BioRad, München, D
Coomassie Brilliant Blau G 250	Roth, Karlsruhe, D
Coraload PCR Buffer	Qiagen, Hilden, D
dNTP Set, 100mM	Thermo Fisher Scientific, Henningsdorf, D
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
GeneRuler™ Low Range-Marker	Thermo Fisher Scientific, Henningsdorf, D
GR Green	Labgene, Chatel St. Denis, Schweiz
Magnesiumchlorid, 25 mM	Qiagen, Hilden, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe, D
PBS Tabletten	Merck, Darmstadt, D
Protein™ Dual Color Standard-Marker	BioRad, Kalifornien, USA
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe, D
SDS, ultrapure	Roth, Karlsruhe, D
Taq-Polymerase, 5 U/µl	Qiagen, Hilden, D
TBE-Puffer 10x (Tris-Borat-EDTA)	Roth, Karlsruhe, D
TE-Puffer	Roth, Karlsruhe, D
TEMED	Roth, Karlsruhe, D
Trifluoressigsäure	Roth, Karlsruhe, D
Trisbase	Merck, Darmstadt, D
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tween80	Merck, Darmstadt, D
10x PCR Puffer	Qiagen, Hilden, D

3.1.2 Nährmedien

Die Nährmedien in Tab. 7 wurden laut Herstellerangaben angesetzt.

Tab. 7 Übersicht der Nährmedien

Nährmedium	Hersteller	Artikel-Nr.
Luria-Bertani-Agar (LB)	Merck, Darmstadt, D	110283
Luria-Bertani-Medium (LB)	Merck, Darmstadt, D	110285
MacConkey No. 3-Agar (MC)	Oxoid, Wesel, D	CM0115
Mossel-Bouillon/ <i>Enterobacteriaceae</i> Anreicherung (EE)	Merck, Darmstadt, D	105394
Peptonwasser, gepuffert	Oxoid, Wesel, D	CM509
Trypton Galle X-glucuronide-Agar (TBX)	Merck, Darmstadt, D	116122

3.1.3 Bakterienstämme

Eine Übersicht über die Bakterienstämme ist in Tab. 8 dargestellt. Die Bakterienstämme wurden vom „Bundesinstitut für Risikobewertung Berlin“ (BfR) und vom „Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic“ zur Verfügung gestellt und dienen als Referenzstämme zur Detektion der Bakteriozinbildung.

Tab. 8 Übersicht der Referenzstämme und deren Herkunft

Spezies	Stamm	Herkunft
<i>E. coli</i>	K-12 DH5 α	J.A. Hammerl, BfR
<i>E. coli</i>	K-12 ϕ	Smajs et al. (2010), interne Stammsammlung
<i>E. coli</i>	K-12 P400	Smajs et al. (2010), interne Stammsammlung
<i>E. coli</i>	K-12 5K	Smajs et al. (2010), interne Stammsammlung
<i>E. coli</i>	K-12-Row	Smajs et al. (2010), interne Stammsammlung
<i>Shigella sonnei</i>	17	Smajs et al. (2010), interne Stammsammlung

3.1.4 Bakteriozinkonzentrat

Das Bakteriozinkonzentrat 2116 wurde aus dem Überstand des *E. coli*-Isolates 2116 hergestellt.

Tab. 9 Bakteriozinkonzentrat und Ursprungsisolat

Spezies	Konzentrat/ Isolat	Hersteller
<i>E. coli</i>	2116 (860/1c)	Dr. Felgenträger & Co. - Öko-chem. und Pharma GmbH
<i>E. coli</i>	2116	ILSH, FU Berlin

3.1.5 Primer

In Tab. 10 sind die Primersequenzen der Colizin- und Mikrozin-Gene und deren Amplikon-Länge aufgelistet.

Tab. 11 gibt die Primersequenzen für die Phylogruppenbestimmung mittels PCR wieder.

Tab. 10 Übersicht der Mikrozin- und Colizin-Primer

Bakteriozin	Primer ID	Primersequenz 5'-3'	PCR-Produkt [bp]	Referenz
Colizin A	ColA-F	CGTGGGGAAAAGTCATCATC	475	Smajs et al. (2010)
	ColA-R	GCTTTGCTCTTTCCTGATGC		
Colizin B	colicinB-F	AAGAAAATGACGAGAAGACG	493	Gordon und O'brien (2006)
	colicinB-R	GAAAGACCAAAGGCTATAAGG		
Colizin D	ColD-F	CTGGACTGCTGCTGGTGATA	420	Smajs et al. (2010)
	ColD-R	GAAGGTGCGCCTACTACTGC		
Colizin E1	colicinE1-F	TGTGGCATCGGGCGAGAATA	650	Gordon und O'brien (2006)
	colicinE1-R	CTGCTTCTGAAAAGCCTTTT		
Colizin E2	ColE2-F	TGATGCTGCTGCAAAGAG	409	Smajs et al. (2010)
	ColE2-R	TTCAAAGCGTCCCTACCAC		
Colizin E3	ColE3-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	413	Smajs et al. (2010)
	ColE3-R	TCGGATCTGGACCTTTCAAC		
Colizin E4	ColE4-F	GAAGGCTGCATTTGATGCT	409	Smajs et al. (2010)
	ColE4-R	CGGATCCGGACCTTTAATTT		
Colizin E5	ColE3-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	430	Smajs et al. (2010)
	ColE5-R	TTGAATTCTCGAATCGTCCA		
Colizin E6	ColE6-F	ACCGAACGTCCAGGTGTT	399	Smajs et al. (2010)
	ColE6-R	TTAGCCTGTCGCTCCTGAT		
Colizin E7	ColE7-F	GCATTCTGCCATCTGAAAT	431	Smajs et al. (2010)
	ColE7-R	CTTCTGCCACTTTCTTTTCG		
Colizin E8	ColE3-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	449	Smajs et al. (2010)
	ColE8-R	GACTGATTGGCTTGTGCTGA		
Colizin E9	ColE3-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	418	Smajs et al. (2010)
	ColE9-R	GACTTTTCTCCCTCCGACCT		
Colizin Ia	Colla-F	GCATGCAAATGACGCTCTTA	473	Smajs et al. (2010)
	Colla-R	GAGGACGCCAGTTCTCTGTC		
Colizin Ib	Collb-F	AACGAGTGGGTCGATGATTC	464	Smajs et al. (2010)
	Collb-R	CCTTTTCTGCGCTCGTATTC		
Colizin Js	ColJs-F	TCAAAATGTTTGGGCTCCTC	254	Smajs et al. (2010)
	ColJs-R	TAATCTGCCCTGTCCCACTG		
Colizin K	ColK-F	CAGAGGTCGCTGAACATGAA	469	Smajs et al. (2010)
	ColK-R	TCCGCTAAATCCTGAGCAAT		
Colizin M	ColM-F	GCTTACCACTTCGCAAAACC	429	Smajs et al. (2010)
	ColM-R	GAGCGACTCTCCGATAATGC		
Colizin N	ColN-F	AGCTTGGCGAGTATCTTGGA	401	Smajs et al. (2010)
	ColN-R	CAACACAGCCCCGAATAAAC		
Colizin S4	ColS4-F	TATATGGCCAACTGCTGGT	456	Smajs et al. (2010)
	ColS4-R	CGTAAGGACGGACACCTGTT		

Material und Methoden

Colizin U	ColU-F	TGATTGCTGCGAGAAAAATG	485	Smajs et al. (2010)
	ColU-R	TCTGACAGCCTCTCCCTGTT		
Colizin Y	ColY-F	GCAGGCAGAAAAGAACAAGG	477	Smajs et al. (2010)
	ColY-R	CGGACGTTATTTGCCTTCAT		
Colizin 5	Col5-F	CATTGGCAAAAGCGAAATCT	443	Smajs et al. (2010)
	Col5-R	TGCAACTCTGGAACAATCG		
Colizin 10	Col10-F	GGTTACCGGATTTCTGGAT	448	Smajs et al. (2010)
	Col10-R	TTCTAGATGCTTGGCCCACT		
Mikrozin B17	microcin B17-F	TCACGCCAGTCTCCATTAGGTGTTGGCATT	135	Gordon und O'brien (2006)
	microcin B17-R	TCCGCGCTGCCACCGTTTCCACCACTAC		
Mikrozin C7	mccFU-Q	AGTTGAGGGGCGTGTAAATTG	134	Smajs et al. (2010)
	mccFL-Q	CGTTCAACTGTTGCAATGCT		
Mikrozin H47	microcin H47-F	CACTTTCATCCCTTCGGATTG	227	Gordon und O'brien (2006)
	microcin H47-R	AGCTGAAGTCGCTGGCGCACCTCC		
Mikrozin J25	microcin J25-F	TCAGCCATAGAAAGATATAGGTGTACCAAT	175	Gordon und O'brien (2006)
	microcin J25-R	TGATTAAGCATTTTTCATTTTAATAAAGTGT		
Mikrozin L	microcin L-F	GGTAAATGATATATGAGAGAAATAACGTTA	233	Gordon und O'brien (2006)
	microcin L-R	TTTCGCTGAGTTGGAATTTCTGCTGCATC		
Mikrozin V	microcin V-F	CACACACAAAACGGGAGCTGTT	680	Gordon und O'brien (2006)
	microcin V-R	CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT		

Tab. 11 Übersicht der Phylo-PCR-Primer

PCR-Reaktion	Target	Primer ID	Primersequenz 5'-3'	PCR-Produkt [bp]	Referenz
Quad-ruplex	chuA	chuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	Clermont et al. (2013;2004;2000)
		chuA.2	TGCCGCCAGTACCAAGACA		
	yjaA	yjaA.1b	CAAACGTGAAGTGTGAGGAG	211	
		yjaA.2b	AATGCGTTCCTCAACCTGTG		
	TspE4.C2	TspE4.C2.1b	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152	
TspE4.C2.2b		AGTTTATCGCTGCGGGTCGC			
arpA	AceK.f	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400		
	ArpA1.r	TCTCCCCATACCGTACGCTA			
Gruppe E	arpA	ArpAgpE.f	GATTCCATCTTGTCAAATATGCC	301	Lescat et al. (2013)
		ArpAgpE.r	GAAAAGAAAAGAATTTCCCAAGAG		
Gruppe C	trpA	trpAgpC.1	AGTTTTATGCCAGTGCAGAG	219	Lescat et al. (2013)
		trpAgpC.2	TCTGCGCCGGTACGCCC		
Interne Kontrolle	trpA	trpBA.f	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489	Gordon et al. (2008)
		trpBA.r	GCAACGCGGCCTGGCGGAAG		

Für die Gelelektrophorese wurde ein Tris-Borat-EDTA (TBE)-haltiges Agarose-Gel gegossen (3%). Als Ladepuffer wurden 100 µl Coraload-PCR-Buffer mit 1 µl GRGreen versetzt.

3.1.6 Kits

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Kits zur Aufreinigung und zur Extraktion der PCR-Produkte aufgeführt (Tab. 12).

Tab. 12 Übersicht der Kits

Verwendungszweck	Kit-Name	Hersteller
PCR-Produktaufreinigung	GeneJET PCR Purification	Thermo Fisher Scientific, Hennigsdorf, D
PCR-Produkt Gel Extraktion	GeneJET Gel Extraction	Thermo Fisher Scientific, Hennigsdorf, D

3.1.7 Geräte und Software

In Tab. 13 sind die verwendeten Geräte aufgelistet. Tab. 14 zeigt die zur Auswertung genutzten Software-Programme.

Tab. 13 Übersicht Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Gel-Dokumentationsgerät	Alphalmager®	Proteinsimple, Kalifornien, USA
Inkubator	Modell 700	Memmert, Schwabach, D
Magnetrührer	COMBIMAG RCO	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, D
MALDI Biotyper	Microflex LT	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, D
MALDI-Targetplatte	96 target polished steel BC	
PCR-Cycler	C1000 Thermal Cycler S1000 Thermal Cycler	BioRad, München, D
Probenaufkonzentrierer	Concentrater Plus	Eppendorf, Hamburg, D
Proben-Homogenisator	Smasher, AES-Line	bioMérieux, Nürtingen, D
Reagenzglasschüttler	Vortex Genie 2	Bender und Hobein AG, Bruchsal, D
Spektrophotometer	NanoDrop 2000c	Thermo Scientific, Bonn, D
Thermomixer	Comfort (2 ml) Compact (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge	Centrifuge 5430R Centrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg, D

Tab. 14 Übersicht Software

Software	Hersteller
BioNumerics Version 7.1	Applied Maths, BE
MS Office 365 ProPlus	Microsoft, D

3.1.8 Verbrauchsmaterialien

Die Verbrauchsmaterialien des täglichen Laborbedarfs wurden von verschiedenen Firmen bezogen (NerbePlus, Sarstedt und VWR). Es handelte sich um Einweg-Materialien. In Tab. 15 sind weitere zur Anwendung gekommene Materialien aufgeführt.

Tab. 15 Übersicht weiterer Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Cryobank-Röhrchen	Mast Diagnostic, Reinfeld, D
Sterile BagFilter Tüten	Interscience, St Nom la Bretèche, F

3.2 Methoden

Nach der Isolierung und Identifizierung von *E. coli* aus Lebensmitteln wurden diese auf ihre Fähigkeit zur Bakteriozinproduktion und das Vorhandensein von Colizin- und Mikrozin-Genen untersucht. Um die Bakteriozine besser einzuordnen, wurde ihr Molekulargewicht mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) bestimmt. Das *E. coli*-Isolat mit der klarsten Lyse der Referenzstämmen wurde zur Konzentratherstellung ausgewählt und mit diesem die Zellzahlreduktionsversuche in Medium und im Lebensmittel durchgeführt. Abb. 6 zeigt einen Überblick über die einzelnen Versuchsschritte.

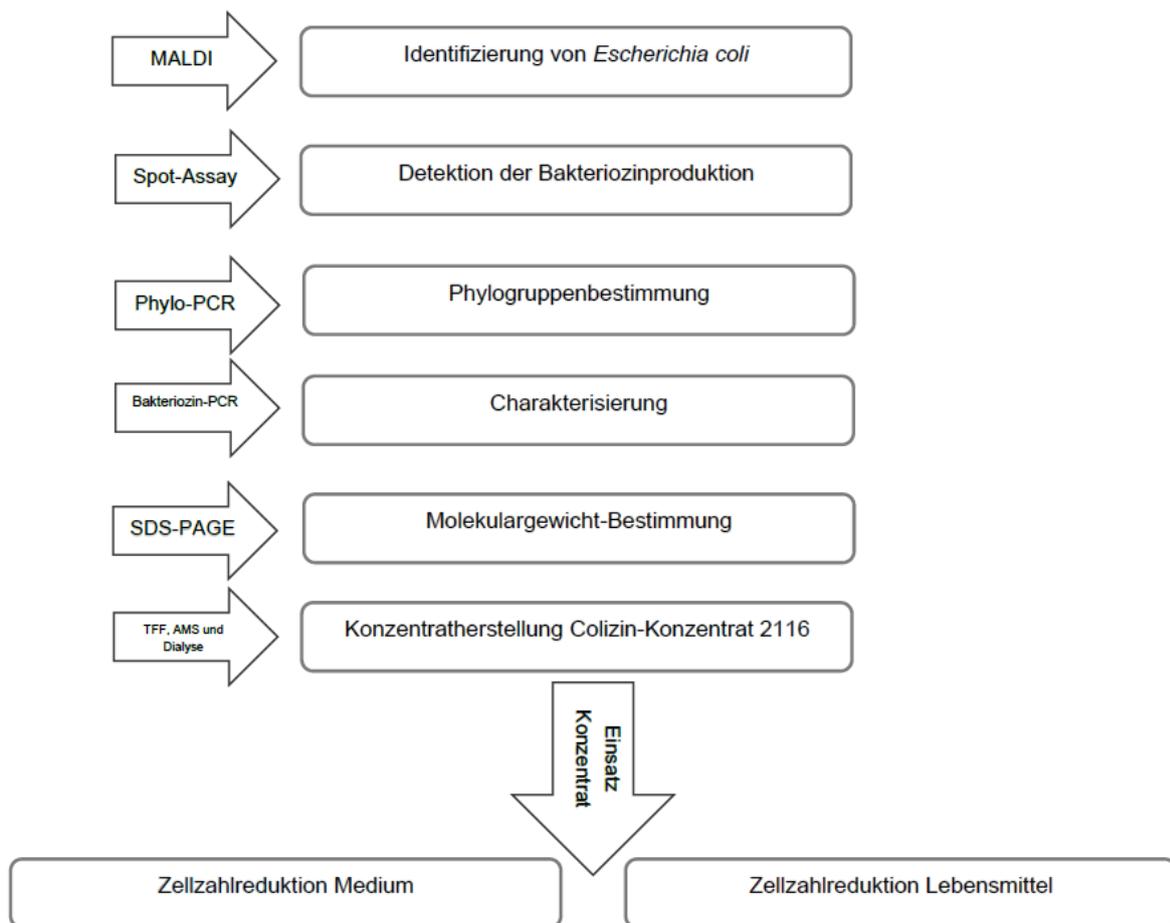


Abb. 6 Versuchsschritte Methoden: TFF (Tangentialflussfiltration), AMS (Ammoniumsulfat)

3.2.1 Isolierung der Bakterienstämme

Die Isolierung von *E. coli* erfolgte aus verschiedenen Lebensmittel-Matrices (Fleisch, Fisch-, Gemüse- und Fertigprodukten). Ein Teil der *E. coli*-Isolate waren bereits generiert und wurden der Stammsammlung des Instituts für Lebensmittelsicherheit und -hygiene der Freien Universität (ILSH) entnommen. Zum qualitativen Nachweis von *Enterobacteriaceae* wurden die Proben im Verhältnis 1:10 mit gepuffertem Peptonwasser gestomachert und für 18 h bei 37°C aerob inkubiert. Von dieser Voranreicherung wurde 1 ml entnommen und mit 10 ml

Mossel-Bouillon für 24 h bei 37°C aerob inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz als fraktionierter Verdünnungsausstrich auf MacConkey-Agar No.3 ohne Antibiotikum-Zusatz ausgestrichen und ebenfalls für 24 h bei 37° C aerob inkubiert. Von diesem wurden Kolonien gepickt, ihre Koloniemorphologien beschrieben und diese auf MacConkey-Agar No.3 ohne Antibiotikum-Zusatz vereinzelt und für weitere 24 h bei 37°C aerob inkubiert. Nach erfolgreicher Isolierung wurden die *Enterobacteriaceae*-Isolate mittels „Matrix-assisted laser desorption time-of-flight“ (MALDI-TOF) - Massenspektrometrie identifiziert.

3.2.2 Genus- und Speziesbestimmung der Bakterienisolate mittels MALDI-TOF

Die Identifizierung der Isolate erfolgte mittels MALDI-TOF (Murugaiyan et al. 2014). Als Erstes wurde die MALDI-Matrix (15 mg/ml) hergestellt. Dafür wurden folgende Bestandteile miteinander vermischt: 500 µl Acetonitril (50 %), 475 µl Aqua dest. und 25 µl Trifluoressigsäure (2,5%). 15 mg Bruker Matrix HCCA (α -Cyano-4-hydroxymethylsäure) wurden separat eingewogen und zusammen mit dem zuvor hergestellten Lösungsmittel für 5 min mit dem Vortexer homogenisiert. Anschließend wurde das Gemisch für 10 s zentrifugiert und die Matrix aliquotiert (50 – 100 µl). Die MALDI-Matrix wurde bei -20°C gelagert. Zum Messen wurde auf die MALDI-Targetplatte mithilfe von Zahnstochern Koloniematerial aufgetragen und mit 1 µl MALDI-Matrix überschichtet.

Die Auswertung erfolgte anhand eines zugeteilten Ergebnis-Wertes zwischen 0 und 3 (Tab. 16). Die Genus- und Speziesbestimmung der Bakterienisolate erfolgte durch den Vergleich des Massenspektrums mit einer hinterlegten Referenzdatenbank. Alle Isolate, die der Spezies *E. coli* zugeordnet werden konnten, wurden kultiviert (Kapitel 3.2.3).

Tab. 16 MALDI-Ergebnisse

Score	Bewertung
2.3 – 3.00	Spezies sehr wahrscheinlich richtig identifiziert
2.0 – 2.29	Genus sicher identifiziert, Spezies wahrscheinlich
1.7 – 1.99	Genus wahrscheinlich identifiziert
0.0 – 1.69	kein zuverlässiges Ergebnis

3.2.3 Kultivierung der Bakterienisolate

Nach erfolgreicher Spezies-Bestätigung der Bakterienisolate, erfolgte die Kultivierung auf Luria-Bertani (LB)-Agar-Platten, welche für 24 h bei 37°C aerob inkubiert wurden. Zum Herstellen der Cryobank™ (Mast diagnostica) Röhrchen wurden 2 ml LB-Medium mit Koloniematerial der Bakterienisolate inokuliert und für 24 h bei 37°C aerob inkubiert. Die Übernachtkultur wurde anschließend laut Anleitung der Cryobank™ überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.4 Detektion der Bakteriozinbildung im Spot-Assay

80 als *E. coli* identifizierte Isolate wurden im Spot-Assay auf ihre Lyse-Eigenschaften gegenüber den Referenzstämmen getestet (Tab. 8).

Vorbereitung der Agar-Platten für das Spot-Assay (Abb. 7):

Für eine Übernachtkultur (ÜNK) wurden 3 ml LB-Medium mit drei bis fünf Kolonien des Referenzstammes inokuliert und für 24 h bei 37°C aerob inkubiert. Zur Herstellung des Softagars (0,4 – 0,5 %) wurden 0,4 – 0,5 g Agar-Agar eingewogen und mit 100 ml LB-Medium versetzt. Der Softagar wurde mehrmals aufgekocht und anschließend im Wasserbad, bei Raumtemperatur (RT) oder unter fließendem Wasser, auf 40 - 50°C abgekühlt. Für den Softagar-Overlay wurden 200 µl der ÜNK des Referenzstammes mit 3 – 3,5 ml Softagar versetzt und auf eine LB-Agar-Platte gegossen. Die fertigen Agar-Platten wurden zum Abkühlen für 10-15 min bei RT stehen gelassen.

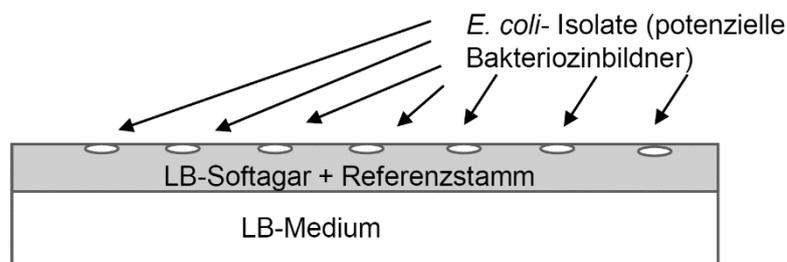


Abb. 7 Spot-Assay-Schema: Dargestellt ist eine mit Softagar überschichtete und mit Referenzstamm inokulierte Agar-Platte, sowie Spots der *E. coli*-Isolate

Zur Untersuchung der *E. coli*-Isolate auf ihre Lyse-Eigenschaften kamen die im Folgenden aufgeführten Varianten des Spot-Assays zum Einsatz. Bei allen Schritten wurde aerob für 24 h bei 37°C inkubiert.

1. Spotten der Übernachtskultur

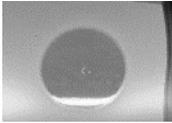
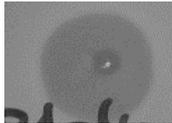
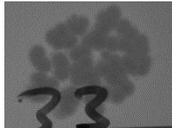
Zur Herstellung der ÜNK wurden 3 ml LB-Medium mit drei bis fünf Kolonien der zu untersuchenden *E. coli*-Isolate inokuliert und inkubiert. Von diesen ÜNK wurden jeweils 5 µl auf die mit Softagar-Overlay überschichteten LB-Agar Platten gespottet. Die Agar-Platten wurden nach dem Spotten für 10-15 min bei RT zum Trocknen stehen gelassen und anschließend inkubiert und am Folgetag ausgewertet.

2. Spotten des Bakteriozin-Extrakts

Es wurden 3 ml LB-Medium mit drei bis fünf Kolonien der zu untersuchenden *E. coli*-Isolate inokuliert und inkubiert. Für die Bakteriozin-Extraktion wurden 900 µl ÜNK für 5 – 10 min mit 1600 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet der ÜNK wurde in 100 µl 0,5%-igem Tween 80 resuspendiert. Die Verdünnung von der Tween 80 Stammlösung erfolgte mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Anschließend wurde der pH-Wert mit 2,5 µl HCl (1mol/l, 1N) auf pH 2 eingestellt und für 5 min bei 99°C im Thermomixer gekocht. Die Proben wurden sofort nach dem Kochen in einem Eisbad abgekühlt und der pH-Wert mit 2,5 µl NaOH (1mol/l, 1N) auf pH 7 eingestellt. Zum Abschluss der Extraktion wurden die Proben für 10 min mit 1600 g zentrifugiert und der Überstand (in diesem Fall das Extrakt) abgenommen und in 0,5 ml große Mikroreaktionsgefäße überführt. Gespottet wurden jeweils 5 µl der Extrakte von den zu untersuchenden *E. coli*-Isolaten auf, die mit Softagar-Overlay überschichteten, LB-Agar Platten. Die Agar-Platten wurden nach dem Spotten für 10-15 min bei RT zum Trocknen stehen gelassen, anschließend inkubiert und am Folgetag ausgewertet. Die Lagerung der Extrakte erfolgte bei - 20°C.

Die Auswertung der Spot-Assay Agar-Platten erfolgte nach erfolgreicher Inkubation anhand von Tab. 17.

Tab. 17 Auswertungsgrundlage Spot-Assay

Bewertungssymbol und Beispielbild	Lyse-Eigenschaft	Beschreibung der Lyse
+++ 	sehr klare Lyse	kein Wachstum des Referenzstammes
++ 	klare Lyse	vereinzelt Kolonien des Referenzstammes
+ 	unklare Lyse	Referenzstamm weitestgehend im Wachstum gehemmt
(+) 	schwache Lyse	Referenzstamm kaum im Wachstum gehemmt
- 	keine Lyse	Wachstum des Referenzstammes
Spot 	Phagolyse	1 > kleiner Spot (Lysehof)

3.2.5 DNA-Extraktion mit Chelex® 100 Resin-Lösung

Für die Extraktion der DNA aus den *E. coli*-Isolaten wurde Koloniematerial der Isolate in 250 µl – 500 µl 0,1%-igem TE-Puffer (10 ml 1 M Tris HCl mit 400 µl 0,25 M EDTA add 990ml Aqua dest) suspendiert. Die Probe wurde anschließend für 10 min mit 1600 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. 250 – 500 µl 5%-ige Chelex® 100 Resin-Lösung (5 g Chelex Pulver add 95 ml Aqua dest) wurde zum Pellet hinzugegeben und das Pellet resuspendiert und anschließend gevortext. Weiter wurde die Probe für 30 - 60 min bei 56°C und 700 rpm im Thermomixer inkubiert und die Temperatur anschließend auf 95°C erhöht und die Probe bei 700 rpm für 23 min (8 min Aufwärmphase, 15 min Extraktion) inkubiert. Nach Abschluss der Extraktion wurde die Probe für 6 min mit 1600 g zentrifugiert und 100 µl des Überstands in ein 0,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt (DNA-Extrakt). Die Lagerung der DNA-Extrakte erfolgte bei 4°C.

3.2.6 Nachweis bekannter Colizin- und Mikrozin-Gene

Die im Spot-Assay lysierenden *E. coli*-Isolate wurden auf das Vorhandensein von 23 bekannten Colizin-Genen (A, B, D, E1-E9, Ia, Ib, Js, K, M, N, S4, U, Y, 5, 10) sowie von sechs Mikrozin-Genen (B17, C7, H47, J25, L, V) gescreent. Dafür wurden fünf Multiplex- sowie drei Singleplex-Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) durchgeführt. Die bakterielle DNA wurde zuvor mittels Chelex®-Methode (Kapitel 3.2.5) extrahiert. Die verwendeten Primer sind der Tab. 10 zu entnehmen. Als Positivkontrollen wurden dem ILSH für die Versuche DNA-Proben der oben genannten Colizine und Mikrozine, isoliert aus *E. coli*, von Herrn Smarda und Herrn Šmajš (Abteilung für Biologie der Masaryk-Universität Brunn) zur Verfügung gestellt.

3.2.6.1 Multiplex-PCR

Als Erstes wurden die Isolate mithilfe der Multiplex-PCR (mPCR) I bis V auf das Vorhandensein bekannter Gene untersucht.

Mit der mPCR I konnten die Colizin-Gene A, E1, E2, Js und das Mikrozin-Gen C7 nachgewiesen werden (Tab. 18 und Tab. 19).

Tab. 18 mPCR I, Mastermix für 1x Probe

Komponente	Menge [μ l]
PCR-Puffer [10x]	2,5
MgCl ₂ [25 mM]	2,5
dNTPS [10 mM]	2,0
Taq-Polymerase [5 U/ μ l]	0,1
Primermix	5,6
H ₂ O	10,3
DNA	2,0
Σ	25,0

Tab. 19 mPCR I, Primermix

Primermix [100 pmol/ μ l]	Menge pro Primer [μ l]
F + R Col A	0,5
F + R Col E1	0,4
F + R Col E2	0,4
F + R Col Js	0,5
F + R Mic C7	1,0
Σ	5,6

Mit der mPCR II konnten die Colizin-Gene Y, E4 und E8 und die Mikrozin-Gene L und J25 nachgewiesen werden (Tab. 20 und Tab. 21).

Tab. 20 mPCR II, Mastermix für 1x Probe

Komponente	Menge [μ l]
PCR-Puffer [10x]	2,5
MgCl ₂ [25 mM]	2,5
dNTPS [10 mM]	2,0
Taq-Polymerase [5 U/ μ l]	0,1
Primermix	15,0
H ₂ O	0,0
DNA	2,9
Σ	25,0

Tab. 21 mPCR II, Primermix

Primermix [100 pmol/μl]	Menge pro Primer [μl]
F + R Col Y	0,5
F + R Col E4	0,5
F + R Mic J25	3,0
F + R Mic L	3,0
F + R Col E8	0,5
Σ	15,0

Mit der mPCR III konnten die Isolate auf das Vorhandensein von den Colizin-Genen E5, E6 und Ia sowie der Mikrozin-Gene B17 und V untersucht werden (Tab. 22 und Tab. 23).

Tab. 22 mPCR III, Mastermix für 1x Probe

Komponente	Menge [μl]
PCR-Puffer [10x]	2,5
MgCl ₂ [25 mM]	2,5
dNTPS [10 mM]	2,0
Taq-Polymerase [5 U/μl]	0,1
Primermix	14,0
H ₂ O	0,9
DNA	3,0
Σ	25,0

Tab. 23 mPCR III, Primermix

Primermix [100 pmol/μl]	Menge pro Primer [μl]
F + R Col E6	0,5
F + R Col B17	5,0
F + R Mic V	0,5
F + R Col E5	0,5
F + R Col Ia	0,5
Σ	14,0

Anhand der mPCR IV wurden die Isolate auf das Vorhandensein von den Colizin-Genen E3, E7, D, N und S4 untersucht (Tab. 24 und Tab. 25).

Tab. 24 mPCR IV, Mastermix für 1x Probe

Komponente	Menge [μ l]
PCR-Puffer [10x]	2,5
MgCl ₂ [25 mM]	2,5
dNTPS [10 mM]	2,0
Taq-Polymerase [5 U/ μ l]	0,1
Primermix	6,0
H ₂ O	8,9
DNA	3,0
Σ	25,0

Tab. 25 mPCR IV, Primermix

Primermix [100 pmol/ μ l]	Menge pro Primer [μ l]
F + R Col D	0,5
F + R Col E3	0,5
F + R Col N	0,5
F + R Col S4	0,5
F + R Col E7	1,0
Σ	6,0

Mittels mPCR V wurden die Isolate auf das Vorhandensein von den Colizin-Genen E9, M, 5, 10, B und Ib analysiert (Tab. 26 und Tab. 27).

Tab. 26 mPCR V, Mastermix für 1x Probe

Komponente	Menge [μ l]
PCR-Puffer [10x]	2,5
MgCl ₂ [25 mM]	2,5
dNTPS [10 mM]	2,0
Taq-Polymerase [5 U/ μ l]	0,1
Primermix	10,0
H ₂ O	4,9
DNA	3,0
Σ	25,0

Tab. 27 mPCR V, Primermix

Primermix [100 pmol/ μ l]	Menge pro Primer [μ l]
F + R Col E9	0,5
F + R Col M	1,0
F + R Col 5	1,0
F + R Col 10	0,5
F + R Col B	1,0
F + R Col Ib	1,0
Σ	10,0

3.2.6.2 Singleplex-PCR

Sofern die mPCR I bis V positiv für die 23 bekannten Colizin- bzw. sechs Mikrozin-Gene war, wurde anschließend eine Singleplex-PCR (sPCR) zur Bestätigung für das jeweilige Colizin- bzw. Mikrozin-Gen durchgeführt (Tab. 28). Mittels sPCR wurden alle lysierenden Isolate auf das Vorhandensein der Colizin-Gene K und U sowie des Mikrozin-Gens H47 untersucht (Tab. 28).

Tab. 28 sPCR, Mastermix für 1x Probe

Komponente	Menge [μ l]
PCR-Puffer [10x]	2,5
MgCl ₂ [25 mM]	2,5
dNTPS [10 mM]	0,5
Taq-Polymerase [5 U/ μ l]	0,1
Primermix [100 pmol/ μ l]	Σ 1,0
F + R	0,5 + 0,5
H ₂ O	16,4
DNA	2,0
Σ	25,0

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler nach dem Protokoll von Smajs et al. (2010). Es wurde für die mPCR I bis V sowie für die sPCR genutzt. Das Temperatur-Zeit-Profil nach Smajs et al. (2010) ist in Tab. 29 dargestellt.

Tab. 29 Temperatur-Zeit-Profil, mPCR und sPCR

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Anfangsdenaturierung	95	120
Amplifikation		
▪ Denaturierung	94	30
▪ Annealing	60	30
▪ Elongation	72	60
abschließende Elongation	72	420
Kühlung	12	

} 30 Zyklen

Die Auswertung der PCR-Amplifikate erfolgte mittels Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.6.3).

3.2.6.3 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Amplifikate erfolgte mittels Gelelektrophorese. Nach dem Aushärten des Agarose-Gels wurde dieses in die Gelelektrophorese-Kammer gestellt und die Taschen mit 10 μ l befüllt (8 μ l PCR-Produkt + 2 μ l Ladepuffer). Als Größenstandard wurde der Marker GeneRuler™ Low Range verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt. Das Bandenmuster wurde mithilfe des Alphamager® sichtbar gemacht. Die

Auswertung erfolgte anhand des Vergleichs der Fragmentlängen mit den Positivkontrollen sowie anhand des Höhenvergleichs der Fragmentlängen mit dem Größenstandard.

3.2.6.4 Bestätigung der PCR-Produkte durch Sequenzierung

Nach Detektion der Colizin-Gene E2 – E9, Ia, Ib, U, Y, 5 oder 10 erfolgte eine Bestätigung dieser mittels Sequenzierung, um eine Kreuzreaktivität der Primer auszuschließen. Es ist beispielsweise bekannt, dass die Primer des Colizin-Gens U auch an Colizin Y binden und dieses amplifizieren können, da diese beiden Gene eine ähnliche Sequenz aufweisen (Smajs et al. 2010).

Als Erstes wurde eine sPCR mit einem Endvolumen von 50 µl PCR-Produkt laut Protokoll in Tab. 30 durchgeführt.

Tab. 30 Mastermix für 1x Probe, sPCR (Sequenzierung)

Komponente	Menge [µl]
PCR-Puffer [10x]	5,0
MgCl ₂ [25 mM]	5,0
dNTPS [10 mM]	1,0
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,2
Primermix [100 pmol/µl]	Σ 2,0
F + R	1,0 + 1,0
H ₂ O	32,8
DNA	4,0
Σ	50,0

Das Temperatur-Zeit-Profil ist in Tab. 29 dargestellt. Die Bestätigung der PCR-Produkt-Amplifikation erfolgte mittels Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.6.3). Die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde mithilfe des GeneJET PCR Purification Kits durchgeführt und erfolgte gemäß Protokoll der Firma ThermoScientific. Die Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten PCR-Produktes erfolgte mittels NanoDrop. Als Vorbereitung für die Sequenzierung (Lightrun) wurden 5 µl Template-DNA (c = 20 – 80 ng/µl) mit 5 µl Forward- bzw. Reverse-Primer (c = 5 µM (5 pmol/µl)) versetzt. Die Proben wurden an die Firma GATC Eurofins-Genomics versandt und die Sequenzen mithilfe der Software BioNumerics 7.1 ausgewertet.

3.2.7 Phylogruppenbestimmung der *E. coli*-Isolate

Zur weiteren Charakterisierung der *E. coli*-Isolate wurde eine Phylogruppenbestimmung mithilfe der Phylo-PCR nach Clermont et al. (2013) durchgeführt. Zunächst wurden alle Isolate in einer Quadruplex-PCR (qxPCR) getestet. Das Protokoll für die Mastermix-Herstellung der qxPCR ist in Tab. 31 und Tab. 32 dargestellt.

Tab. 31 qxPCR, Mastermix für 1x Probe

Komponente	Menge [μ l]
PCR-Puffer [10x]	2,0
dNTPS [10 mM]	0,1
Taq-Polymerase [5 U/ μ l]	0,1
Primermix	2,0
H ₂ O	13,8
DNA	2,0
Σ	20,0

Tab. 32 qxPCR, Primermix

Primermix [100 pmol/ μ l]	Menge pro Primer [μ l]
fw <i>chuA</i>	0,2
rev <i>chuA</i>	0,2
fw <i>yjaA</i>	0,2
rev <i>yjaA</i>	0,2
fw TSPE4.C2	0,2
rev TSPE4.C2	0,2
AceK.f	0,4
ArpA1.r	0,4
Σ	2,0

Die Amplifikation der Proben erfolgte im Thermocycler. Das Temperatur-Zeit-Profil ist in Tab. 33 dargestellt.

Tab. 33 Temperatur-Zeit-Profil, qxPCR

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Anfangsdenaturierung	94	240	
Amplifikation			
▪ Denaturierung	94	5	} 30 Zyklen
▪ Annealing	59	20	
▪ Elongation	72	300	
Kühlung	12		

Die Auftrennung der PCR-Amplifikate erfolgte mittels Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.6.3). Die Auswertung des Agarose-Gels erfolgte durch den Vergleich der Amplifikat-Banden (Abb. 8) der zu analysierenden *E. coli*-Isolate mit den Positivkontrollen 55-6#4 (*arpA*, *chuA*, TspE4.C2) und 75-7#1 (*yjaA*).

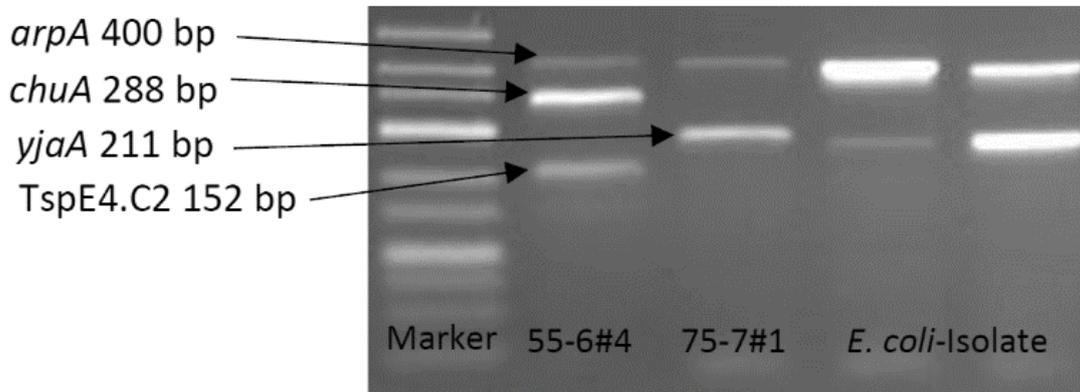


Abb. 8 qPCR Positivkontrollen: Abgebildet ist ein Agarose-Gel mit Marker (GeneRuler™ Low Range) und der Positivkontrolle 55-6#4 zur Detektion der Gene *arpA*, *chuA* und TspE4.C2 und der Positivkontrolle 75-7#1 zur Detektion des Gens *yjaA*, sowie Beispiele der analysierten *E. coli*-Isolate

Die Einordnung erfolgte anhand eines dichotomischen Entscheidungsbaums (Abb. 9) nach Clermont et al. (2013).

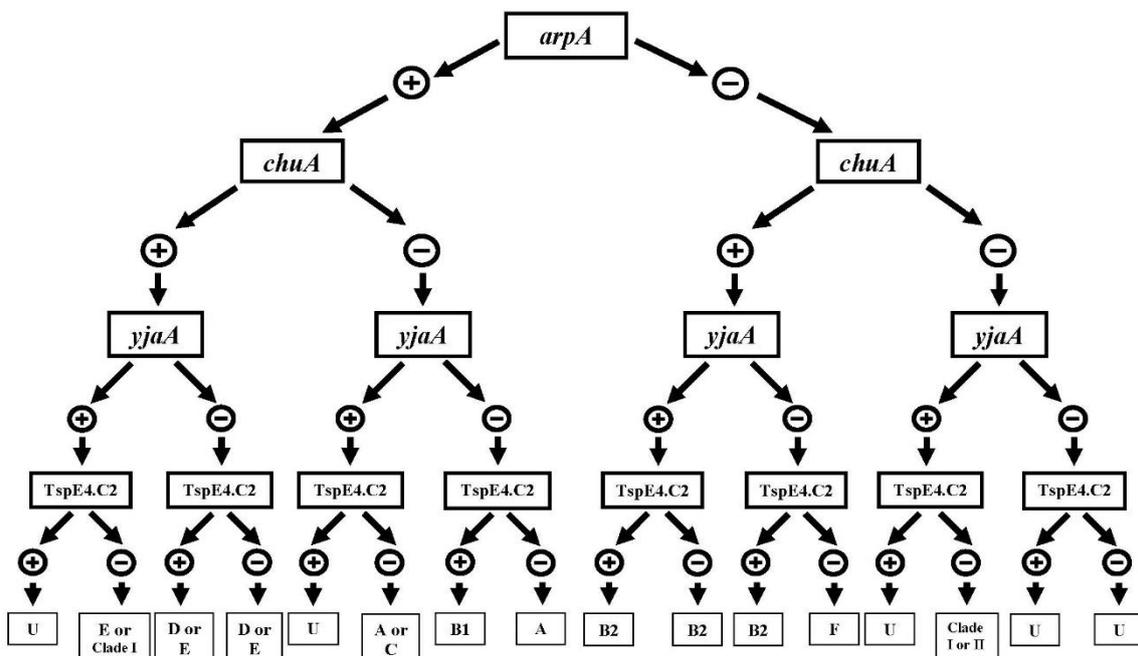


Abb. 9 Dichotomischer Entscheidungsbaum qPCR: Dargestellt sind die bekannten *E. coli* Phylogruppen A, B1, B2, C, D, E, F, Clade I – II und ihre zugehörigen Gene. U steht für bisher unbekannte Phylogruppen (Clermont et al. 2013).

Bereits bekannte Phylogruppen für *E. coli* sind A, B1, B2, C, D, E, F, Clade I – V. U steht für „unknown“ und daher für eine bisher unbekannte *E. coli* Phylogruppe. Bei einem nicht eindeutigen Ergebnis (Phylogruppe A oder C; D oder E; E oder Clade I) wurde zusätzlich eine Duplex-PCR (dPCR) durchgeführt. Bei dem Ergebnis Clade I oder II oder Unbekannt (U) erfolgte keine weitere Untersuchung.

dPCR C:

Die Duplex-PCR C diente der Unterscheidung zwischen den Phylogruppen A und C. Das Protokoll für die Mastermix-Herstellung der dPCR C ist in Tab. 34 dargestellt.

Tab. 34 Mastermix für 1x Probe, dPCR C

Komponente	Menge [µl]
PCR-Puffer [10x]	2,0
dNTPS [10 mM]	0,1
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,1
Primermix (F+R) [100 pmol/µl]	Σ 0,4
trpAgpC.f	0,2
trpAgpC.r	0,2
H ₂ O	15,4
DNA	2,0
Σ	20,0

Die Amplifikation der Proben erfolgte im Thermocycler. Das Temperatur-Zeit-Profil ist in Tab. 35 dargestellt.

Tab. 35 Temperatur-Zeit-Profil, dPCR C

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Anfangsdenaturierung	94	240	
Amplifikation			
▪ Denaturierung	94	5	} 30 Zyklen
▪ Annealing	59	20	
▪ Elongation	72	20	
abschließende Elongation	72	300	
Kühlung	12		

Die Auftrennung der PCR-Amplifikate erfolgte mittels Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.6.3).

Die Auswertung des Agarose-Gels erfolgte durch den Vergleich der Amplifikat-Banden (Abb. 10) der zu analysierenden *E. coli*-Isolate mit den Positivkontrollen 1127/2 für die Phylogruppe C (trpAgpC positiv, 219 bp) und 75-7#1 für die Phylogruppe A (trpAgpC negativ, mehrere Banden, keine Bande bei 219 bp).

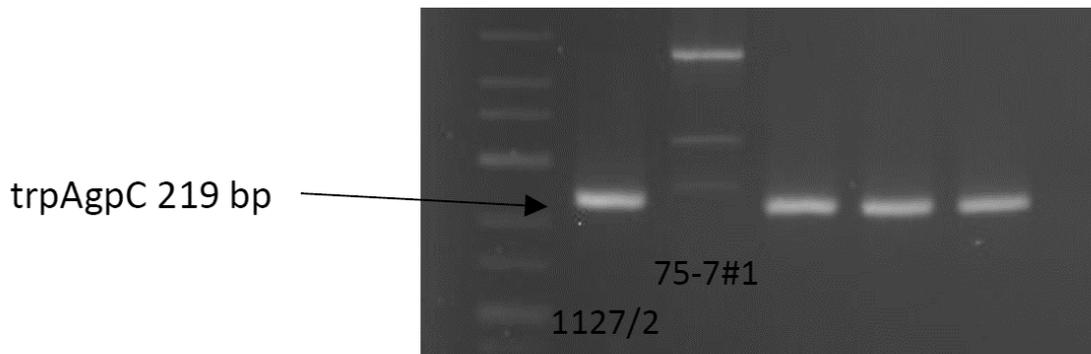


Abb. 10 dPCR C: Abgebildet ist ein Agarose-Gel mit Marker (GeneRuler™ Low Range), der Positivkontrolle 1127/2 für die Phylogruppe C (trpAgpC +, 219 bp) und der Positivkontrolle für die Phylogruppe A (trpAgpC -) sowie drei Beispiele der *E. coli*-Isolate für die Phylogruppe C.

dPCR E:

Die Duplex-PCR E diente der Unterscheidung zwischen den Phylogruppen D und E bzw. den Phylogruppen E und Clade I. Das Protokoll für die Mastermix-Herstellung der dPCR E ist in Tab. 36 dargestellt.

Tab. 36 Mastermix für 1x Probe, dPCR E

Komponente	Menge [µl]
PCR-Puffer [10x]	2,0
dNTPS [10 mM]	0,1
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,1
Primermix (F+R) [100 pmol/µl]	Σ 0,64
ArpAgpE.f	0,2
ArpAgpE.r	0,2
trpBA.f	0,12
trpBA.r	0,12
H ₂ O	15,16
DNA	2,0
Σ	20,0

Die Amplifikation der Proben erfolgte im Thermocycler. Das Temperatur-Zeit-Profil ist in Tab. 37 dargestellt.

Tab. 37 Temperatur-Zeit-Profil dPCR E

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Anfangsdenaturierung	94	240
Amplifikation		
▪ Denaturierung	94	5
▪ Annealing	59	20
▪ Elongation	72	20
abschließende Elongation	72	300
Kühlung	12	

} 30 Zyklen

Die Auftrennung der PCR-Amplifikate erfolgte mittels Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.6.3).

Die Auswertung des Agarose-Gels erfolgte durch den Vergleich der Amplifikat-Banden (Abb. 11) der zu analysierenden *E. coli*-Isolate mit den Positivkontrollen S-228-1 für die Phylogruppe E (trpBA und ArpAgpE positiv) und S-462-1 für die Phylogruppe D (trBA positiv). Zur Unterscheidung zwischen Clade I und E (Ergebnis qxPCR) wurden diese *E. coli*-Isolate ebenfalls mit der dPCR E auf das Vorhandensein der Phylogruppe E untersucht. Wurde diese nicht detektiert erhielten diese Isolate die Phylogruppe Clade I und wurden nicht weiter untersucht.

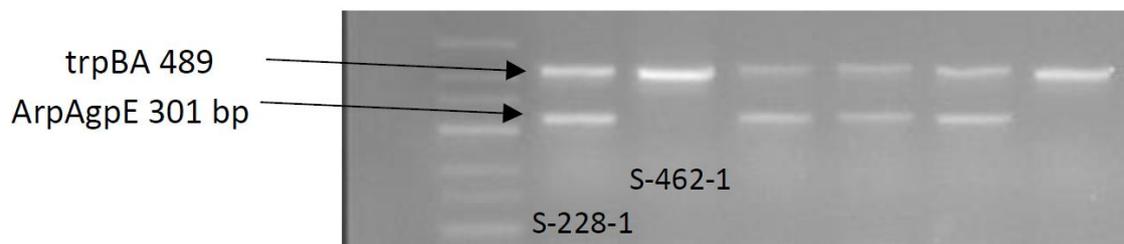


Abb. 11 dPCR C: Abgebildet ist ein Agarose-Gel mit Marker (GeneRuler™ Low Range), der Positivkontrolle S-228-1 für die Phylogruppe E (trpBA +, 489 bp und ArpAgpE +, 301 bp) und der Positivkontrolle für die Phylogruppe D (trpBA +) sowie drei Beispiele der *E. coli*-Isolate für die Phylogruppe D und ein Beispiel für die Phylogruppe E.

3.2.8 Bestimmung des Molekulargewichtes mittels SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt (Laemmli 1970). Von den Bakteriozin-produzierenden Isolaten wurden Bakteriozin-Extrakte hergestellt und deren lysierende Eigenschaft im Spot-Assay bestätigt (Kapitel 3.2.4). Mittels Nanodrop wurde von den Bakteriozin-Extrakten die Proteinmenge bestimmt (Soll-Konzentration 50 µg/µl). Die Herstellung von Sammel- und Trenngel erfolgte für einen 1mm Spacer nach einem festgelegtem Pipettierschema (Tab. 38).

Tab. 38 Pipettierschema SDS-PAGE, 1mm Spacer, 2 Gele

	Sammelgel	Trenngel (7,5 %)
H₂O	4,5 ml	5,5 ml
Trenngelpuffer	-	2,5 ml
Sammelgelpuffer	1,9 ml	-
Acrylamid 40 %	810 µl	1,8 ml
SDS 10 %	75 µl	100 µl
APS 10 %	57 µl	50 µl
TEMED	19 µl	20 µl

Die Bakteriozin-Extrakte wurden 1:1 mit zweifachem Laemmli-Puffer vermischt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die vorbereiteten Proben auf zwei SDS-Polyacrylamid-Gele (7,5 %, Trenngel) aufgebracht. Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels Elektrophorese in Trisbase-Puffer (45 min bei 70 V und 45 min bei 140 V). Anschließend erfolgte eine Waschung der Gele unter kontinuierlichem Schütteln in Aqua dest. für 20 min.

Gel-Nr. 1 wurde in Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt (24 h Einwirkzeit) und mithilfe einer Entfärber-Lösung wieder entfärbt (Ethanol- und ortho-Phosphorsäure-Gemisch). Gel-Nr. 2 wurde auf eine ausreichend große Agarplatte aufgebracht und mit 10 ml-LB-Softagar-Medium, welches mit 600 µl Übernachtskultur des Referenzstammes *E. coli* K-12 DH5α inokuliert wurde, überschichtet. Inkubiert wurde die Platte aerob für 24 h bei 37°C. Die Färbung des Gels diente der Sichtbarmachung der Proteinauftrennung. Die Überschichtung und Inkubation des Gels dienten der Ermittlung möglicher Lyse-Banden im Overlay. Zur Größenbestimmung der Banden wurde der Protein™ Dual Color Standard-Marker eingesetzt. Bei den Lyse-Eigenschaften der Bande wurde zwischen sehr starker Lyse (++), starker Lyse (+), schwacher Lyse ((+)) und keiner Lyse (-) unterschieden. War keine Lyse-Bande im Overlay zu erkennen, wurde die SDS-PAGE wiederholt. Dafür wurde das Bakteriozin-Extrakt erneut aus dem dazugehörigen *E. coli*-Isolat hergestellt.

3.2.9 Konzentratherstellung

Es wurden zwei verschiedene Konzentrate aus dem Überstand des *E. coli*-Isolates 2116 hergestellt.

Konzentrat 1: Der Überstand einer 20 l Übernachtkultur des *E. coli*-Isolates 2116, angesetzt in LB-Medium, wurde mittels Tangentialflussfiltration (TFF) bei einem Cut Off von 10 kDa filtriert und dabei auf ca. 600 ml aufkonzentriert.

Konzentrat 2: Der Überstand einer 20 l Übernachtkultur des *E. coli*-Isolates 2116, angesetzt in LB-Medium, wurde mittels TFF bei einem Cut Off von 100 kDa filtriert. Das Filtrat wurde mittels TFF bei einem weiteren Cut Off von 30 kDa filtriert und auf ca. 300 ml aufkonzentriert. Zur weiteren Aufreinigung des Konzentrats wurde eine Fällung mit 30 - 70 % Ammoniumsulfat (AMS), sowie eine Dialyse gegen PBS durchgeführt.

Konzentrat K-12 DH5 α : Der Überstand einer 20 l Übernachtkultur des *E. coli*-Referenzstammes K-12 DH5 α , angesetzt in LB-Medium, wurde mittels TFF bei einem Cut Off von 100 kDa filtriert. Das Filtrat wurde mittels TFF bei einem weiteren Cut Off von 30 kDa filtriert und auf ca. 300 ml aufkonzentriert. Zur weiteren Aufreinigung des Konzentrats wurde eine Fällung mit 30 - 70 % Ammoniumsulfat (AMS), sowie eine Dialyse gegen PBS durchgeführt.

Die Lagerung der Konzentrate erfolgte bei -20°C. Die Herstellung der Konzentrate im kleinen Maßstab erfolgte eigenhändig im Labor. Der Großansatz wurde von Dr. Felgenträger & Co. – Öko-chem. und Pharma GmbH durchgeführt.

3.2.10 Zellzahlreduktion im Medium mittels *E. coli* 2116-Konzentrat

Die Untersuchung zur Zellzahlreduktion des Referenzstammes *E. coli* K-12 DH5 α (im Folgenden K-12 DH5 α) erfolgte in LB-Medium. Die Ausgangskonzentration des Referenzstammes lag bei 10^6 - 10^7 KbE/ml. Als Konzentrat wurden sowohl Konzentrat 1 als auch Konzentrat 2 eingesetzt (Kapitel 3.2.9). Die Versuchsdurchführung erfolgte in Doppelbestimmung mit technischem Duplikat bei 4°C und 37°C.

Zunächst wurden das Konzentrat 2 (1:100 mit PBS) sowie die ÜNK von K-12 DH5 α (1:10 in 4 ml temperiertem LB-Medium) verdünnt. Im Anschluss wurden die Probe und die Negativkontrollen 1 und 2 laut Tab. 39 hergestellt.

Tab. 39 Probe und Negativkontrollen Zellzahlreduktion im Medium

Probe	1,5 ml Übernachtskultur von K-12 DH5 α + 1,5 ml Konzentrat 1 bzw. 2 (temperiert)
Negativkontrolle 1	1,5 ml LB-Medium (temperiert) + 1,5 ml Konzentrat 1 bzw. 2 (temperiert)
Negativkontrolle 2	1,5 ml Übernachtskultur von K-12 DH5 α + 1,5 ml K-12 DH5 α -Konzentrat (nach TFF, AMS und Dialyse, temperiert)

Von der Probe und den Negativkontrollen wurden 250 μ l entnommen und diese mit 1600 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert (0,45 μ m) und für die Bestimmung der Aktivität (activity units, AU) zurückgestellt. Das Pellet wurde in 250 μ l temperiertem LB-Medium resuspendiert. Die KbE-Bestimmung erfolgte mithilfe einer 1:10 Verdünnungsreihe in LB-Medium (900 μ l LB-Medium + 100 μ l Probe bzw. vorherige Verdünnungsstufe) und anschließendem Tropfplattenverfahren zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 5 min, 15 min, 60 min, 24 h, 48 h, 7 d). Es wurden 50 μ l je Verdünnungsstufe auf ein Feld (1/6 einer LB-Agar-Platte) getropft. Die Agar-Platten wurden für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Probe und die Negativkontrollen wurden zwischen den Zeitpunkten bei 4°C bzw. 37°C gelagert. Es erfolgte eine regelmäßige Kontrolle der Temperatur.

Die AU-Bestimmung erfolgte ebenfalls im Doppelansatz mit technischem Duplikat. Der zurückgestellte Überstand wurde im Spot-Assay wie folgt auf seine Bakteriozin-Aktivität getestet. LB-Softagar (0,5 %) wurde mit 200 μ l ÜNK des Referenzstammes K-12 DH5 α inokuliert. Der Überstand wurde in einer 1:2 Verdünnungsreihe (15 μ l Überstand bzw. Verdünnungsstufe + 15 μ l PBS) bis 1:1024 verdünnt. 5 μ l jeder Verdünnungsstufe wurden auf die mit LB-Softagar überschichtete LB-Agar Platte gespottet und anschließend für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte anhand folgender Formeln:

KbE:

$$\circ \frac{\sum c}{(n_1 * 1) + (n_2 * 0,1)} * d$$

- $\sum c$ = Summe aller Kolonien
- n_1 = Anzahl der Platten der niedrigen Verdünnungsstufe
- n_2 = Anzahl der Platten der höchsten Verdünnungsstufe
- d = Verdünnungsfaktor von n_1

AU:

$$\circ 2n * 1000 / 5$$

- n = höchste Verdünnungsstufe, wo eine unklare Lyse „+“ vorhanden ist
- 5 = gespottete Menge (μl)

3.2.11 Zellzahlreduktion im Lebensmittel mittels *E. coli* 2116-Konzentrat

Für den folgenden Versuch wurde Hackfleisch als Lebensmittelprobe ausgewählt, weil Hackfleisch oft durch den Verarbeitungsschritt der Zerkleinerung mit lebensmittelassoziierten Erregern wie beispielsweise *E. coli* belastet ist.

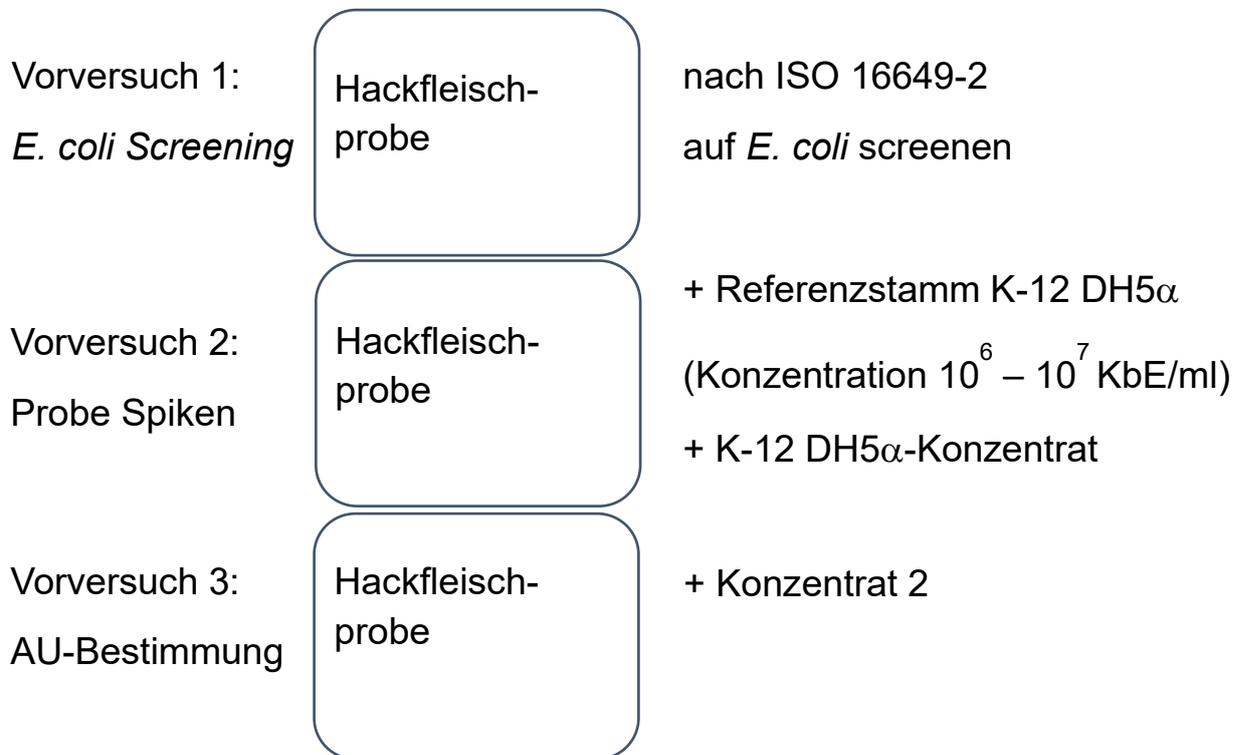


Abb. 12 Übersicht über Vorversuch 1-3 zur Zellzahlreduktion im Lebensmittel

Die ausgewählte Hackfleischprobe wurde zunächst auf das Vorhandensein von *E. coli* nach ISO 16649-2 untersucht, mit der Abweichung, dass die Verdünnung in LB-Medium und die serielle Verdünnung in PBS erfolgte (Abb. 12, Vorversuch 1). Es wurden 25 g aus einer 500 g Packung steril entnommen, 1:10 mit LB-Medium verdünnt und 2 min im Proben-Homogenisator gemischt. Nach dem Homogenisieren der Probe wurden 100 μ l bzw. 1 ml auf TBX- und LB-Agar im Doppelansatz gespatelt. Der Rest der Probe wurde portioniert und eingefroren.

In einem weiteren Vorversuch wurde das Hackfleisch mit dem Referenzstamm K-12 DH5 α inokuliert (Abb. 12, Vorversuch 2). Dafür wurde 1 ml ÜNK zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in LB-Medium resuspendiert. Die Konzentration des Referenzstammes wurde auf 10⁶ – 10⁷ KbE/ml eingestellt. 100 μ l der verdünnten ÜNK wurden zum Hackfleisch hinzugegeben und das Ganze für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1 ml K-12 DH5 α -Konzentrat hinzugegeben und der Probenbeutel vakuumiert. Die

Zellzahl wurde zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h bestimmt. Dafür wurde die Probe 1:10 mit LB-Medium verdünnt und für 2 min im Proben-Homogenisator gemischt. Von der Probe wurde 1 ml entnommen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml LB-Medium resuspendiert und eine serielle 1:10 Verdünnungsreihe in PBS hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe (10^1 - 10^6 KbE/ml) wurden 50 μ l auf TBX-Agar gegeben.

Im dritten Vorversuch wurde die Aktivität von Konzentrat 2 bestimmt (Abb. 12, Vorversuch 3). Dafür wurden 100 μ l von Konzentrat 2 zum Hackfleisch hinzugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Konzentrat 2 zu 10 g Hackfleisch hinzugegeben und der Probenbeutel vakuumiert. Die AU wurde zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h bestimmt. Für die AU-Bestimmung wurde die Probe 1:10 mit LB-Medium verdünnt, 2 min homogenisiert und 1 ml entnommen. Die Probe wurde zentrifugiert und der Überstand steril filtriert. Mit dem Überstand wurde eine serielle 1:2 Verdünnungsreihe in PBS hergestellt und 5 μ l jeder Verdünnungsstufe auf einen mit K-12 DH5 α -inokulierten LB-Softagar-Overlay auf einer LB-Agar-Platte gespottet.

Für den Hauptversuch lag die Ausgangskonzentration bei 10^6 – 10^7 KbE/ml. Als Konzentrat wurde das *E. coli* 2116-Konzentrat 2 (Kapitel 3.2.9) mit der Chargen-Nr. 460318 unverdünnt eingesetzt. Der Versuch fand in Doppelbestimmung mit technischem Duplikat bei 4°C statt.

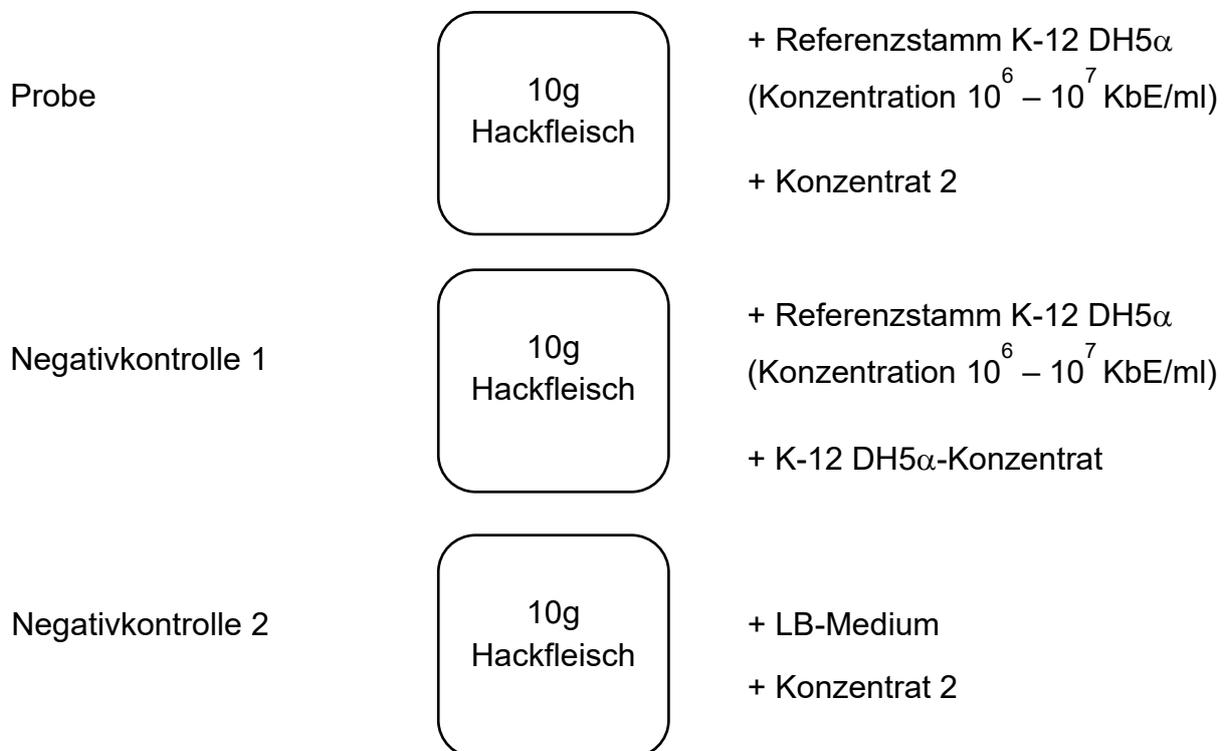


Abb. 13 Hauptversuch-Aufbau Zellzahlreduktion im Lebensmittel: Probe, Negativkontrolle 1 und 2

Für den Hauptversuch wurden 10 g ($\pm 0,5$ g) Hackfleisch in einen Probenbeutel eingewogen. 2 ml K-12 DH5 α -Übernachtskultur wurden für 10 min mit 1600 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in LB-Medium resuspendiert. Die Ausgangskonzentration wurde durch Zellzahlbestimmung ermittelt. 100 μ l der verdünnten ÜNK (Probe bzw. Negativkontrolle 1) und 100 μ l LB-Medium (Negativkontrolle 2) wurden für 30 min bei RT inkubiert (Abb. 13, Tab. 40).

Tab. 40 Probe und Negativkontrollen Zellzahlreduktion im Lebensmittel

Probe	100 μ l K-12-DH5 α Übernachtskultur ($10^6 - 10^7$ KbE/ml) + 1 ml (Durchgang 1) bzw. 100 μ l (Durchgang 2) Konzentrat 2
Negativkontrolle 1	100 μ l K-12 DH5 α Übernachtskultur ($10^6 - 10^7$ KbE/ml) + 1 ml K-12 DH5 α -Konzentrat (nach TFF, AMS und Dialyse)
Negativkontrolle 2	100 μ l LB-Medium + 1 ml Konzentrat 2

Zu den bei RT inkubierten Proben wurde 1 ml Konzentrat 2 bzw. K-12 DH5 α -Konzentrat hinzugegeben, der Probenbeutel vakuumiert und bei 4°C gelagert. Zu definierten Zeitpunkten (0 h, 1 h, 4 h, 24 h und 48 h) wurde Hackfleisch steril entnommen, eingewogen und mit LB-Medium 1:10 verdünnt und für 2 min homogenisiert. Davon wurde 1 ml Probe entnommen und für 5 min mit 1600 g zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert und für die AU-Bestimmung zurückgestellt. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 3.2.10 beschrieben.

Das Pellet wurde in 1 ml temperierten LB-Medium resuspendiert und für die Zellzahlbestimmung verwendet. Die Zellzahlbestimmung erfolgte im Doppelansatz mit technischem Duplikat auf LB-Agar-Platten im Tropfplattenverfahren. Die 1:10 Verdünnungsreihe wurde mit LB-Medium hergestellt. Dabei wurden 100 μ l der Probe bzw. vorherigen Verdünnungsstufe mit 900 μ l Medium verdünnt und je Verdünnungsstufe wurden 50 μ l auf eine geviertelte LB-Agar-Platte gegeben. Die Agar-Platten wurden für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte anhand der Formeln in Kapitel 3.2.10.

4. Ergebnisse

4.1 Genus- und Speziesbestimmung der Bakterienisolate mittels MALDI-TOF

Es wurden insgesamt 83 *Enterobacteriaceae*-Isolate aus verschiedenen Lebensmitteln (Fleisch, Gemüse, Käse, Fisch, Fertiggerichte und Backwaren) isoliert. Mittels MALDI-TOF MS-Analyse konnten 96,4 % (80/83) der Isolate als *E. coli* identifiziert werden. Lediglich drei der Isolate wurden den Spezies *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* und *Enterobacter asburiae* zugeordnet. Vergleicht man die Prävalenzen der einzelnen Lebensmittelmatrices, ist die *E. coli*-Prävalenz mit 51,3 % (41/80) bei der Matrix Fleisch am höchsten (Abb. 14).

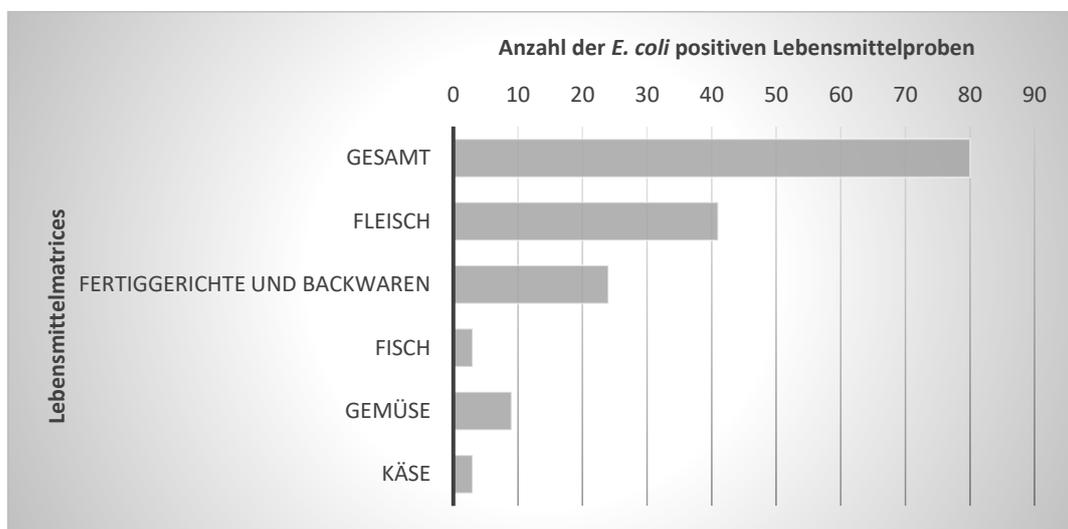


Abb. 14 *E. coli*-Prävalenz der untersuchten Lebensmittelmatrices (n = 83) mittels MALDI-TOF: Fleisch (n = 41), Fertiggerichte und Backwaren (n = 30), Fisch (n = 3), Gemüse (n = 9), Käse (n = 3).

4.2 Detektion der Bakteriozinbildung im Spot-Assay

Die 80 identifizierten *E. coli*-Isolate wurden daraufhin auf ihre Lyse-Eigenschaften gegenüber sechs Referenzstämmen (Kapitel 3.1.3) untersucht. Dafür wurden die Übernachtskulturen der *E. coli*-Isolate in einem Spot-Assay auf ihre Lyse-Eigenschaft getestet. Mehr als die Hälfte der *E. coli*-Isolate wiesen eine Lyse von mindestens einem Referenzstamm auf (Abb. 15). Etwa zwei Drittel dieser *E. coli*-Isolate stammten aus Fleischprodukten, insbesondere aus Schweine- und Rinderhackfleisch (30,0 %, 8/25). Des Weiteren zeigten 28,5 % (12/42) der *E. coli*-Isolate aus Fertiggerichten und Backwaren eine bakterizide Wirkung. Bei den Fisch- und Gemüse-Isolaten lag der lysierende Anteil bei je 4,8 % (2/42). Bei den Käse-Isolaten zeigte nur ein Isolat lysierende Eigenschaften gegenüber mindestens einem Referenzstamm im Spot-Assay (Abb. 15).

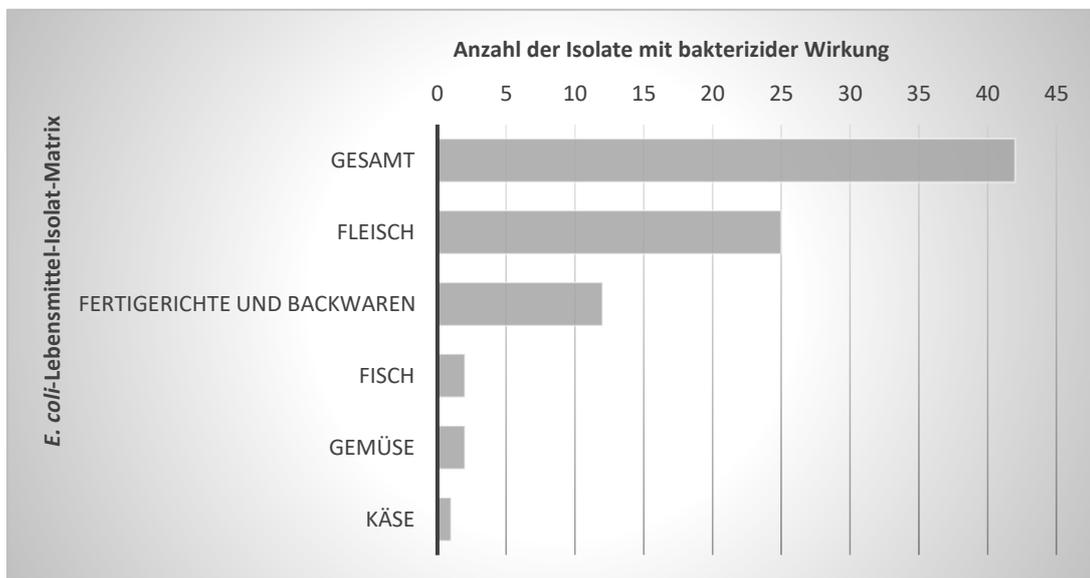


Abb. 15 Bakterizide Wirkung der Übernachtskulturen der *E. coli*-Lebensmittel-Isolate (n = 80) im Spot-Assay: Die *E. coli*-Isolate, isoliert aus verschiedenen Lebensmittel-Matrices, wurden im Duplikat auf ihre Lyse-Eigenschaften getestet. Fleisch (n = 41), Fertiggerichte und Backwaren (n = 24), Fisch (n = 3), Gemüse (n = 9), Käse (n = 3).

Nach Extraktion der Übernachtskulturen und Einsatz der Extrakte im Spot-Assay, wiesen insgesamt 41,3 % (33/80) der *E. coli*-Lebensmittel-Isolate eine bakterizide Wirkung gegenüber mindestens einem Referenzstamm auf (Abb. 16). Die *E. coli*-Isolate stammten dabei größtenteils aus Fleisch (60,1 %, 20/33), Fertiggerichten und Backwaren (24,2 %, 8/33), Fisch (6,1 %, 2/33), Gemüse (6,1 %, 2/33), sowie aus Käse (3,0 %, 1/33).

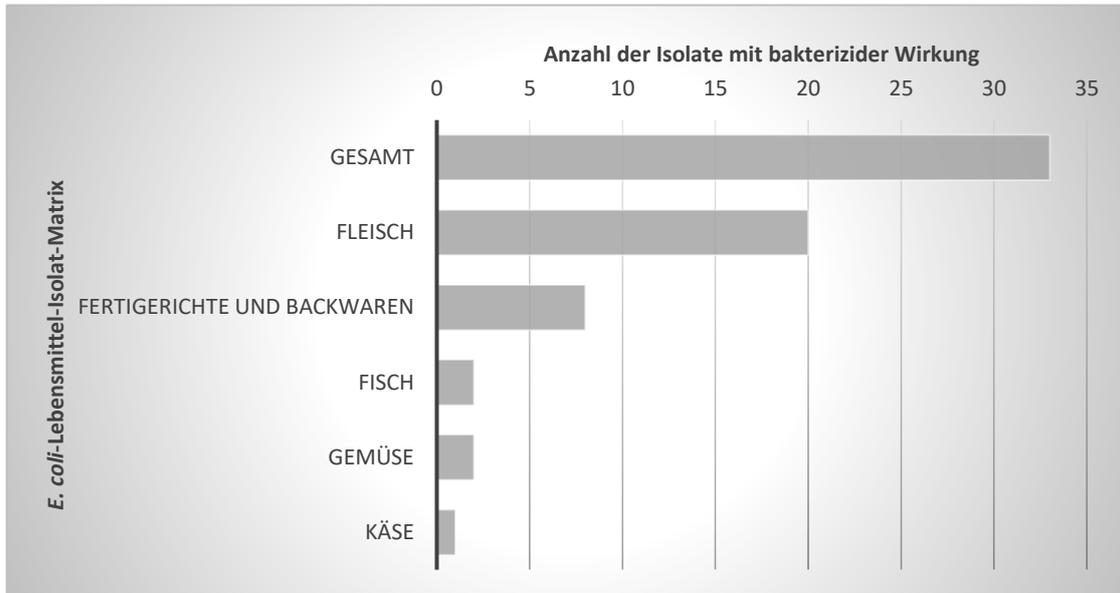


Abb. 16 Bakterizide Wirkung der Extrakte der *E. coli*-Lebensmittel-Isolate (n = 80) im Spot-Assay: Die Extrakte der *E. coli*-Isolate, isoliert aus verschiedenen Lebensmittel-Matrices, wurden im Duplikat auf ihre Lyse-Eigenschaften getestet. Fleisch (n = 41), Fertiggerichte und Backwaren (n = 24), Fisch (n = 3), Gemüse (n = 9), Käse (n = 3).

4.3 Lyse-Spektrum und Sensitivität der Referenzstämmen

In Abb. 17 und Abb. 18 sind die Lyse-Spektren der Übernachtkulturen sowie der Extrakte der untersuchten *E. coli*-Isolate dargestellt.

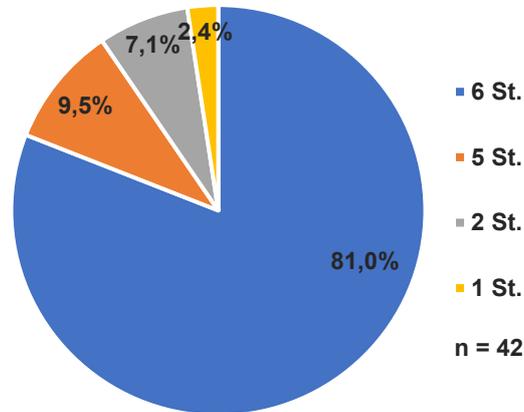


Abb. 17 Anzahl der Referenzstämmen, welche durch Übernachtkulturen der *E. coli*-Isolate (n = 42) lysiert worden sind; Referenzstämme (St.)

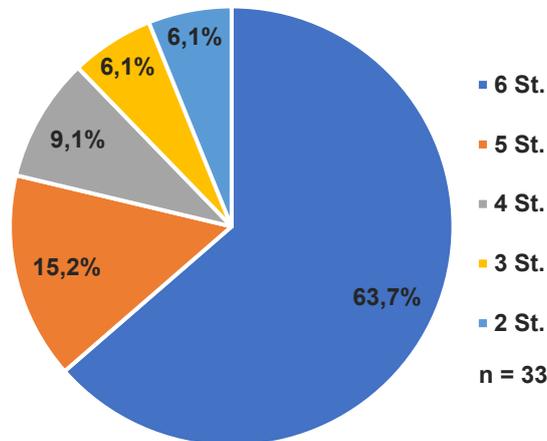


Abb. 18 Anzahl der Referenzstämmen, welche durch Extrakte der *E. coli*-Isolate (n = 33) lysiert worden sind; Referenzstämme (St.)

Als Referenzstämmen wurden die *E. coli*-Stämmen K-12 DH5 α , K-12 P400, K-12 5K, K-12 ϕ , K-12 row, sowie *Shigella sonnei* 17 eingesetzt.

Insgesamt wiesen die *E. coli*-Übernachtkulturen ein höheres Lyse-Spektrum als die *E. coli*-Extrakte auf. Während 81,0 % (34/42) der *E. coli*-Übernachtkulturen alle sechs Referenzstämmen lysieren konnten, waren es bei den *E. coli*-Extrakten nur 63,7 % (21/33).

Beim Einsatz der *E. coli*-Übernachtskulturen erwies sich der Referenzstamm *E. coli* K-12 DH5 α am sensitivsten, da dieser von allen Isolaten lysiert werden konnte. Die geringste Sensitivität wies der Referenzstamm *Shigella sonnei* 17 auf, der von 81,0 % (35/42) der Isolate in seinem Wachstum gehemmt wurde (Abb. 19).

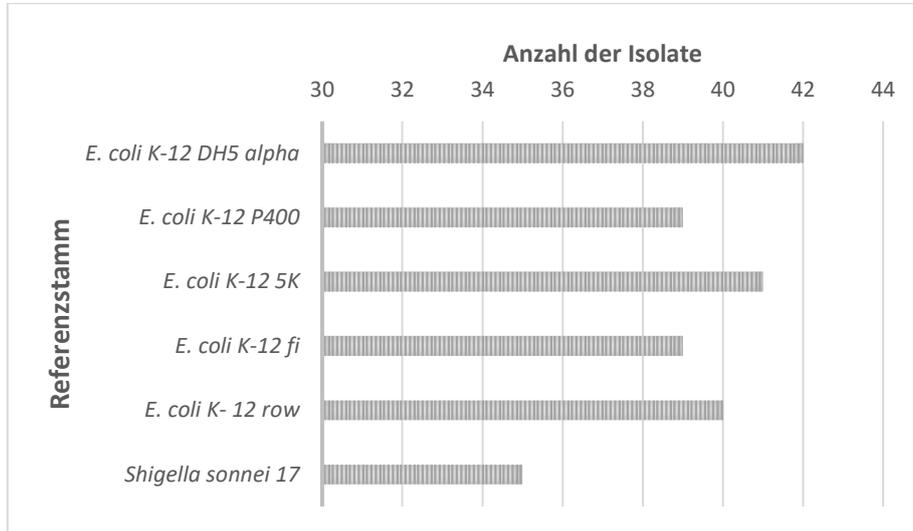


Abb. 19 Sensitivität der einzelnen *E. coli*-Referenzstämme K-12 DH5 α , K-12 P400, K-12 5K, K-12 ϕ , K-12 row, sowie *Shigella sonnei* 17 gegenüber den aufgetragenen *E. coli*-Übernachtskulturen (n = 42)

Beim Einsatz der Extrakte konnte der Referenzstamm *E. coli* K-12 row von 97,0 % (32/33) der Isolate lysiert werden und wies damit die höchste Sensitivität auf. Der Referenzstamm *Shigella sonnei* 17 erwies sich, wie auch beim Einsatz der *E. coli*-Übernachtskulturen, als weniger sensitiv und konnte nur von 66,7 % (22/33) der Isolate gehemmt werden (Abb. 20).

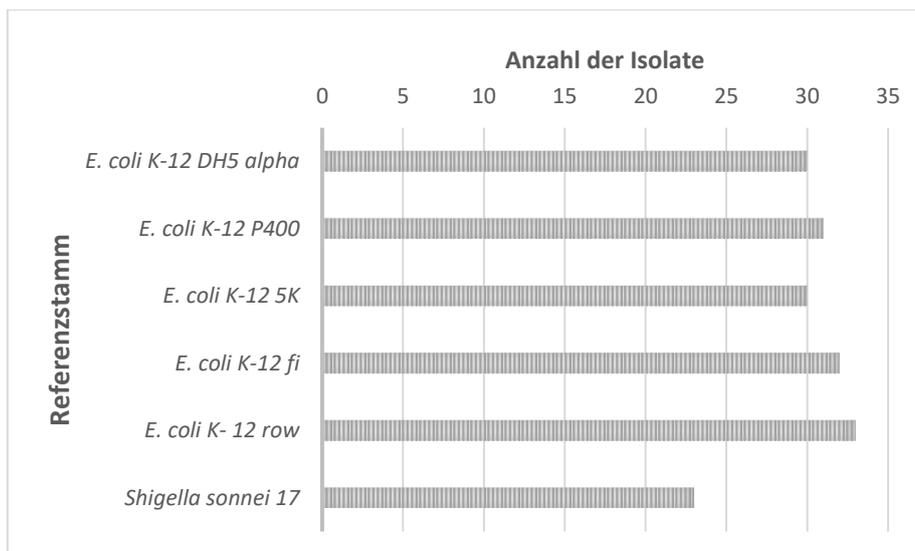


Abb. 20 Sensitivität der einzelnen *E. coli*-Referenzstämme K-12 DH5 α , K-12 P400, K-12 5K, K-12 ϕ , K-12 row, sowie *Shigella sonnei* 17 gegenüber den aufgetragenen Extrakten (n = 33)

4.4 Nachweis bekannter Colizin- und Mikrozin-Gene

Im Spot-Assay zeigten 52,5 % (42/80) der *E. coli*-Übernachtskulturen eine lysierende Wirkung gegenüber mindestens einem Referenzstamm. Diese 42 Isolate wurden daher weiter auf das Vorhandensein von den Colizin-Genen A, B, D, E1-E9, Ia, Ib, Js, K, M, N, S4, U, Y, 5, 10 und den Mikrozin-Genen B17, C7, H47, J25, L, V getestet (Abb. 21). Der Nachweis dieser bekannten Colizin- und Mikrozin-Gene erfolgte durch den Einsatz der PCR nach Smajs et al., (2010) (Smajs et al. 2010).

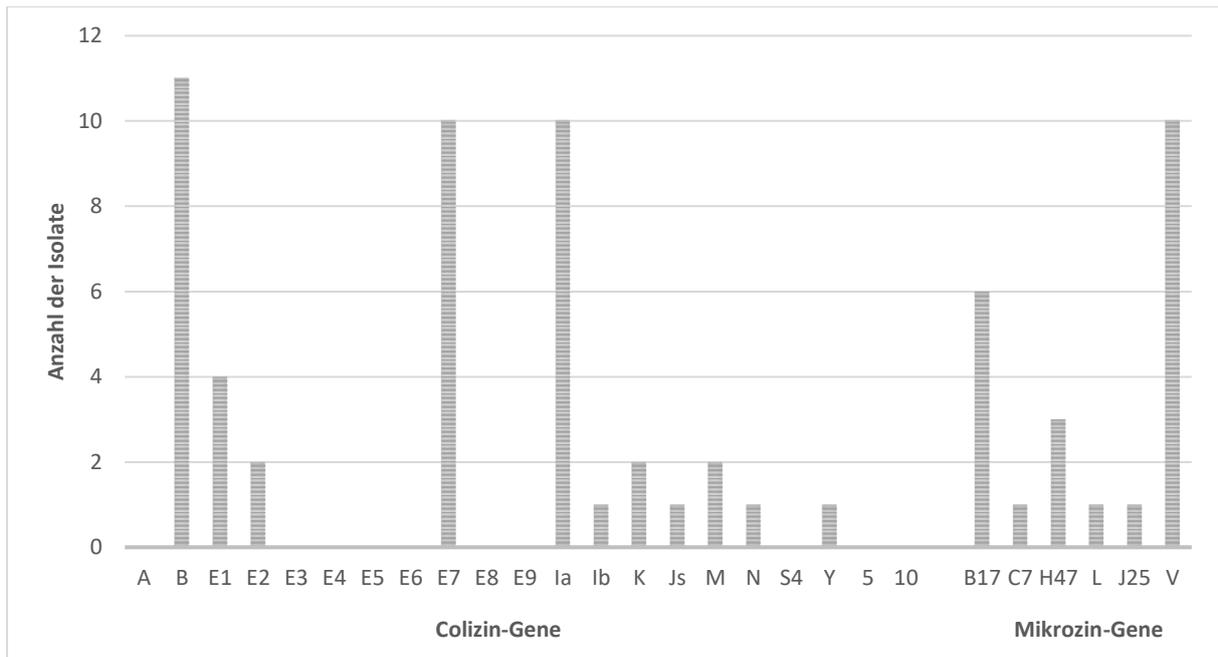


Abb. 21 Nachweis der Bakteriozin-Gene in den lysierenden *E. coli*-Isolaten. Dargestellt ist die Anzahl der Isolate, bei denen der Nachweis von Colizin- und/oder Mikrozin-Genen erfolgte (n = 42).

Die am häufigsten identifizierten Colizine in den untersuchten *E. coli*-Isolaten waren die Colizin-Gene B, E7 und Ia. Während das Colizin-Gen B in 26,2 % (11/42) der Isolate nachgewiesen werden konnte, wurden die Colizin-Gene E7 und Ia jeweils in 23,8 % (10/42) der Isolate ermittelt. Die Colizin-Gene A, E3-E6, E8, E9, S4, 5 und 10 konnten in keinem Isolat nachgewiesen werden. Innerhalb der Gruppe der Mikrozine wurde das Mikrozin V mit 23,8 % (10/42) am häufigsten identifiziert, gefolgt von Mikrozin B17, das in 14,3 % (6/42) der Isolate nachgewiesen werden konnte (Abb. 21).

Während bei 19,1 % (8/42) der Isolate trotz lysierender Eigenschaften keine der oben genannten Colizin- bzw. Mikrozin-Gene nachgewiesen werden konnten, zeigten 38,1 % (16/42) der Isolate das Vorhandensein von jeweils einem Gen. Bei 4,8 % (2/42) der Isolate konnten jeweils vier verschiedene Gene identifiziert werden (Abb. 22).

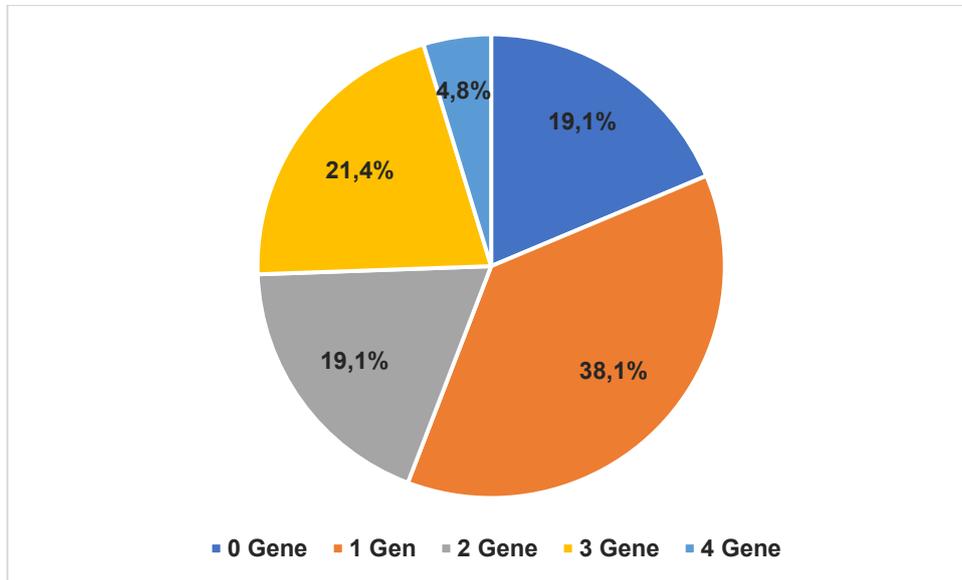


Abb. 22 Anzahl der Bakteriozin-Gene pro Isolat. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Bakteriozin-Gene pro Isolat an den Gesamtisolaten (n=42).

4.5 Phylogruppenbestimmung der *E. coli*-Isolate

Die Phylogruppenbestimmung mittels PCR nach Clermont et al. (2013) erfolgte zur Differenzierung der 80 *E. coli*-Isolate aus Lebensmitteln (Clermont et al. 2013). Am häufigsten vertreten sind die Phylogruppen A und B1 mit 37,5 % (30/80) bzw. 36,3 % (29/30). Zwei *E. coli*-Isolate konnten keiner Phylogruppe zugeordnet werden („Unbekannt“). Des Weiteren gibt es keine Vertreter der Phylogruppe F bei den untersuchten *E. coli*-Isolaten. Die Verteilung auf die einzelnen Phylogruppen ist in Tab. 41 und Abb. 23 dargestellt.

In Tab. 41 sind alle 80 untersuchten *E. coli*-Isolate und ihre lytischen Eigenschaften in Abhängigkeit von ihrer Phylogruppenverteilung dargestellt. Bei den lysierenden Isolaten sind außerdem die ermittelten Bakteriozin-Gene aufgeführt. Dabei ist zu sehen, dass *E. coli*-Isolate mit lytischer Aktivität am häufigsten der Phylogruppe B1 zugehörig sind. Demgegenüber sind die meisten nicht lysierenden *E. coli*-Isolate der Phylogruppe A zuzuordnen (Tab. 41)

Ergebnisse

Tab. 41 Übersicht über die für Bakteriozine kodierenden Isolate und deren Lyse-Eigenschaften in Abhängigkeit zur Phylogruppenverteilung

Phylogruppe	Anzahl Isolate		Untersuchte Bakteriozin-Gene																	
	Nicht lytisch	lytisch	B	E1	E2	E7	Ia	Ib	K	Js	M	N	Y	Mc B17	Mc C7	Mc H47	Mc L	Mc J25	Mc V	Keine Gene
A	21	9	3	2	-	4	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	3	1
B1	11	18	4	1	2	5	4	-	2	-	1	1	-	4	-	1	-	1	2	3
B2	-	8	4	1	-	-	2	-	-	1	-	-	-	-	1	2	1	-	2	2
C	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-
D	-	4	-	-	-	1	2	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	2	-
E	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Unbekannt	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Clade I	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gesamtanzahl	38	42	11	4	2	10	10	1	2	1	2	1	1	6	1	3	1	1	10	8

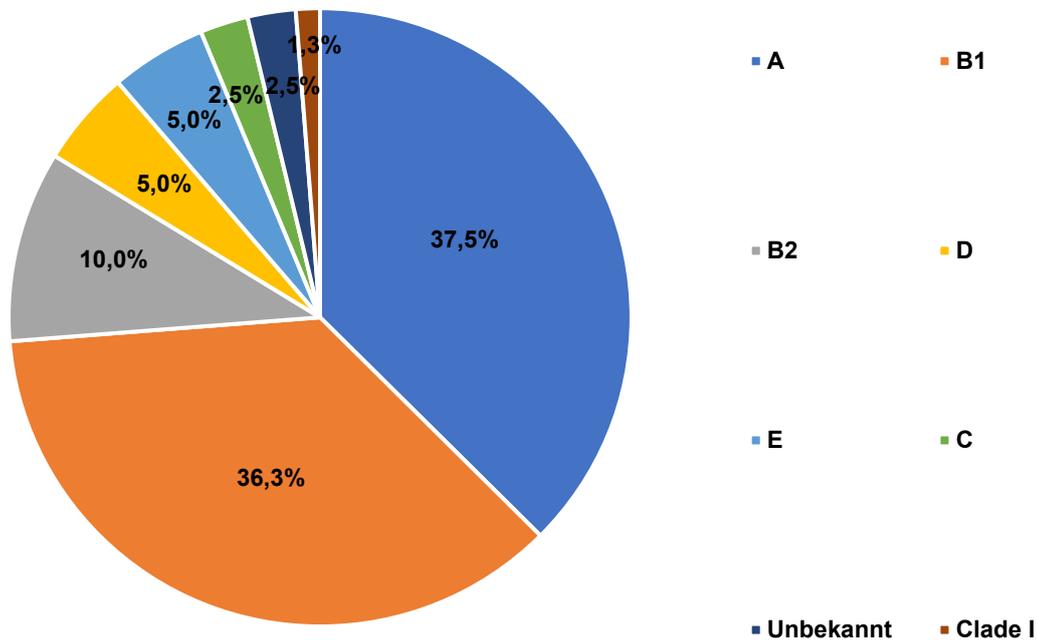


Abb. 23 Phylogruppenverteilung der mittels PCR nach Clermont et al. (2013) untersuchten *E. coli*-Isolate. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der einzelnen Gruppen an den Gesamtisolaten (n=80); Phylogruppen A, B1, B2, D, E, C; Unbekannte Phylogruppe; Clade I („*Escherichia cryptic clade*“)

Insgesamt wurden 42 *E. coli*-Isolate, welche mindestens einen Referenzstamm lysiert haben, auf das Vorhandensein von Genen untersucht. Davon wurden bei 42,9 % (18/42) der Isolate Colizin-Gene, bei 9,5 % (4/42) Mikrozin-Gene und bei 28,6 % (12/42) der Isolate sowohl Colizin- als auch Mikrozin-Gene nachgewiesen. 19,0 % (8/42) der Isolate kodierten für keine der untersuchten Bakteriozin-Gene. Alle Isolate, welche ausschließlich für Mikrozine kodieren gehören der Phylogruppe B1 an (Tab. 42).

Tab. 42 Bakteriozide *E. coli*-Isolate mit Nachweis von Bakteriozin-Genen und deren Phylogruppenverteilung

Gene	Gesamt- anzahl	Phylogruppe								
		A	B1	B2	C	D	E	F	Unbekannt	Clade I
Colizine	18	6	8	2	-	2	-	-	-	-
Mikrozine	4	-	4	-	-	-	-	-	-	-
Colizine und Mikrozine	12	2	3	4	1	2	-	-	-	-
Keine Gene	8	1	3	2	-	-	1	-	1	-
Gesamtanzahl	42	9	18	8	1	4	1	-	1	-

4.6 Bestimmung des Molekulargewichtes der *E. coli*-Extrakte

Mithilfe der SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli 1970) wurde das Molekulargewicht von 33 ausgewählten *E. coli*-Extrakten bestimmt, welche alle sechs Referenzstämme lysierten und damit ein breites Lyse-Spektrum aufwiesen. Bei 27,3 % (9/33) der *E. coli*-Extrakte konnten die Proteine aufgetrennt und ein Molekulargewicht zwischen 50 – 75 kDa nachgewiesen werden. Außerdem zeigten diese Extrakte im SDS-PAGE-Gel eine Lysebande zwischen 50 – 75 kDa auf einem mit dem Referenzstamm inkuliertem Overlay, welcher auf das SDS-PAGE Gel aufgetragen wurde (Abb. 24).

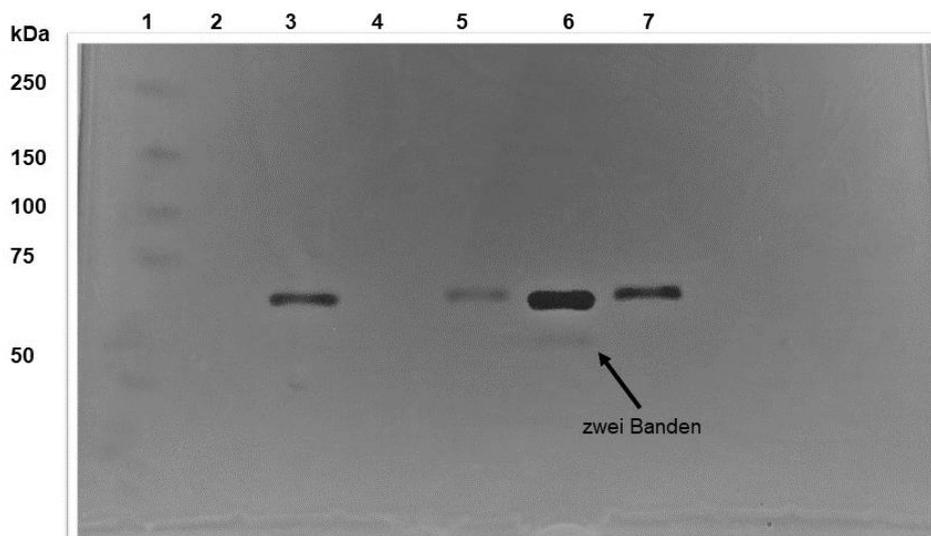


Abb. 24 Auswertungsbeispiel SDS-PAGE: Marker Protein™ Dual Color Standards in kDa (1), Negativkontrolle (2) *E. coli*-Extrakte (3-7), SDS-PAGE Gel mit Referenzstamm-Overlay (*E. Coli* K-12 DH5 α)

In Tab. 43 ist eine zusammenfassende Übersicht der Isolate, welche eine Lysebande in der SDS-PAGE zeigten in Bezug auf ihr Lyse-Spektrum, das Vorhandensein von Bakteriozinen und ihr Molekulargewicht dargestellt. Bei *E. coli*-Extrakt 860/1e (Tab. 43) konnten durch die SDS-PAGE zwei Banden identifiziert werden (Abb. 24; 6). Alle anderen Extrakte wiesen nur eine Bande auf.

Tab. 43: Zusammenfassung der Ergebnisse von neun Isolaten, welche eine Lysebande in der SDS-PAGE zeigten

Isolat-Nr.	Lyse-Spektrum		Bakteriozin-Gene	SDS-PAGE	
				Lyse-Aktivität	Molekulargewicht in kDa
	Übernachtskultur	Bakteriozin-Extrakt			
2116	6	6	E2, K, B17	++	64
860/1e	6	6	E2, K, B17	++/+ (DB*)	65, 55
30/1c	6	6	E7	++	65
280/24	6	6	B, E7	+	68
1181	6	6	E7	+	64
860/2e	6	6	B17	+	63
41/11	6	6	B, E7	(+)	70
1263/6	6	6	E7	(+)	65
1304/2	6	6	E7	(+)	70

++ sehr starke Lyse; + starke Lyse; (+) schwache Lyse; - keine Lyse; *DB = Doppelbande

4.7 Zellzahlreduktion von *E. coli* K-12 DH5 α durch den Einsatz von *E. coli* 2116 Konzentrat

Für die Versuche zur Zellzahlreduktion wurden zwei Szenarien gewählt. Die Versuche wurden zum einen in Medium und zum anderen im Lebensmittel durchgeführt. Der Versuch im Medium diente dem Nachweis, ob das Hinzufügen des Konzentrates 2116 zu einer Reduktion vom Referenzstamm *E. coli* K-12 DH5 α führt. Beim Versuch im Lebensmittel wurde Hackfleisch als relevante Matrix genutzt. Der Versuchsaufbau sollte dabei die realen Bedingungen bei der Fleischverarbeitung und die damit mögliche Beeinflussung der Aktivität des Konzentrates durch einzelne Fleischbestandteile simulieren. Der Versuch im Medium wurde sowohl bei Kühlschranktemperatur (4°C), als auch bei der idealen Wachstums-temperatur für *E. coli* (37°C) durchgeführt. Der Lebensmittelversuch wurde ausschließlich bei Kühlschranktemperatur (4°C) durchgeführt.

Aufgrund der vorherigen Versuche wurde das *E. coli*-Isolat 2116 für die Durchführung der Zellzahlreduktionsversuche ausgewählt. Dieses Isolat zeigte sowohl als Übernachtskultur als auch als Extrakt eine sehr klare Lyse der sechs Referenzstämme. Außerdem konnten Gene für die Colizine E2 und K sowie das Mikrozin B17 nachgewiesen und das Isolat der Phylogruppe B1 zugeordnet werden. Darüber hinaus zeigte das Extrakt eine Lyse bei der SDS-PAGE im Overlay und hat ein Molekulargewicht von 64 kDa. Das *E. coli*-Isolat 2116 wurde durch weitere Schritte aufgereinigt und aufkonzentriert (Kapitel 3.2.9). Alle folgenden Versuche wurden mit dem *E. coli* 2116 Colizin-Konzentrat 1 bzw. 2 (im Folgenden als Konzentrat 1 und 2 benannt) durchgeführt. Im Gegensatz zu Konzentrat 1 wurde das

Konzentrat 2 bei der Herstellung höher aufgereinigt (Kapitel 3.2.9). Konzentrat 1 und 2 zeigten eine sehr klare Lyse auf Referenzstamm *E. coli* K-12 DH5 α im Spot-Assay (Abb. 25).

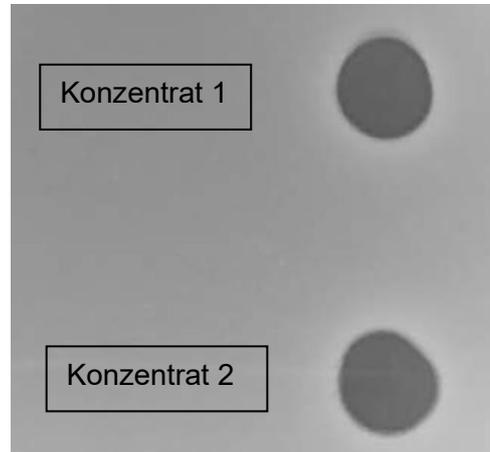


Abb. 25 Lyse-Eigenschaften von Konzentrat 1 und Konzentrat 2 auf dem Referenzstamm *E. coli* K-12 DH5 α im Spot-Assay

Als Referenzstamm für die Zellzahlreduktionsversuche wurde *E. coli* K-12 DH5 α (im Folgenden abgekürzt als K-12 DH5 α) eingesetzt. Alle Versuche wurden in Doppelbestimmung (technisches Duplikat) durchgeführt. Die Ansätze wurden bei unterschiedlichen Temperaturen (4°C bzw. 37°C) gelagert und zu definierten Zeitpunkten (0 min, 5 min, 15 min, 60 min, 24 h, 48 h, 72 h und 7 d) die Zellzahl bestimmt.

4.7.1 Zellzahlreduktion von *E. coli* K-12 DH5 α in LB-Medium bei 37°C

Bei diesem Ansatz wurde Konzentrat 1 unverdünnt mit dem Referenzstamm K-12 DH5 α im Verhältnis 1:1 vermischt. Der Ansatz wurde über die gesamte Versuchsdauer bei einer Temperatur von 37°C gelagert. Die Ausgangskonzentration von K-12 DH5 α lag bei 10⁷ KbE/ml.

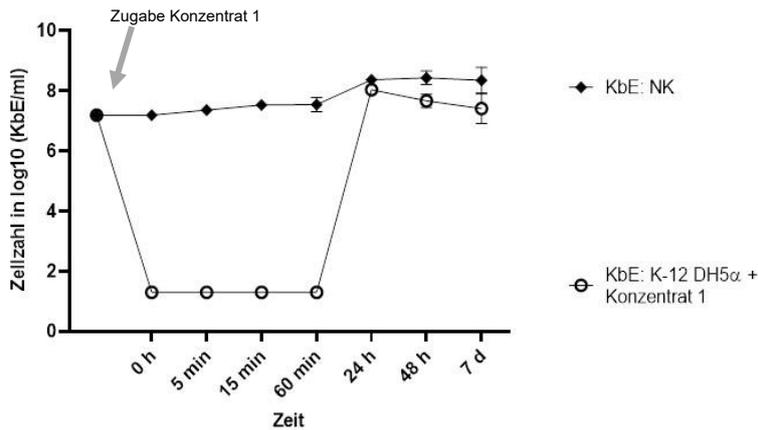


Abb. 26 Zellzahlreduktion bei 37°C, unverdünntes Konzentrat 1. Dargestellt sind die Zellzahlen in KbE/ml von K-12 DH5α mit und ohne Zusatz von Konzentrat 1 zu definierten Zeitpunkten. NK = Negativkontrolle (K-12 DH5α + LB-Medium). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).

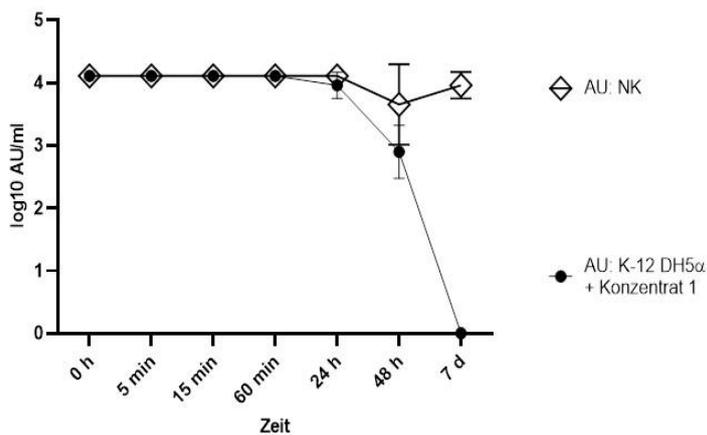


Abb. 27 Aktivitätsbestimmung bei 37°C, unverdünntes Konzentrat 1. Dargestellt sind die Aktivitätseinheiten (AU/ml) von Konzentrat 1 in K-12 DH5α-Kultur zu definierten Zeitpunkten. NK = Negativkontrolle (Konzentrat 1 + LB-Medium). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).

Unmittelbar nach der Zugabe von Konzentrat 1 konnte die Zellzahl von K-12 DH5α um sechs Log-Stufen reduziert werden. Diese Zellzahl blieb über den Zeitraum von 60 min konstant. Nach 24 h lag die Zellzahl von K-12 DH5α auf dem Niveau der Negativkontrolle und blieb bis zu sieben Tage nahezu konstant auf diesem Niveau (Abb. 26).

Die Bakteriozinkonzentration der Negativkontrolle (Konzentrat 1 + LB-Medium) lag über die gesamte Versuchsdauer von sieben Tagen bei 10⁴ AU/ml. Bei Zugabe von Konzentrat 1 zur K-12 DH5α-Kultur sank die Bakteriozinkonzentration nach 48 h auf 10³ AU/ml. Nach sieben Tagen war eine Aktivität des Bakteriozins nicht mehr nachweisbar (Abb. 27).

4.7.2 Zellzahlreduktion von *E. coli* K-12 DH5 α in LB-Medium bei 4°C

Bei diesem Ansatz wurde Konzentrat 1 unverdünnt mit dem Referenzstamm K-12 DH5 α im Verhältnis 1:1 vermischt. Der Ansatz wurde über die gesamte Versuchsdauer bei einer Temperatur von 4°C gelagert. Die Ausgangskonzentration von K-12 DH5 α lag bei 10⁷ KbE/ml.

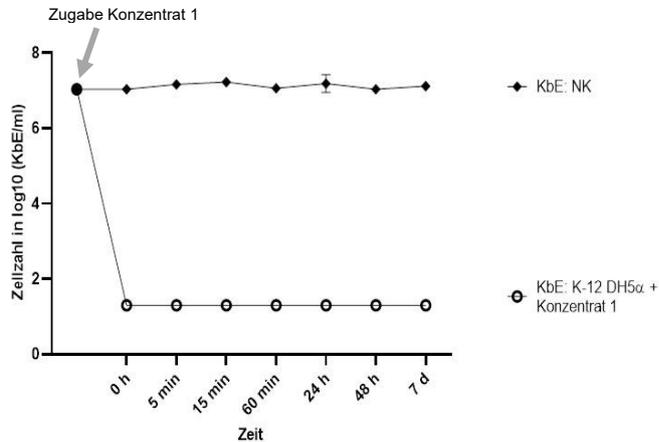


Abb. 29 Zellzahlreduktion bei 4°C, unverdünntes Konzentrat 1. Dargestellt sind die Zellzahlen in KbE/ml von K-12 DH5 α mit und ohne Zusatz von Konzentrat 1 zu definierten Zeitpunkten. NK = Negativkontrolle (K-12 DH5 α + LB-Medium). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).

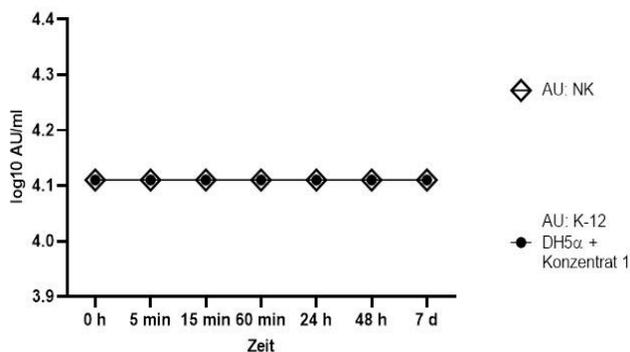


Abb. 28 Aktivitätsbestimmung bei 4°C, unverdünntes Konzentrat 1. Dargestellt sind die Aktivitätseinheiten (AU/ml) von Konzentrat 1 in K-12 DH5 α -Kultur zu definierten Zeitpunkten. NK = Negativkontrolle (Konzentrat 1 + LB-Medium). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).

Unmittelbar nach der Zugabe von Konzentrat 1 wurde die Zellzahl um sechs Log-Stufen reduziert. Im Gegensatz zum 37°C-Ansatz, blieb die Zellzahl über die Gesamtdauer des Versuches von sieben Tagen minimal oberhalb bzw. unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 29).

Die Bakteriozinkonzentration der Negativkontrolle (Konzentrat 1 + LB-Medium) als auch die Bakteriozinkonzentration nach Zugabe von Konzentrat 1 zur K-12 DH5 α -Kultur, lagen über die Gesamtversuchsdauer von sieben Tagen konstant bei 10⁴ AU/ml (Abb. 28).

Bei einem weiteren Ansatz wurde das Konzentrat 1 1:50 verdünnt und mit dem Referenzstamm K-12 DH5 α im Verhältnis 1:1 vermischt (Abb. 30, Abb. 31). Der Ansatz wurde über die gesamte Versuchsdauer bei einer Temperatur von 4°C gelagert. Die Ausgangskonzentration von K-12 DH5 α lag bei 10⁷ KbE/ml.

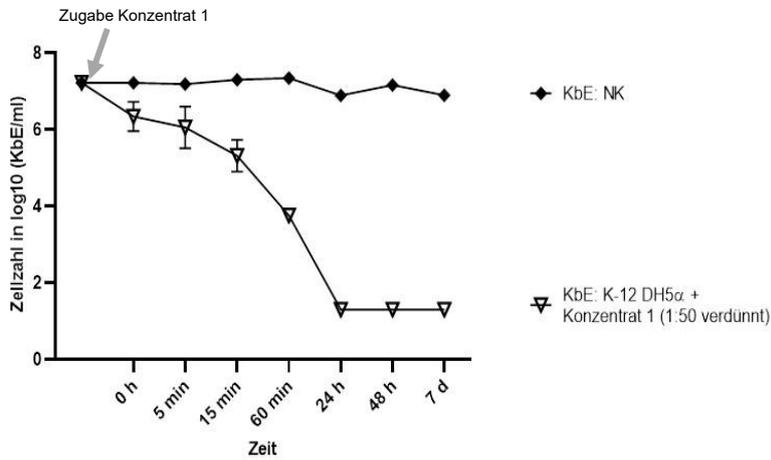


Abb. 30 Zellzahlreduktion bei 4°C, 1:50 verdünntes Konzentrat 1. Dargestellt sind die Zellzahlen in KbE/ml von K-12 DH5 α mit und ohne Zusatz von Konzentrat 1 zu definierten Zeitpunkten. NK = Negativkontrolle (K-12 DH5 α + LB-Medium). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).

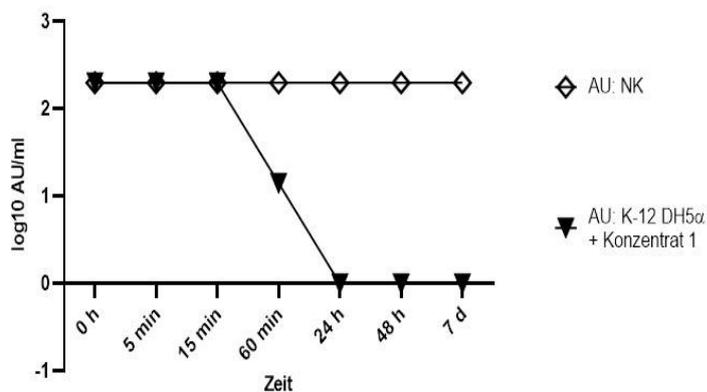


Abb. 31 Aktivitätsbestimmung bei 4°C, 1:50 verdünntes Konzentrat 1. Dargestellt sind die Aktivitätseinheiten (AU/ml) von Konzentrat 1 in K-12 DH5 α -Kultur zu definierten Zeitpunkten. NK = Negativkontrolle (Konzentrat 1 + LB-Medium). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).

Direkt nach der Zugabe des 1:50 verdünnten Konzentrat 1, wurde die Zellzahl um eine Log-Stufe gesenkt. Innerhalb von 60 min erfolgte eine Reduktion der Zellzahl um insgesamt drei Log-Stufen. Nach 24 h lag die Zellzahl bei 10¹ KbE/ml. Insgesamt erzielte das Konzentrat 1 eine Reduktion von sechs Log-Stufen. Dieser Wert blieb bis zum Ende der Versuchsdauer von sieben Tagen konstant (Abb. 30).

Die Bakteriozinkonzentration der Negativkontrolle (1:50 verdünntes Konzentrat 1 + LB-Medium) lag konstant bei ungefähr 10^2 AU/ml über die gesamte Versuchsdauer. Die Bakteriozinkonzentration nach Zugabe von 1:50 verdünntem Konzentrat 1 zur K-12 DH5 α -Kultur, lag in den ersten 60 min der Versuchsdauer ebenfalls bei 10^2 AU/ml. Nach 24 h und bis zum Ende des Versuchs war keine Aktivität des Bakteriozinkonzentrates mehr nachweisbar (Abb. 31).

Abb. 32 zeigt den direkten Vergleich der Zellzahlreduktionskurven von Konzentrat 1 unverdünnt und Konzentrat 1 in 1:50-Verdünnung bei 4°C.

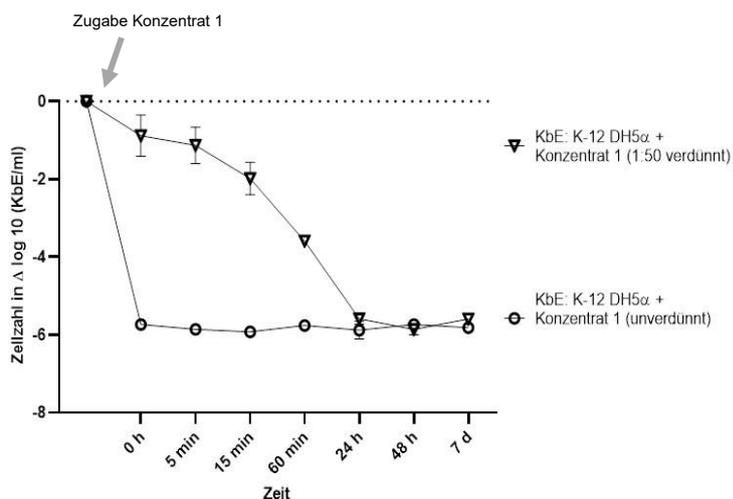


Abb. 32 Zellzahlreduktion durch Konzentrat 1 unverdünnt und verdünnt (1:50) bei 4°C. Dargestellt sind die Zellzahlen in $\Delta \log_{10}$ (KbE/ml) von K-12 DH5 α mit Zusatz von Konzentrat 1 zu definierten Zeitpunkten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen ($n = 2$).

Bei 4°C Lagerung wurde die Zellzahl von K-12 DH5 α 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 Zellzahl von K-12 DH5 α um eine und innerhalb von 60 min um drei weitere Log-Stufen gesenkt. Nach 24 h wurde die Zellzahl nochmals um zwei Log-Stufen reduziert und blieb anschließend über sieben Tage konstant (Abb. 32).

Um die Wirkung von Konzentrat 1 und Konzentrat 2, welches bei der Herstellung höher aufgereinigt wurde (s. Kapitel 3.2.9), zu vergleichen, wurde ein Versuchsdurchgang in Doppelbestimmung (technisches Duplikat) mit Konzentrat 2 bei 4°C durchgeführt. Konzentrat 2 wurde ebenfalls wie Konzentrat 1 zuvor im Spot-Assay auf seine Lyse-Eigenschaft gegenüber dem Referenzstamm K-12 DH5 α getestet (Abb. 25).

Aufgrund der Herstellung von Konzentrat 2 wird davon ausgegangen, dass die Bakteriozine konzentrierter vorliegen und die reduzierende Wirkung stärker sein wird. Deshalb wurde das Konzentrat 2 in 1:100 Verdünnung im Versuch eingesetzt und mit den Daten der 1:50 Verdünnung von Konzentrat 1 verglichen (Abb. 33).

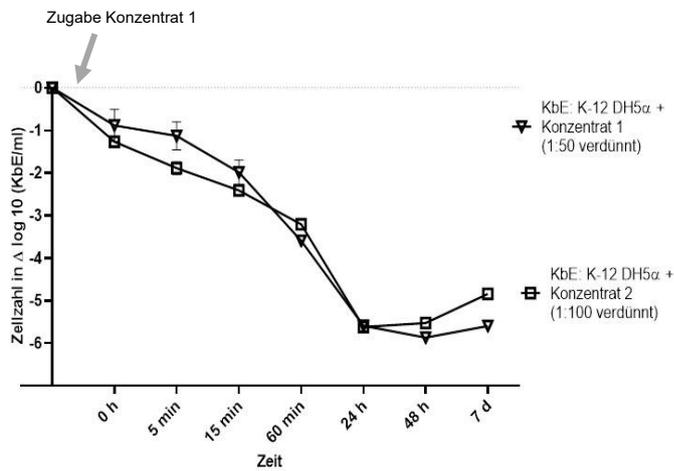


Abb. 33 Zellzahlreduktion durch Konzentrat 1 und 2, verdünnt, bei 4°C. Dargestellt sind die Zellzahlen in $\Delta \log_{10}$ (KbE/ml) von K-12 DH5 α mit Zusatz von Konzentrat 1 bzw. 2 zu definierten Zeitpunkten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).

Die Zellzahl von K-12 DH5 α wurde sowohl bei dem 1:100 verdünnten Konzentrat 2 (10^2 AU/ml) als auch bei dem 1:50 verdünnten Konzentrat 1 (10^2 AU/ml) innerhalb von 24 h um sechs Log-Stufen reduziert (Abb. 33). Nach 24 h war keine Bakteriozinaktivität in Konzentrat 2 (1:100 Verdünnung) zu sehen (Abb. 34). Konzentrat 1 (1:50 Verdünnung) zeigte einen vergleichbaren Wert der Bakteriozinaktivität (Abb. 31).

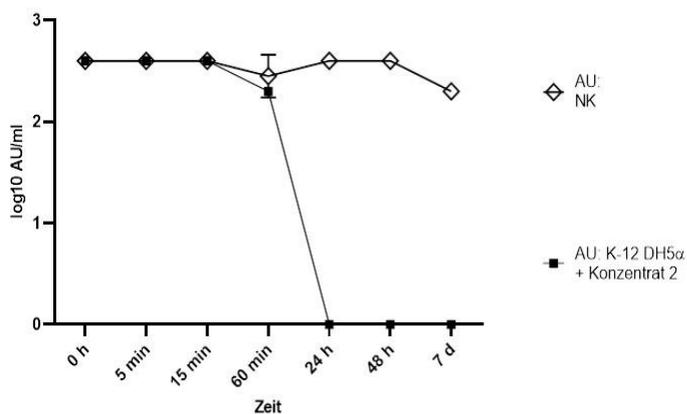


Abb. 34 Aktivitätsbestimmung bei 4°C, 1:100 verdünntes Konzentrat 2. Dargestellt sind die Aktivitätseinheiten (AU/ml) von Konzentrat 2 in K-12 DH5 α -Kultur zu definierten Zeitpunkten. NK = Negativkontrolle (Konzentrat 2 + LB-Medium). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).

4.7.3 Zellzahlreduktion von *E. coli* K-12 DH5 α in Hackfleisch bei 4 °C

Für die Zellzahlreduktionsversuche in Hackfleisch wurden folgende Bedingungen gewählt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei Kühlschranktemperatur (4°C). Die Versuchsdauer wurde auf einen Zeitraum von 48 h festgelegt. Als Bakteriozinkonzentrat wurde das Konzentrat 2 eingesetzt, da dieses herstellungsbedingt einen höheren Reinheitsgrad aufweist und im Medium-Versuch hoch verdünnt zu einer Reduktion des Referenzstammes K-12 DH5 α führen konnte. Die Ausgangskonzentration von K-12 DH5 α lag bei 10⁷ KbE/ml.

Im ersten Versuchsdurchgang wurde 1ml Konzentrat 2 zu 10 g mit K-12 DH5 α inokuliertem Hackfleisch hinzugefügt und zu definierten Zeitpunkten (0 h, 1 h, 4 h, 24 h und 48 h) die Zellzahl mittels Tropfplattenverfahren bestimmt. Da das Hackfleisch homogenisiert wurde, kann von einem 10 ml Volumen Hackfleisch ausgegangen werden. Demnach ist das Verhältnis Hackfleisch zu Konzentrat 2 in etwa 1:10.

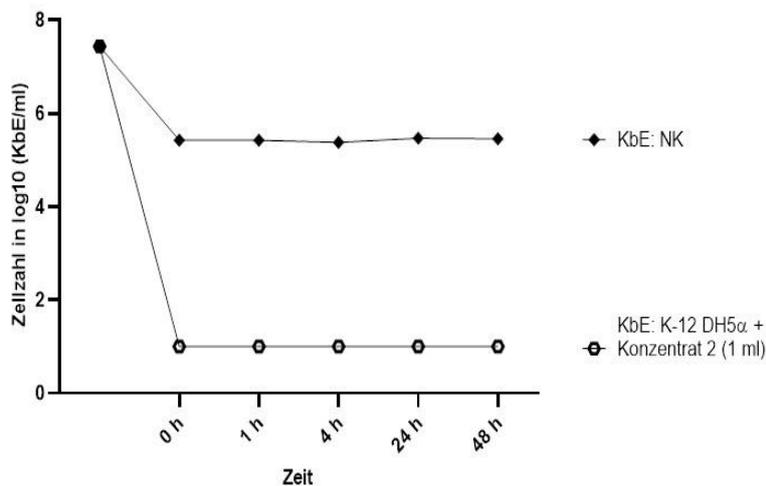


Abb. 35 Zellzahreduktion durch 1 ml Konzentrat 2 im Lebensmittel bei 4°C. Dargestellt sind die Zellzahlen in KbE/ml von K-12 DH5 α mit und ohne Zusatz von Konzentrat 2 zu definierten Zeitpunkten. NK = Negativkontrolle (K-12 DH5 α + LB-Medium). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).

Direkt nach Zugabe von 1 ml Konzentrat 2 zum Lebensmittel reduzierte sich die Zellzahl von K-12 DH5 α auf 10¹ KbE/ml. Die Zellzahl von K-12 DH5 α in der Negativkontrolle (K-12 DH5 α + LB-Medium) lag beim ersten Messwert bei 10⁵ KbE/ml und blieb über 48 h konstant (Abb. 35).

Der zweite Durchgang wurde in einem Verhältnis 1:100 von Konzentrat und Hackfleisch durchgeführt (0,1 ml Konzentrat 2 und 10 ml Hackfleisch).

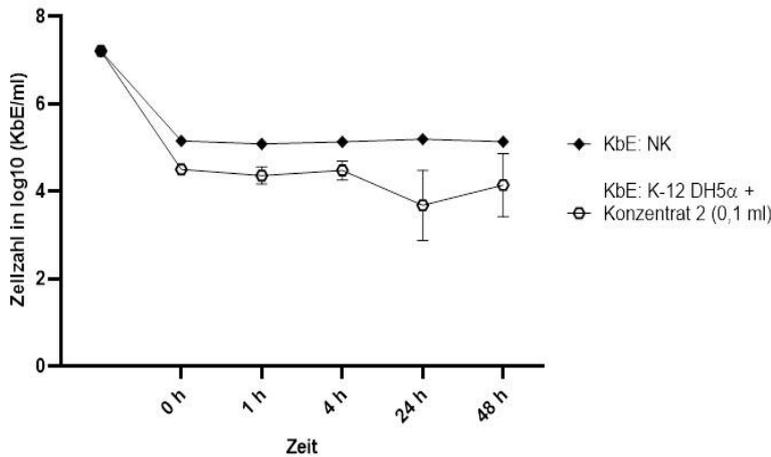


Abb. 36 Zellzahlreduktion durch 0,1 ml Konzentrat 2 im Lebensmittel bei 4°C. Dargestellt sind die Zellzahlen in KbE/ml von K-12 DH5α mit und ohne Zusatz von Konzentrat 2 zu definierten Zeitpunkten. NK = Negativkontrolle (K-12 DH5α + LB-Medium). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).

Nach Zugabe von 0,1 ml Konzentrat 2 zum Hackfleisch wurde die Zellzahl von K-12 DH5α um ca. zwei Log-Stufen reduziert und blieb mit geringen Schwankungen auf diesem Niveau über die gesamte Versuchsdauer. Die Zellzahl von K-12 DH5α in der Negativkontrolle (K-12 DH5α + LB-Medium) lag beim ersten Messwert bei 10⁵ KbE/ml und blieb über 48 h konstant (Abb. 36).

Die Zellzahlreduktion von K-12 DH5α im Hackfleisch bei 4°C ist vergleichend in Abb. 37 dargestellt. Während die Zugabe von 0,1 ml Konzentrat 2 zu einer Reduktion von ca. einer Log-Stufe führte, konnte die Zellzahl durch die Applikation eines größeren Volumens (1 ml Konzentrat 2) um ca. vier Log-Stufen reduziert werden.

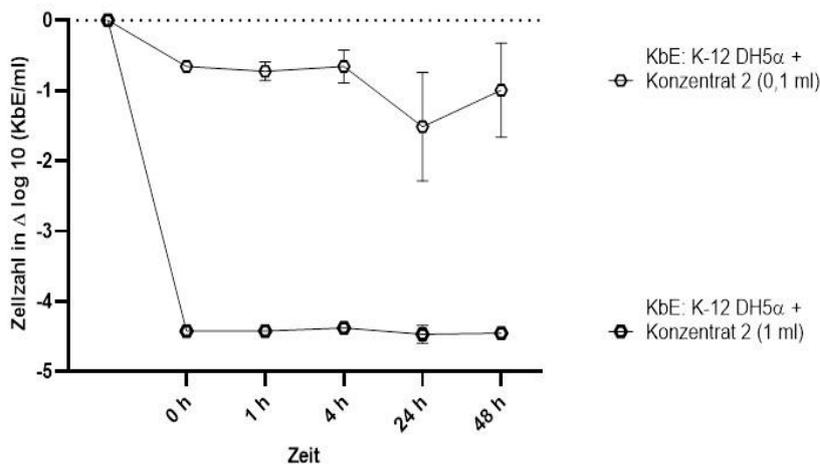


Abb. 37 Zellzahlreduktion durch Konzentrat 2 im Lebensmittel bei 4°C. Dargestellt sind die Zellzahlen in Δlog₁₀ (KbE/ml) von K-12 DH5α mit Zusatz von Konzentrat 2 in unterschiedlichen Volumina (0,1 ml und 1 ml) zu definierten Zeitpunkten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 2).

5. Diskussion

E. coli gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und dient in der Lebensmittelhygiene als Hygieneindikator. Als Kommensale des Darmtraktes von Menschen und Tieren gibt der vermehrte Nachweis im Lebensmittel Hinweise auf eine fäkale Kontamination. Vor allem in Lebensmitteln tierischen Ursprungs weist *E. coli* eine sehr hohe Prävalenz auf. Eine besondere Rolle spielen die enteropathogenen *E. coli* als Lebensmittel-Zoonoseerreger, da diese vermehrt Resistenzen gegenüber Antibiotika aufweisen. Die Suche nach alternativen antimikrobiellen Substanzen ist daher von großer Bedeutung zur Bekämpfung von enteropathogenen *E. coli*. Die durch *E. coli* produzierten Colizine und Mikroazine gelten dabei als große Hoffnung in der Bekämpfung von antibiotikaresistenten *E. coli*, vor allem in der Lebensmittelproduktion.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es festzustellen, ob aus Lebensmitteln isolierte *E. coli* in der Lage sind Bakteriozine zu bilden und ob Bakteriozine *E. coli*-Zellzahlen im Lebensmittel reduzieren können. Dafür wurden zunächst *E. coli* aus verschiedenen Lebensmittelmatrixen isoliert und anschließend auf ihre Lyse-Eigenschaften gegenüber ausgewählten *E. coli*-Referenzstämmen getestet. Darüber hinaus wurden die Isolate mit Lyse-Eigenschaften durch die Bestimmung der Phylogruppe und das Testen auf Bakteriozin-Gene weiter charakterisiert. Nach Herstellung eines Bakteriozin-Konzentrates wurde dieses eingesetzt, um die Zellzahl von *E. coli* im Medium bzw. im Lebensmittel zu reduzieren.

5.1 Genus- und Speziesbestimmung der Bakterienisolate

83 Lebensmittelproben wurden auf das Vorhandensein von *E. coli* untersucht. Aus 97,5 % der Proben konnte *E. coli* isoliert und mittels MALDI-TOF MS-Analyse bestätigt werden. Dabei wurden 51,3 % *E. coli* aus Fleisch isoliert. Vergleichbare Werte finden sich auch in der Literatur. So zeigten Studien aus verschiedenen Ländern wie Indien, Südafrika, den USA (Washington D.C.), Burkina Faso und Australien Nachweisraten von *E. coli* in Fleisch zwischen 11,9 % und 100 % (Kagambega et al. 2011; Zhao et al. 2001). Dabei lagen die detektierten Prävalenzen zwischen 11,9 % und 100,0 % für Geflügelfleisch, 17,8 % und 100,0 % für Rindfleisch und bei 16,3 % für Schweinefleisch (Kagambega et al. 2011; Phillips et al. 2008; Chaudhari et al. 2007; Zhao et al. 2001; Vorster et al. 1994). Mit 37,5 % war die *E. coli* Prävalenz in der vorliegenden Arbeit bei Fertiggerichten und Backwaren geringer. In der Literatur findet man Werte von 10,8 % STEC-Prävalenz in Mehl und 0,44 % EHEC-Prävalenz in ungemahlenem Weizen (Boss und Hummerjohann 2019; Myoda et al. 2019). In Japan wurden Nachspeisen auf das Vorkommen von *E. coli* untersucht, wobei in keinen der untersuchten Nachspeisen *E. coli* nachgewiesen werden konnte (Harada et al. 2018). Eine Studie aus den USA ermittelte einen Zusammenhang zwischen an HUS erkrankten Personen

und dem Verzehr von abgepacktem Keksteig. So verzehrten 94,0 % der Personen mit HUS-Symptomen vor dem Auftreten der Symptomatik abgepackten Keksteig, in welchem STEC (*E. coli* 0157) nachgewiesen worden sind (Neil et al. 2012). Die *E. coli*-Prävalenzen im Gemüse liegen in der Literatur zwischen 14,9 % und 6,3 % (Richter et al. 2021; Harada et al. 2018). So wurde in Südafrika Gemüse (Spinat, Gurke, Tomate, grüne Bohnen, Salat) aus dem Einzelhandel, von Bauernmärkten und von Straßenhändlern beprobt (Richter et al. 2021). In Indonesien und Japan lag die detektierte Prävalenz bei 7,7 % und 6,3 % (Waturangi et al. 2019; Harada et al. 2018). Diese Werte sind vergleichbar mit der in dieser Arbeit ermittelten *E. coli*-Prävalenz von 11,3 % für Gemüse. Die detektierten Prävalenzen bei Fisch und Fischprodukten variiert in der Literatur stark und ist höher als die in dieser Arbeit ermittelte Prävalenz von 3,8 %. So werden in der Literatur Werte zwischen 29,3 % in Indien und 1,4 % in den USA (Bundesstaat Virginia) angegeben (Gupta B 2013; Pao et al. 2008). Auf Fischmärkten im Sudan lag die Prävalenz bei 23,2 %, bei Fisch und Meerestieren, z.T. als Fertigprodukte, in Japan bei 6,1 % und in Ägypten bei 15,3 % (Hussein et al. 2019; Harada et al. 2018; Yagoub 2009). Bei Milchprodukten wurde im Iran eine *E. coli*-Prävalenz von 30,2 % ermittelt. Die Prävalenz bei Käse lag bei 80,0 % (Ranjbar et al. 2018). Bei Frischkäse aus dem Einzelhandel in Mexiko lag die Prävalenz bei 94,0 % für *E. coli* (Soto Beltran et al. 2015). Beim Vergleich der Literaturwerte fällt auf, dass *E. coli* eine sehr hohe Prävalenz vor allem im Lebensmittel tierischen Ursprungs hat.

Die Verordnung (EG) Nr. 2073/2005, welche sich auf die Verordnung (EG) Nr. 852/2004 stützt, definiert mikrobiologische Kriterien für bestimmte Mikroorganismen sowie deren Durchführungsbestimmungen für Lebensmittelunternehmen. Der Inhalt der oben genannten Verordnung legt sowohl Lebensmittelsicherheitskriterien als auch Prozesshygienekriterien für Fleisch- und Fleischerzeugnisse, aber auch für Milch- und Milcherzeugnisse, Eierzeugnisse, Fischerzeugnisse, Gemüse, Obst und deren Erzeugnisse fest. *E. coli* wird bei Hackfleisch/Faschiertes, Separatorenfleisch und Fleischzubereitungen als Indikator für fäkale Kontamination verwendet (s. Anhang). Die Lebensmittelkontamination mit *E. coli* ereignet sich entlang der Lebensmittelproduktionskette. Dabei kann eine Kontamination bei der Lebensmittelgewinnung, -verarbeitung oder -verteilung stattfinden. Weitere Kontaminationen und daraus resultierende Infektionen mit potenziell pathogenen Erregern können beim Verkauf und der Zubereitung von Lebensmitteln erfolgen. So spielt die Personalhygiene bei der Zubereitung eine entscheidende Rolle. In einer Studie wurde die Zubereitung von Lebensmitteln mit bloßen Händen der Zubereitung unter Einsatz von Handschuhen gegenübergestellt. Dort wurde festgestellt, dass es häufiger zu einer Kreuzkontamination bei der Zubereitung mit bloßen Händen kam (Yap et al. 2019). Weiter zeigt die Studie, dass einfache Hygienemaßnahmen wie regelmäßiges Händewaschen, sowie ausreichendes Abtrocknen der Hände zu einer verringerten Kontamination führen. Handschuhe stellen bei

der Zubereitung von Lebensmitteln eine weitere Barriere dar. Diese müssen regelmäßig gewechselt und gereinigt werden. Außerdem sollten die Personen, die Lebensmittel zubereiten, ebenfalls ihre Hände regelmäßig waschen (Yap et al. 2019). Petersen und James (1998) stellten in ihrer retrospektiven Studie fest, dass vor allem Lebensmittel tierischen Ursprungs (Fleisch und Eier) als Vektoren für pathogene lebensmittelassoziierte Mikroorganismen (*Salmonella*, STEC) fungieren (Petersen und James 1998). Die Übertragung von lebensmittelassoziierten Erregern wie beispielsweise STEC ist vor allem auf unzureichend erhitzte Lebensmittel zurückzuführen. Insbesondere bei der Herstellung von Hackfleisch gelangen Erreger durch die Durchmischung von der Oberfläche ins Innere. Wird das Lebensmittel bei der Zubereitung unzureichend erhitzt, werden die Erreger nicht ausreichend abgetötet (Ayodele et al. 2020). Durch die immer weiter zunehmende Globalisierung, wie beispielsweise interkontinentales Verbringen von Lebensmitteln innerhalb der Lebensmittelkette, wird diese Problematik noch verstärkt. Hierzu zitiert Hahn-Lobmann et al. (2019) einen journalistischen Artikel des amerikanischen Journalisten Roberto A. Ferdman, in dem beschrieben wird, dass eine bekannte Fastfood-Kette für die Herstellung ihrer Hamburger-Patties Fleisch von über 100 verschiedenen Rindertierkörpern verwendet (Hahn-Lobmann et al. 2019). Demnach reicht bereits ein infiziertes Tier aus, um verheerende Folgen auf den Lebensmittellendverbraucher haben zu können.

5.2 Detektion der Bakteriozinbildung im Spot-Assay

Um zu ermitteln, ob die isolierten *E. coli* Bakteriozine bilden, wurden Spot-Assays mit sechs verschiedenen Referenzstämmen durchgeführt. So wiesen 52,5 % der aus Lebensmitteln isolierten *E. coli* eine Lyse von mindestens einem Referenzstamm auf. Bisher gibt es noch keine Studie über die Prävalenz der Bakteriozinbildung bei *E. coli*-Lebensmittelisolaten. In der Humanmedizin konnten jedoch bereits Bakteriozinbildner bei nicht-pathogenen, bei Durchfall-assoziierten und bei extraintestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC) ermittelt werden mit Prävalenzen von 32,6 %, 36,9 % bzw. 78,8 % (Micenkova et al. 2014). ExPEC zeichnen sich durch die Präsenz von bestimmten Virulenzfaktoren (*sfa*, *pap*, *a-hyl*, *cnf1*) aus. Untersuchungen zeigten, dass die meisten ExPEC-Isolate auch für mehrere Colizine und Mikroazine kodieren (Micenkova et al. 2014). Weiter untersuchten Micenkova et al. (2014), inwiefern das Vorhandensein der Virulenzfaktoren Einfluss auf die Bakteriozinbildung hat. Es konnte gezeigt werden, dass das Vorkommen von Bakteriozinbildner bei den Isolaten mit zunehmender Anzahl an Virulenzfaktoren steigt. Während nur 28,6 % der Isolate ohne Virulenzfaktoren bakterizid waren, konnten bei Isolaten mit einem, zwei oder bis zu sieben Virulenzfaktoren Prävalenzen von 34,0 %, 28,6 % bzw. 70,6 % festgestellt werden (Micenkova et al. 2014). In einer weiteren Studie erwiesen sich 54,2 % der aus humanen Stuhlproben (Durchfallproben) isolierten *E. coli* als Bakteriozinbildner (Micenkova et al. 2016a). Dieser Wert

ist vergleichbar mit dem in dieser Arbeit ermittelten Wert von 52,5 %. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich auf die bakterizide Wirkung der *E. coli*-Isolate hin untersucht. Die Isolate, bei denen im Spot-Assay eine Bakteriozinbildung nachgewiesen werden konnte, wurden anschließend auf das Vorhandensein von bekannten Bakteriozin-Genen untersucht.

5.3 Lyse-Spektrum und Sensitivität der Referenzstämme

Mit dem kombinierten Einsatz der in dieser Arbeit genutzten Referenzstämme *E. coli* K-12 P400, K-12 5K, K-12 ϕ , K-12 row und *Shigella sonnei* 17 lassen sich alle bisher bekannten Colizine und Mikroazine nachweisen. Von den *E. coli*-Übernachtskulturen der in dieser Arbeit verwendeten Isolate, lysierten 52,5 % mindestens einen der eingesetzten Referenzstämme und auch nach Extraktion der Übernachtskulturen wiesen 41,3 % der Extrakte eine Lyse von mindestens einem Referenzstamm auf. Der relativ hohe Anteil an *E. coli*-Übernachtskulturen, die keine Lyse im Spot-Assay zeigten, könnte an Colizin-Resistenzen liegen. So beschreiben Feldgarden und Riley (1998) vier bereits bekannte Mechanismen, welche zu einer Colizin-Resistenz führen können. Zum einen bindet beispielsweise ein Plasmid-kodiertes Immunitätsprotein an ein spezifisches Colizin und inaktiviert dieses. Zum anderen können durch Mutationen veränderte Oberflächenrezeptoren ebenfalls zu einer Resistenz gegenüber Colizinen führen. Außerdem kann eine Colizin-Toleranz durch Veränderungen der Zellmembranproteine, welche an der Colizin-Translokation beteiligt sind, entstehen. Des Weiteren kann ein Superinfektionsausschluss bei lytischen Phagen Infektionen mit demselben Phagen verhindern, was Colizin-Resistenzen begünstigen kann (Calcuttawala et al. 2015; Feldgarden und Riley 1998). Darüber hinaus wird die Expression des Lyse-Protein-Gens gesteuert. Damit wird verhindert, dass es zu einer überschüssigen Colizin-Produktion kommt (Cascales et al. 2007). Weitere Ursachen dafür, dass ein *E. coli*-Isolat keine Lyse des Referenzstammes erzeugt, kann das Fehlen von Bakteriozin-Genen sein oder dass diese nicht exprimiert werden. Dies kann mehrere Gründe haben. Unter anderem kann das Fehlen von Zell-Zell-Interaktionen zu einem Ausbleiben der Genexpression führen (Ghazaryan et al. 2014; Cascales et al. 2007). In den durchgeführten Spot-Assays der vorliegenden Arbeit wurden Bakterienreinkulturen eingesetzt, sodass es zu keiner Zell-Zell-Interaktion mit anderen Bakterien gekommen ist und die Bakteriozinproduktion somit eventuell nicht angeregt wurde. Darüber hinaus sind weitere Auslöser und Umweltbedingungen bekannt, die die Colizin-Produktion induzieren können. Auslösende Faktoren sind zum Beispiel DNA-schädigende Agentien (z.B. Mitomycin C), anaerobe Bedingungen, oxidativer Stress, Nährstoffmangel, Kälteschock, Hitzeschock, osmotischer Schock und pH-Stress. Dabei wird die Produktion vor allem über das SOS-Reparatursystem reguliert. Am stärksten wird die Produktion von Colizinen dabei durch mutagene Substanzen induziert (Ghazaryan et al. 2014).

Vergleicht man das Lyse-Spektrum der Übernachtskulturen mit dem der Extrakte, wiesen beide ein breites Lyse-Spektrum auf. So lysierten bei den Übernachtskulturen 81,0 % bzw. bei den Extrakten 63,7 % alle sechs Referenzstämme. Die geringere Lyse-Aktivität bei den Extrakten kann darin begründet sein, dass einige Bakteriozine durch den Extraktionsvorgang inaktiviert worden sind. Für den späteren Einsatz der bakteriozinbildenden *E. coli*-Isolate zur Reduktion von *E. coli* im Lebensmittel ist es sinnvoll, Isolate mit einem breitem Lyse-Spektrum auszuwählen. Der Referenzstamm K-12 DH5 α wies mit 100 % die höchste und der Referenzstamm *Shigella sonnei* 17 mit 81,0 % die geringste Sensitivität gegenüber den eingesetzten Übernachtskulturen auf. Bei den Extrakten wiederum zeigte der Referenzstamm K-12 Row mit 97,0 % die höchste Sensitivität gegenüber den Bakteriozinen. Der Referenzstamm *Shigella sonnei* 17 war wie bei den Übernachtskulturen am wenigsten sensibel gegenüber den getesteten Extrakten (66,7 %). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Zellzahlreduktionsversuche von *E. coli* durch den Einsatz von Bakteriozinen wurde daher der Referenzstamm K-12 DH5 α ausgewählt. Dieser war gegenüber den Übernachtskulturen bzw. den Extrakten zu 100,0 bzw. 90,9 % sensibel. Für zukünftige Versuche wäre der Einsatz von pathogenen *E. coli*-Referenzstämmen durchaus sinnvoll, da zunächst aber eine prinzipielle Durchführbarkeit des Versuchsmodells belegt werden sollte, wurde bewusst auf den Einsatz von pathogenen *E. coli* verzichtet.

5.4 Nachweis bekannter Colizin- und Mikrozin-Gene

Die Colizin-Gene B, E7 und Ia konnten am häufigsten bei den untersuchten lysierenden *E. coli*-Isolaten aus Lebensmitteln nachgewiesen werden. Es konnte keine Korrelationen zwischen Lyse-Aktivität und dem Vorhandensein bestimmter Gene oder Gen-Kombinationen festgestellt werden. Vor allem der Einsatz von Colizin M in Medium und seine hohe antimikrobielle Aktivität gegenüber pathogenen *E. coli* ist bereits beschrieben (Schulz et al. 2015). Darüber hinaus kommt der kombinierte Einsatz von Colizin M und Colizin E7 in Frage. Zusammen eingesetzt zeigten diese Colizine sowohl in Medium als auch aufgesprüht auf Schweinefilet eine sehr hohe antimikrobielle Aktivität gegenüber STEC (*E. coli* O157:H7) und wiesen ebenfalls synergistische Effekte gegen bestimmte EHEC-Stämme auf (Schulz et al. 2015). Weiter wird beschrieben, dass sogenannte Colizin-Cocktails aus Col M, E7, Ia, 5, K und U zu einer Reduktion von bis zu drei Log Stufen in Fleisch-Matrices bei sieben pathogenen STEC Serotypen (O26:H11, O45:H2, O103:H11, O111:H8, O121:H19, O145:NM und O157:H7) geführt haben (Hahn-Lobmann et al. 2019). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Colizin E7 maßgeblich für die antimikrobielle Wirkung gegenüber dem Serotyp O157:H7 verantwortlich ist (Schamberger und Diez-Gonzalez 2002). Micenkova et al. (2016b) wies eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von den Virulenzfaktoren *sfa*, *pap*, *a-hyl*, *cnf1* bei

ExPEC und deren Bakteriozinbildung nach. Bei den untersuchten ExPEC-Isolaten konnte ein vermehrtes Vorkommen von den Colizin-Genen E1, Ia und S4 sowie den Mikrozin-Genen H47, M, V und B17 beobachtet werden. Des Weiteren wurde auch ein höheres Vorkommen von Mikrozin-Genen in ExPEC-Isolaten festgestellt. Bei nicht pathogenen *E. coli*-Isolaten aus humanen Stuhlproben wurden hingegen mehr Colizin-Gene detektiert (Micenkova et al. 2016b). In einer weiteren Studie wurden Kotproben von Schweinen auf pathogene *E. coli* untersucht (STEC, ETEC). Hier wurde festgestellt, dass porcine Isolate vorrangig Colizine produzierten (94,0 %). Am häufigsten wurde Colizin B mit 42,6 % nachgewiesen. Colizin M wurde zu 40,1 % und Colizin Ib zu 34,0 % detektiert (Bosak et al. 2019). Colizin B war in der vorliegenden Arbeit mit 26,2 % ebenfalls das am meisten produzierte und nachgewiesene Colizin in den untersuchten Lebensmittel-Isolaten. Es konnte keine Korrelation zwischen Ausgangsmaterial der Lebensmittelprobe (Schweinefleisch) und dem Nachweis von Colizin B festgestellt werden. Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit das vermehrte Vorkommen von einzelnen Bakteriozin-Genen keinen bestimmten Lebensmittelgruppen zugeordnet werden.

5.5 Phylogruppenbestimmung der *E. coli*-Isolate

Die Phylogruppenbestimmung der *E. coli*-Isolate nach Clermont et al. (2013) diente dazu einen möglichen Zusammenhang zwischen Lyse-Eigenschaft, dem Nachweis bestimmter Bakteriozin-Gene und der Zugehörigkeit zu einer bestimmten Phylogruppe zu untersuchen. Die *E. coli*-Isolate wurden überwiegend den Phylogruppen A (37,5 %) und B1 (36,3 %) zugeordnet (Tab. 41; Abb. 23). Bei 9,5 % der *E. coli*-Isolate wurden ausschließlich Gene für Mikrozine nachgewiesen. Diese Isolate gehörten alle der Phylogruppe B1 an und wiesen unterschiedliche Mikrozin-Gene auf. Eine Korrelation zwischen Lyse-Eigenschaft, dem Vorkommen von bestimmten Colizin- oder Mikrozin-Genen und der Zugehörigkeit zu einer bestimmten Phylogruppe konnte nicht bestätigt werden. Fäkale *E. coli*-Isolate gehören überwiegend den Phylogruppen A und B1 an (Micenkova et al. 2016b). Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, dass die in dieser Arbeit aus Lebensmittel isolierten *E. coli* auch durch fäkale Verunreinigungen entlang der Lebensmittelproduktionskette auf die verschiedenen Lebensmittelmatrices übertragen worden sind. Pathogene extraintestinale *E. coli* gehören dagegen vor allem den Phylogruppen B2 und D an (Micenkova et al. 2016a; Mirzarazi et al. 2015; Santos et al. 2013; Picard et al. 1999).

5.6 Bestimmung des Molekulargewichtes der Bakteriozine

Neun der 33 untersuchten Proteinextrakte zeigten eine Lyse-Bande zwischen 55 und 75 kDa auf dem Overlay-Agar des inkubierten SDS-Gels. Das Molekulargewicht der Colizine liegt zwischen 30 und 75 kDa (Smarda und Smajs 1998). Daraus lässt sich schließen, dass diese

beobachtete Lyse sehr wahrscheinlich auf ein Colizin zurückzuführen ist. Die einzelnen Colizin-Molekulargewichte liegen oft sehr dicht beieinander. Deshalb ist es möglich, dass zwei oder mehrere Colizine verantwortlich für eine Lyse-Bande sind. Eine 2D-Elektrophorese der ausgestochenen Lyse-Bande könnte weiter Aufschluss darüber geben. In einem Proteinextrakt aus dieser Arbeit konnten sogar zwei Colizine mit unterschiedlichen Molekulargewichten nachgewiesen werden (Abb. 24).

5.7 Zellzahlreduktion von *E. coli* K-12 DH5 α durch den Einsatz von *E. coli* 2116 Colizin-Konzentrat

Ziel der vorliegenden Arbeit war es festzustellen, ob aus Lebensmitteln isolierte *E. coli* in der Lage sind, Bakteriozine zu bilden und ob Bakteriozine *E. coli*-Zellzahlen im Lebensmittel reduzieren können. Nach Detektion von Bakteriozinbildnern und Charakterisierung der Bakteriozine wurde ein Bakteriozin-Konzentrat hergestellt. In Versuchen wurde anschließend ermittelt, ob dieses Bakteriozin-Konzentrat in der Lage ist, den *E. coli* K-12 DH5 α Referenzstamm unter definierten Bedingungen zu reduzieren.

Nach unmittelbarer Zugabe des *E. coli* 2116 Colizin-Konzentrats (im Folgenden Konzentrat 1 bzw. Konzentrat 2) mit einer Aktivität von 10^4 AU/ml, konnte die Zellzahl von *E. coli* K-12 DH5 α (im Folgenden K-12 DH5 α) bei 37°C und 4°C-Umgebungstemperatur um sechs Log-Stufen reduziert werden. Bei 37°C Umgebungstemperatur stieg die Zellzahl innerhalb von 24 h wieder auf 10^8 KbE/ml an. Bei 4°C Umgebungstemperatur blieb die Zellzahl nach Reduktion über die Gesamtversuchsdauer konstant bei 10^1 KbE/ml. Vermutlich handelt es sich hierbei um resistente Klone von K-12 DH5 α , welche sich bei einer Umgebungstemperatur von 37°C im Gegensatz zu 4°C wieder vermehren können. Um zu untersuchen, ob auch geringere Colizinkonzentrationen zu einer Lyse des Referenzstammes K-12 DH5 α führen, wurde Konzentrat 1 verdünnt eingesetzt. Dafür wurde die letzte Verdünnungsstufe gewählt, die im Spot-Assay noch eine Lyse des Referenzstammes erzielte (1:50 Verdünnung, 10^2 AU/ml). Die Zugabe des 1:50 verdünnten Konzentrats bewirkte ebenfalls eine Reduktion von K-12 DH5 α um sechs Log-Stufen bei 4°C Umgebungstemperatur, allerdings nicht unmittelbar nach der Zugabe des Konzentrats, sondern in einem Zeitraum von 24 h. Danach blieb die Zellzahl konstant bei ca. 10 KbE/ml. Vermutlich treffen die Bakteriozine und Bakterien in einer geringeren Konzentration nicht unmittelbar nach Zugabe des Konzentrats aufeinander, sodass die Lyse der Bakterien durch das Colizin-Konzentrat somit über einen längeren Zeitraum stattfindet. Konzentrat 2 weist durch Ammoniumsulfat (AMS)-Fällung und anschließender Dialyse eine höhere Aufreinigung auf. Um zu untersuchen, ob das Konzentrat 2 durch Verdünnung zu einer ähnlichen oder noch stärkeren Zellzahlreduktion von K-12 DH5 α führt, wurde auch hier die Aktivität ermittelt. Nach einer 1:100 Verdünnung wies das Konzentrat mit

10^2 AU/ml noch lytische Aktivität auf und entsprach damit der Aktivität des Konzentrats 1 (1:50 Verdünnung). Die Zellzahl von K-12 DH5 α wurde nach Zugabe von Konzentrat 2 (1:100 Verdünnung) ebenfalls innerhalb von 24 h um sechs Log-Stufen reduziert. Damit führt das Konzentrat 2 höher verdünnt zu einem vergleichbaren Ergebnis wie mit dem geringer verdünnten Konzentrat 1. Dies könnte daran liegen, dass die Colizine durch eine stärkere Aufkonzentrierung in einer höheren Konzentration vorliegen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Einsatz von Colizinen zur Reduktion von *E. coli*-Zellzahlen in Medium bei einer Umgebungstemperatur von 4°C im Gegensatz zu 37°C sehr gut geeignet ist. Das Konzentrat 2 weist eine stärkere Aufreinigung und damit auch eine höhere Colizinkonzentration auf. Daher ist es nicht überraschend, dass Konzentrat 2 in einer höheren Verdünnung vergleichbare Ergebnisse wie Konzentrat 1 erzielte. Nach erfolgter Reduktion der Zellzahl änderte sich diese nicht über einen Zeitraum von 7 Tagen. Deshalb scheint der Einsatz von Bakteriozinkonzentraten bei Kühlschranktemperaturen von Lebensmitteln (4°C) vielversprechend. Um diese These zu bestätigen, wurden anschließend Versuche zur Zellzahlreduktion von *E. coli* im Lebensmittel durchgeführt. Als Lebensmittel wurde Hackfleisch ausgewählt und der reguläre *E. coli*-Gehalt des Fleisches vorab getestet. Das Hackfleisch wurde mit dem Referenzstamm K-12 DH5 α in einer Ausgangskonzentration von 10^7 KbE/ml inokuliert. Bei Zugabe von 1 ml Konzentrat 2 zum Lebensmittel wurde die Zellzahl von K-12 DH5 α unterhalb der Nachweisgrenze reduziert. Die Zellzahl der Negativkontrolle lag über die gesamte Versuchsdauer konstant bei 10^5 KbE/ml. Demnach führten Bestandteile der Lebensmittelprobe bereits selbst zu einer Zellzahlreduktion von zwei Log-Stufen des der Probe zugesetzten Referenzstammes K-12 DH5 α . Im nächsten Versuchsdurchgang wurde die Konzentratmenge im Verhältnis 1:10 des ursprünglich eingesetzten Volumens (1 ml) reduziert. Es wurden dementsprechend 0,1 ml Konzentrat 2 zum Lebensmittel hinzugefügt. In diesem Fall erfolgte eine Zellzahlreduktion von einer Log-Stufe auf ca. 10^4 KbE/ml. Die Negativkontrolle lag konstant bei 10^5 KbE/ml. Hier ist davon auszugehen, dass durch die hohe Verdünnung nicht ausreichend Colizine vorhanden sind oder Wechselwirkungen zwischen Colizinen und Bestandteilen des Fleisches vorliegen könnten. Eine Untersuchung der Mechanismen und Wechselwirkungen von Colizinen mit verschiedenen Matrices könnte in zukünftigen Studien weiter Aufschluss geben.

5.8 Fazit und Ausblick

Mit den Zellzahlreduktionsversuchen konnte bewiesen werden, dass eine Reduktion von nicht-pathogenen *E. coli* im Medium und im Lebensmittel durch den Einsatz von Bakteriozinen prinzipiell möglich ist. Allerdings müsste dieses Modell noch erweitert werden. Zum einen sollten weitere Colizinkonzentrate geprüft werden. Das Ziel wäre es einen Bakteriozincocktail zu finden, welcher ein großes Lyse-Spektrum aufweist, starke klare Lysen von allen in dieser Arbeit verwendeten Referenzstämmen verursacht und die Zellzahl im Lebensmittel bis unterhalb der Nachweisgrenze reduziert. Des Weiteren sollten zusätzlich zu den nicht-pathogenen *E. coli*-Laborstämmen auch *E. coli*-Wildstämme und pathogene *E. coli*-Stämme als Referenzstämmen in zukünftigen Studien zum Einsatz kommen. Vor allem die pathogenen *E. coli* bergen als lebensmittelassoziierte Erreger das meiste Potenzial für schwere Krankheitsverläufe bei Menschen und Tieren. Es wäre außerdem sinnvoll Kombinationen von Bakteriozinen zu finden, welche nicht nur *E. coli*, sondern auch andere Bakteriengattungen der Familie der *Enterobacteriaceae* reduzieren. Erste Erfolge wurden bereits beim kombinierten Einsatz von Colizinen und Salmocinen erzielt (Hahn-Lobmann et al. 2019). Außerdem sollte getestet werden, ob das Versuchsmodell zur Zellzahlreduktion auch auf andere Matrices übertragbar ist. Auf molekularer Ebene sollten vor allem die Mechanismen und Wechselwirkungen von Colizinen und Mikrozininen mit verschiedenen Matrices untersucht werden. Generell zeigt die vorliegende Arbeit, dass sich der Einsatz von Bakteriozinen bei Lagerungstemperaturen von 4°C am besten eignet. Bevor Bakteriozine jedoch zum Einsatz im Lebensmittel zugelassen werden können, muss eine Toxizität für den Menschen ausgeschlossen werden. Dies beinhaltet auch die Ermittlung einer maximalen täglichen Einnahmedosis. Des Weiteren sollten sich sensorische Untersuchungen anschließen. Es ist nicht ausgeschlossen, dass Bakteriozine den Geschmack oder die Farbe des Lebensmittels beeinflussen. Generell sind Bakteriozine als Lebensmittelzusatzstoff vielversprechend, da sie beim Erhitzen zerstört werden und es zusätzlich zu einer Zersetzung bzw. einem Abbau durch die Magensäure und entsprechenden Enzyme kommt. Die GRAS-Studie GRN 676 (2016) ermittelte bereits die natürliche Exposition des Menschen gegenüber Colizinen, welche ubiquitär in der Umwelt, im Darmtrakt des Menschen oder in Lebensmitteln vorkommen. Es wurde die Colizin-Menge berechnet, welche sich der Verbraucher bei einem regelmäßigen Konsum von mit Colizinen-behandelten Fleischerzeugnissen aussetzen würde, sollte das Produkt nicht ausreichend erhitzt werden.

Bestimmte Colizine besitzen in den USA bereits einen GRAS-Status. Dies lässt hoffen, dass Colizine in naher Zukunft auch eine Zulassung in der EU als Zusatzstoff bekommen können.

6. Zusammenfassung

Reduktion von *Escherichia coli* durch den Einsatz von Bakteriozinen

Mit pathogenen Mikroorganismen kontaminierte Lebensmittel können zu schwerwiegenden Erkrankungen führen und stellen ein Risiko für den Verbraucher dar. Dabei haben vor allem Lebensmittel tierischen Ursprungs ein hohes Übertragungspotential von Lebensmittelerregern auf den Menschen. Lebensmittelassoziierte Krankheitserreger wie *Escherichia (E.) coli* spielen eine bedeutende Rolle als Verursacher von Lebensmittelinfektionen beim Menschen. Durch den zunehmenden Einsatz von Antibiotika zur Bekämpfung bakterieller Infektionen wird die Entwicklung von Resistenzen gefördert. Bakteriozine stellen als antimikrobielle Proteine eine vielversprechende Alternative dar, weil sie nicht toxisch auf eukaryotische Zellen wirken und ubiquitär in der Umwelt und somit auch natürlicherweise im Lebensmittel vorkommen. Die von *E. coli* produzierten Colizine und Mikroazine gelten als große Hoffnung pathogene *E. coli* im Lebensmittel zu reduzieren.

Ziel dieser Arbeit war es, *E. coli*-Isolate aus Lebensmittelproben auf das Vorhandensein von Bakteriozinen im Spot-Assay zu untersuchen und die Bakteriozinbildner anschließend weitestgehend zu charakterisieren. Dafür wurde mittels PCR zum einen auf das Vorhandensein bekannter Colizin- und Mikrozin-Gene und zum anderen die Einteilung der Isolate in bestimmte Phylogruppen untersucht. Darüber hinaus erfolgte eine Bestimmung des Molekulargewichtes der Bakteriozinextrakte mittels SDS-PAGE. Mittels Zellzahlreduktionsversuchen wurde der Einsatz von Colizinen im Nährmedium und im Lebensmittel untersucht.

Aus verschiedenen Lebensmittelamatrixen konnte bei 97,5 % der Proben *E. coli* isoliert und mittels MALDI-TOF MS-Analyse bestätigt werden. Dabei wurden 51,3 % der *E. coli*-Isolate aus Fleisch isoliert. Mindestens einen Referenzstamm lysierten 52,5 % der isolierten *E. coli* im Spot-Assay, wobei der Referenzstamm *E. coli* K-12 DH5 α die höchste Sensitivität aufwies. Die Colizin-Gene B, E7 und Ia konnten am häufigsten bei den untersuchten lysierenden *E. coli*-Isolaten aus Lebensmitteln nachgewiesen werden. Die *E. coli*-Isolate wurden überwiegend den Phylogruppen A (37,5 %) und B1 (36,3 %) zugeordnet. Neun der 33 untersuchten Proteinextrakte zeigten eine Lyse-Bande zwischen 55 und 75 kDa auf dem Overlay-Agar des inkubierten SDS-Gels.

Nach Detektion von Bakteriozinbildnern und Charakterisierung der Bakteriozine, wurde ein Bakteriozin-Konzentrat hergestellt. In Versuchen wurde anschließend ermittelt, ob dieses

Konzentrat in der Lage ist, den Referenzstamm *E. coli* K-12 DH5 α unter definierten Bedingungen zu reduzieren.

Das Konzentrat wurde aus der Übernachtskultur des *E. coli* 2116-Isolates hergestellt. Das Isolat wies Gene für die Colizine E2 und K sowie für das Mikrozin B17 auf. Die *E. coli* 2116 Übernachtskultur wurde mittels Tangentialflussfiltration bei einem Cut Off von 100 kDa filtriert und bei einem Cut Off von 30 kDa aufkonzentriert. Nach unmittelbarer Zugabe des *E. coli* 2116-Konzentrats konnte die Zellzahl von *E. coli* K-12 DH5 α von 10^7 KbE/ml sowohl bei 37°C als auch bei 4°C-Umgebungstemperatur um sechs Log-Stufen reduziert werden. Bei 37°C Umgebungstemperatur stieg die Zellzahl innerhalb von 24 h wieder auf 10^8 KbE/ml an. Bei 4°C Umgebungstemperatur blieb die Zellzahl über die Gesamtversuchsdauer konstant bei 10^1 KbE/ml. Der Einsatz von Bakteriozinen zur Reduktion von *E. coli*-Zellzahlen ist im Nährmedium bei einer Umgebungstemperatur von 4°C gut geeignet. Bei der Zugabe von *E. coli* 2116-Konzentrat zu Hackfleisch kam es abhängig vom eingesetzten Volumen des Konzentrates zu Reduktionen von einer Log-Stufe bis unterhalb der Nachweisgrenze. Je höher verdünnt das Konzentrat eingesetzt wird, desto weniger Bakteriozine sind im Ansatz vorhanden, weshalb die Reduktion schwacher ausfällt. Vermutlich kommt es zusätzlich zu Wechselwirkungen zwischen Bakteriozinen und Bestandteilen des Fleisches. Für zukünftige Versuche sollten deshalb verschiedene Bakteriozinkonzentrate auf unterschiedlichen Lebensmittelmatrices getestet werden. Außerdem sollten Versuche durchgeführt werden, welche die Mechanismen und Wechselwirkungen zwischen Bakteriozinen und verschiedenen Matrices genauer untersuchen.

7. Summary

Reduction of *Escherichia coli* by bacteriocins

Contaminated food containing pathogenic microorganisms can lead to serious illnesses and pose a risk for consumers. Food of animal origin has a high transmission potential for food pathogens. Food-related pathogens such as *Escherichia (E.) coli* play an important role in causing food infections in humans. This has resulted in an increasing use of antibiotics which led to a higher rate of antibiotic resistance. Bacteriocins are antimicrobial proteins produced by bacteria. They are a promising alternative to antibiotics because they lyse their own or closely related species. They have no toxic effects on eukaryotic cells and are ubiquitous in the environment and therefore naturally present in food. Colicins and microcins, produced by *E. coli*, are a promising alternative to reduce pathogenic *E. coli* in food.

The aim of this study was to examine *E. coli* isolates from food samples for their ability to produce bacteriocins. The bacteriocin production was tested in a spot assay and the bacteriocin producers were then further characterized by PCR for the presence of known colicin and microcin genes. Furthermore, a phylogroup determination was carried out by PCR and the molecular weight of the bacteriocin extracts was determined by SDS-PAGE.

E. coli was isolated from different food matrices and 97,5 % of the isolates were confirmed by MALDI-TOF MS analysis. Most of the isolates (51,3 %) were found in meat samples. At least one reference strain was lysed bei 52,5 % of the *E. coli* isolates in the spot assay, in which the reference strain *E. coli* K-12 DH5 α showed the highest sensitivity. The colicin genes B, E7 and Ia were the most frequently detected genes and the *E. coli* isolates were mainly assigned to phylogroups A (37,5 %) and B1 (36,3 %). Nine out of 33 protein extracts showed a lysis band between 55 and 75 kDa on the overlay agar of the incubated SDS-PAGE-gel.

After the detection of bacteriocin producers and characterization of the bacteriocins, a bacteriocin concentrate was produced. Tests were then carried out to determine whether this concentrate is able to reduce the reference strain *E. coli* K-12 DH5 α defined conditions.

The concentrate was prepared from the overnight culture of the *E. coli* 2116 isolate. The isolate showed genes for the colicins E2 and K as well as for the microcin B17.

The *E. coli* 2116 overnight culture was filtered by tangential flow filtration at a cut off of 100 kDa and concentrated at a cut off of 30 kDa in order to obtain the colicin concentrate. After the immediate application of the *E. coli* 2116 colicin concentrate, the cell number of *E. coli* K-12 DH5 α (10^7 CFU/ml) was reduced by six log units at 37°C and at 4°C. At 37°C, the cell number

increased again within 24 h to 10^8 CFU/ml. At 4°C, the cell number remained constant at 10^1 CFU/ml for the entire test period. The usage of bacteriocins to reduce *E. coli* cell numbers in culture medium is possible at storage temperatures around 4°C. Using *E. coli* 2116 colicin concentrate in minced meat led to a reduction from one log unit till a reduction below the detection limit. The effect was dependent on the applied volume of the *E. coli* 2116 colicin concentrate. The more diluted the concentrate is being used, the fewer bacteriocins might be available. It is reasonable to assume that there might be interactions between bacteriocins and meat components. In future studies, different bacteriocin concentrates should be tested on various food matrices. Furthermore, their mechanisms and interactions with food matrices should be examined in detail.

8. Literaturverzeichnis

Primärliteratur:

Abbott, J. D. and J. M. Graham (1961):

Colicine typing of *Shigella sonnei*.

Mon Bull Minist Health Public Health Lab Serv 20: 51-58.

Akutsu, A., H. Masaki and T. Ohta (1989):

Molecular structure and immunity specificity of colicin E6, an evolutionary intermediate between E-group colicins and cloacin DF13.

J Bacteriol 171: 6430-6436. DOI: 10.1128/jb.171.12.6430-6436.1989.

Ayodele, O. A., A. M. Deji-Agboola, P. A. Akinduti and A. O. Faneye (2020):

Phylo-diversity of prevalent human *E. coli* O157:H7 with strains from retailed meat and fish in selected markets in Ibadan Nigeria.

J Immunoassay Immunochem 41: 117-131. DOI: 10.1080/15321819.2019.1694942.

Babasaki, K., T. Takao, Y. Shimonishi and K. Kurahashi (1985):

Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis.

J Biochem 98: 585-603. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135315.

Balciunas, E. M., F. A. C. Martinez, S. D. Todorov, B. D. G. D. M. Franco, A. Converti and R. P. D. Oliveira (2013):

Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review.

Food Control 32: 134-142. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.11.025.

Ben-Gurion, R. and I. Hertman (1958):

Bacteriocin-like material produced by *Pasteurella pestis*.

J Gen Microbiol 19: 289-297. DOI: 10.1099/00221287-19-2-289.

Bosak, J., M. Hrala, V. Pirkova, L. Micenkova, A. Cizek, J. Smola, D. Kucerova, Z. Vackova, E. Budinska, I. Kolackova and D. Smajs (2019):

Porcine pathogenic *Escherichia coli* strains differ from human fecal strains in occurrence of bacteriocin types.

Vet Microbiol 232: 121-127. DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.04.003.

Boss, R. and J. Hummerjohann (2019):

Whole Genome Sequencing Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Flour from Swiss Retail Markets.

J Food Prot 82: 1398-1404. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-18-593.

Bradley, D. E. (1991):

Colicins G and H and their host strains.

Can J Microbiol 37: 751-757. DOI: 10.1139/m91-129.

Bradley, D. E. and S. P. Howard (1992):

A new colicin that adsorbs to outer-membrane protein Tsx but is dependent on the tonB instead of the tolQ membrane transport system.

J Gen Microbiol 138: 2721-2724. DOI: 10.1099/00221287-138-12-2721.

Calcuttawala, F., C. Hariharan, G. P. Pazhani, S. Ghosh and T. Ramamurthy (2015):

Activity spectrum of colicins produced by *Shigella sonnei* and genetic mechanism of colicin resistance in conspecific *S. sonnei* strains and *Escherichia coli*.

Antimicrob Agents Chemother 59: 152-158. DOI: 10.1128/AAC.04122-14.

Cascales, E., S. K. Buchanan, D. Duche, C. Kleanthous, R. Lloubes, K. Postle, M. Riley, S. Slatin and D. Cavard (2007):

Colicin biology.

Microbiol Mol Biol Rev 71: 158-229. DOI: 10.1128/MMBR.00036-06.

Chak, K. F., W. S. Kuo, F. M. Lu and R. James (1991):

Cloning and characterization of the ColE7 plasmid.

J Gen Microbiol 137: 91-100. DOI: 10.1099/00221287-137-1-91.

Chan, P. T., H. Ohmori, J. Tomizawa and J. Lebowitz (1985):

Nucleotide sequence and gene organization of ColE1 DNA.

J Biol Chem 260: 8925-8935.

Chatterjee, S., S. Chatterjee, S. J. Lad, M. S. Phansalkar, R. H. Rupp, B. N. Ganguli, H. W. Fehlhaber and H. Kogler (1992):

Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. Fermentation, isolation, purification and chemical characterization.

J Antibiot (Tokyo) 45: 832-838. DOI: 10.7164/antibiotics.45.832.

Chaudhari, S. P., J. G. Tiwari and P. Roychoudhury (2007):

Occurrence of *Escherichia coli* in smoked meat.

Indian Journal of Animal Sciences 77: 442-445.

Clermont, O., S. Bonacorsi and E. Bingen (2000):

Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group.

Appl Environ Microbiol 66: 4555-4558.

Clermont, O., S. Bonacorsi and E. Bingen (2004):

Characterization of an anonymous molecular marker strongly linked to *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis.

J Clin Microbiol 42: 1770-1772. DOI: 10.1128/jcm.42.4.1770-1772.2004.

Clermont, O., J. K. Christenson, E. Denamur and D. M. Gordon (2013):

The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups.

Environ Microbiol Rep 5: 58-65. DOI: 10.1111/1758-2229.12019.

Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes and M. L. Chikindas (2001):

Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation.

Int J Food Microbiol 71: 1-20. DOI: 10.1016/s0168-1605(01)00560-8.

Cole, S. T., B. Saint-Joanis and A. P. Pugsley (1985):

Molecular characterisation of the colicin E2 operon and identification of its products.

Mol Gen Genet 198: 465-472. DOI: 10.1007/BF00332940.

Collin, F., R. E. Thompson, K. A. Jolliffe, R. J. Payne and A. Maxwell (2013):

Fragments of the bacterial toxin microcin B17 as gyrase poisons.

PLoS One 8: e61459. DOI: 10.1371/journal.pone.0061459.

Cooper, P. C. and R. James (1984):

Two new E colicins, E8 and E9, produced by a strain of *Escherichia coli*.

J Gen Microbiol 130: 209-215. DOI: 10.1099/00221287-130-1-209.

Corsini, G., E. Karahanian, M. Tello, K. Fernandez, D. Rivero, J. M. Saavedra and A. Ferrer (2010):

Purification and characterization of the antimicrobial peptide microcin N.

FEMS Microbiol Lett 312: 119-125. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02106.x.

Cursino, L., J. Smarda, E. Chartone-Souza and A. M. A. Nascimento (2002):

Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae.

Brazilian Journal of Microbiology 33: 185-195.

Davies, E. A., H. E. Bevis and J. DelvesBroughton (1997):

The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*.

Letters in Applied Microbiology 24: 343-346. DOI: DOI 10.1046/j.1472-765X.1997.00145.x.

Duquesne, S., D. Destoumieux-Garzon, J. Peduzzi and S. Rebuffat (2007a):

Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria.

Nat Prod Rep 24: 708-734. DOI: 10.1039/b516237h.

Duquesne, S., V. Petit, J. Peduzzi and S. Rebuffat (2007b):

Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria.

J Mol Microbiol Biotechnol 13: 200-209. DOI: 10.1159/000104748.

Fath, M. J., L. H. Zhang, J. Rush and R. Kolter (1994):

Purification and characterization of colicin V from *Escherichia coli* culture supernatants.

Biochemistry 33: 6911-6917. DOI: 10.1021/bi00188a021.

Feldgarden, M. and M. A. Riley (1998):

High Levels of Colicin Resistance in *Escherichia Coli*.

Evolution 52: 1270-1276. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1998.tb02008.x.

Ferreira, M. A. S. S. and B. M. Lund (1996):

The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese.

Letters in Applied Microbiology 22: 433-438. DOI: DOI 10.1111/j.1472-765X.1996.tb01197.x.

Field, D., M. Begley, P. M. O'Connor, K. M. Daly, F. Hugenholtz, P. D. Cotter, C. Hill and R. P. Ross (2012):

Bioengineered nisin A derivatives with enhanced activity against both Gram positive and Gram negative pathogens.

PLoS One 7: e46884. DOI: 10.1371/journal.pone.0046884.

- Flynn, S., D. van Sinderen, G. M. Thornton, H. Holo, I. F. Nes and J. K. Collins (2002):
Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118.
Microbiology 148: 973-984. DOI: 10.1099/00221287-148-4-973.
- Foulds, J. D. and D. Shemin (1969):
Properties and characteristics of a bacteriocin from *Serratia marcescens*.
J Bacteriol 99: 655-660. DOI: 10.1128/JB.99.3.655-660.1969.
- Fredericq, P. (1948):
Independance des mutations interessant les recepteurs d'antibiose chez les enterobacteriacees.
C R Seances Soc Biol Fil 142: 855.
- Fredericq, P. (1951):
[Origin of mutants of *E. coli* V producing colicine M].
C R Seances Soc Biol Fil 145: 930-933.
- Fremaux, C., C. Ahn and T. R. Klaenhammer (1993):
Molecular analysis of the lactacin F operon.
Appl Environ Microbiol 59: 3906-3915. DOI: 10.1128/AEM.59.11.3906-3915.1993.
- Ghazaryan, L., L. Tonoyan, A. A. Ashhab, M. I. Soares and O. Gillor (2014):
The role of stress in colicin regulation.
Arch Microbiol 196: 753-764. DOI: 10.1007/s00203-014-1017-8.
- Gillor, O., J. A. Vriezen and M. A. Riley (2008):
The role of SOS boxes in enteric bacteriocin regulation.
Microbiology 154: 1783-1792. DOI: 10.1099/mic.0.2007/016139-0.
- Gleba, Y. Y., D. Tuse and A. Giritch (2014):
Plant Viral Vectors for Delivery by *Agrobacterium*.
Plant Viral Vectors 375: 155-192. DOI: 10.1007/82_2013_352.
- Gordon, D. M., O. Clermont, H. Tolley and E. Denamur (2008):
Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method.

Environ Microbiol 10: 2484-2496. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01669.x.

Gordon, D. M. and C. L. O'Brien (2006):

Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*.

Microbiology 152: 3239-3244. DOI: 10.1099/mic.0.28690-0.

Guasch, J. F., J. Enfedaque, S. Ferrer, D. Gargallo and M. Regue (1995):

Bacteriocin 28b, a chromosomally encoded bacteriocin produced by most *Serratia marcescens* biotypes.

Res Microbiol 146: 477-483. DOI: 10.1016/0923-2508(96)80293-2.

Güllüce, M., M. Karadayı and Ö. Bariş (2013):

Bacteriocins: Promising Natural Antimicrobials.

Gupta B, G. S., Gill, JPS (2013):

Incidence and virulence properties of *E. coli* isolated from fresh fish and ready-to-eat fish products.

Vet World; 6:5–9.

Hahn-Lobmann, S., A. Stephan, S. Schulz, T. Schneider, A. Shaverskyi, D. Tuse, A. Giritch and Y. Gleba (2019):

Colicins and Salmocins - New Classes of Plant-Made Non-antibiotic Food Antibacterials.

Frontiers in Plant Science 10. DOI: ARTN 437

10.3389/fpls.2019.00437.

Hamon, Y. and Y. Peron (1964):

[Description of 7 New Types of Colicines. Current Status of the Classification of These Antibiotics].

Ann Inst Pasteur (Paris) 107: 44-54.

Hamon, Y. and Y. Peron (1974):

[Study of the tensio-active power of some proteins-bacteriocins].

C R Acad Hebd Seances Acad Sci D 278: 2489-2492.

Harada, T., M. Taguchi, R. Kawahara, M. Kanki and K. Kawatsu (2018):

Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Bacterial Pathogens in Ready-to-Eat Foods Retailed in Osaka Prefecture, Japan.

J Food Prot 81: 1450-1458. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-18-035.

Harendza, S. (2011):

"HUS diary" of a German nephrologist during the current EHEC outbreak in Europe.

Kidney Int 80: 687-689. DOI: 10.1038/ki.2011.238.

Hauduroy, P. and J. Papavassiliou (1962):

Identification of a new type of colicine (colicine L).

Nature 195: 730-732. DOI: 10.1038/195730a0.

Henderson, J. T., A. L. Chopko and P. D. van Wassenaar (1992):

Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0.

Arch Biochem Biophys 295: 5-12. DOI: 10.1016/0003-9861(92)90480-k.

Holo, H., O. Nilssen and I. F. Nes (1991):

Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene.

J Bacteriol 173: 3879-3887. DOI: 10.1128/jb.173.12.3879-3887.1991.

Hussein, M. A., A. M. A. Merwad, M. T. Elabbasy, I. I. A. Suelam, A. M. Abdelwahab and M. A. Taha (2019):

Prevalence of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* in Fish in Egypt: Quality Parameters and Public Health Hazard.

Vector Borne Zoonotic Dis 19: 255-264. DOI: 10.1089/vbz.2018.2346.

Hwang, J., M. Manuvakhova and P. C. Tai (1997):

Characterization of in-frame proteins encoded by *cvaA*, an essential gene in the colicin V secretion system: CvaA* stabilizes CvaA to enhance secretion.

J Bacteriol 179: 689-696. DOI: 10.1128/jb.179.3.689-696.1997.

Jack, R. W. and G. Jung (2000):

Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chemical diversity.

Curr Opin Chem Biol 4: 310-317.

Jakes, K. and N. D. Zinder (1974):

Stimulation of in vitro colicin E3 action by messenger ribonucleic acid and message analogs.

J Biol Chem 249: 5507-5512.

James, R., M. Jarvis and D. F. Barker (1987):

Nucleotide sequence of the immunity and lysis region of the ColE9-J plasmid.

J Gen Microbiol 133: 1553-1562. DOI: 10.1099/00221287-133-6-1553.

Joerger, M. C. and T. R. Klaenhammer (1990):

Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J.

J Bacteriol 172: 6339-6347. DOI: 10.1128/jb.172.11.6339-6347.1990.

Kagambega, A., K. Haukka, A. Siitonen, A. S. Traore and N. Barro (2011):

Prevalence of *Salmonella enterica* and the hygienic indicator *Escherichia coli* in raw meat at markets in Ouagadougou, Burkina Faso.

J Food Prot 74: 1547-1551. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-11-124.

Kleanthous, C. (2010):

Swimming against the tide: progress and challenges in our understanding of colicin translocation.

Nat Rev Microbiol 8: 843-848. DOI: 10.1038/nrmicro2454.

Kleanthous, C. and D. Walker (2001):

Immunity proteins: enzyme inhibitors that avoid the active site.

Trends in Biochemical Sciences 26: 624-631. DOI: Doi 10.1016/S0968-0004(01)01941-7.

Konisky, J. and F. M. Richards (1970):

Characterization of colicin Ia and colicin Ib. Purification and some physical properties.

J Biol Chem 245: 2972-2978.

Laemmli, U. K. (1970):

Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4.

Nature 227: 680+. DOI: DOI 10.1038/227680a0.

Lau, P. C. and J. A. Condie (1989):

Nucleotide sequences from the colicin E5, E6 and E9 operons: presence of a degenerate transposon-like structure in the ColE9-J plasmid.

Mol Gen Genet 217: 269-277. DOI: 10.1007/BF02464892.

Leistner, L. (1992):

Food Preservation by Combined Methods.

Food Research International 25: 151-158. DOI: Doi 10.1016/0963-9969(92)90158-2.

Lescat, M., O. Clermont, P. L. Woerther, J. Glodt, S. Dion, D. Skurnik, F. Djossou, C. Dupont, G. Perroz, B. Picard, F. Catzeflis, A. Andremont and E. Denamur (2013):

Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host-dependant population structure.

Environ Microbiol Rep 5: 49-57. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2012.00374.x.

Liu, W. and J. N. Hansen (1990):

Some Chemical and Physical-Properties of Nisin, a Small-Protein Antibiotic Produced by *Lactococcus-Lactis*.

Applied and Environmental Microbiology 56: 2551-2558.

Males, B. M. and B. A. Stocker (1980):

Escherichia coli K317, formerly used to define colicin group E2, produces colicin E7, is immune to colicin E2, and carries a bacteriophage-restricting conjugative plasmid.

J Bacteriol 144: 524-531. DOI: 10.1128/JB.144.2.524-531.1980.

Males, B. M. and B. A. Stocker (1982):

Colicins E4, E5, E6 and A and properties of *btuB*⁺ colicinogenic transconjugants.

J Gen Microbiol 128: 95-106. DOI: 10.1099/00221287-128-1-95.

Martin-Visscher, L. A., M. J. van Belkum, S. Garneau-Tsodikova, R. M. Whittall, J. Zheng, L. M. McMullen and J. C. Vederas (2008):

Isolation and characterization of carnocyclin a, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307.

Appl Environ Microbiol 74: 4756-4763. DOI: 10.1128/AEM.00817-08.

Martinez, J. L. and J. C. Perez-Diaz (1986):

Isolation, characterization, and mode of action on *Escherichia coli* strains of microcin D93.

Antimicrob Agents Chemother 29: 456-460.

Maslowska, K. H., K. Makiela-Dzvenska and I. J. Fijalkowska (2019):

The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage.

Environ Mol Mutagen 60: 368-384. DOI: 10.1002/em.22267.

Meindl, K., T. Schmiederer, K. Schneider, A. Reicke, D. Butz, S. Keller, H. Guhring, L. Vertesy, J. Wink, H. Hoffmann, M. Bronstrup, G. M. Sheldrick and R. D. Sussmuth (2010):

Labyrinthopeptins: a new class of carbacyclic lantibiotics.

Angew Chem Int Ed Engl 49: 1151-1154. DOI: 10.1002/anie.200905773.

Metlitskaya, A., T. Kazakov, G. H. Vondenhoff, M. Novikova, A. Shashkov, T. Zatsepin, E. Semenova, N. Zaitseva, V. Ramensky, A. Van Aerschot and K. Severinov (2009):

Maturation of the translation inhibitor microcin C.

J Bacteriol 191: 2380-2387. DOI: 10.1128/JB.00999-08.

Micenkova, L., J. Bosak, B. Staudova, D. Kohoutova, D. Cejkova, V. Woznicova, M. Vrba, A. Sevcikova, J. Bures and D. Smajs (2016a):

Microcin determinants are associated with B2 phylogroup of human fecal *Escherichia coli* isolates.

Microbiologyopen 5: 490-498. DOI: 10.1002/mbo3.345.

Micenkova, L., J. Bosak, M. Vrba, A. Sevcikova and D. Smajs (2016b):

Human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains differ in prevalence of virulence factors, phylogroups, and bacteriocin determinants.

BMC Microbiol 16: 218. DOI: 10.1186/s12866-016-0835-z.

Micenkova, L., B. Staudova, J. Bosak, L. Mikalova, S. Littnerova, M. Vrba, A. Sevcikova, V. Woznicova and D. Smajs (2014):

Bacteriocin-encoding genes and ExPEC virulence determinants are associated in human fecal *Escherichia coli* strains.

BMC Microbiol 14: 109. DOI: 10.1186/1471-2180-14-109.

Mirzarazi, M., S. E. Rezatofghi, M. Pourmahdi and M. R. Mohajeri (2015):

Occurrence of genes encoding enterotoxins in uropathogenic *Escherichia coli* isolates.

Braz J Microbiol 46: 155-159. DOI: 10.1590/S1517-838246120130860.

Morlon, J., R. Lloubes, S. Varenne, M. Chartier and C. Lazdunski (1983):

Complete nucleotide sequence of the structural gene for colicin A, a gene translated at non-uniform rate.

J Mol Biol 170: 271-285. DOI: 10.1016/s0022-2836(83)80148-x.

Mulders, J. W., I. J. Boerrigter, H. S. Rollema, R. J. Siezen and W. M. de Vos (1991):

Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant.

Eur J Biochem 201: 581-584. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16317.x.

Muller, E. and F. Radler (1993):

Caseicin, a bacteriocin from *Lactobacillus casei*.

Folia Microbiol (Praha) 38: 441-446. DOI: 10.1007/BF02814392.

Murugaiyan, J., B. Walther, I. Stamm, Y. Abou-Elnaga, S. Brueggemann-Schwarze, S. Vincze, L. H. Wieler, A. Lubke-Becker, T. Semmler and U. Roesler (2014):

Species differentiation within the *Staphylococcus intermedius* group using a refined MALDI-TOF MS database.

Clin Microbiol Infect 20: 1007-1015. DOI: 10.1111/1469-0691.12662.

Myoda, S. P., S. Gilbreth, D. Akins-Leventhal, S. K. Davidson and M. Samadpour (2019):

Occurrence and Levels of Salmonella, Enterohemorrhagic Escherichia coli, and Listeria in Raw Wheat.

J Food Prot 82: 1022-1027. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-18-345.

Neil, K. P., G. Biggerstaff, J. K. MacDonald, E. Trees, C. Medus, K. A. Musser, S. G. Stroika, D. Zink and M. J. Sotir (2012):

A novel vehicle for transmission of *Escherichia coli* O157:H7 to humans: multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with consumption of ready-to-bake commercial prepackaged cookie dough--United States, 2009.

Clin Infect Dis 54: 511-518. DOI: 10.1093/cid/cir831.

Nilsen, T., I. F. Nes and H. Holo (2003):

Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333.

Appl Environ Microbiol 69: 2975-2984. DOI: 10.1128/aem.69.5.2975-2984.2003.

Olschlager, T. and V. Braun (1987):

Sequence, expression, and localization of the immunity protein for colicin M.

J Bacteriol 169: 4765-4769. DOI: 10.1128/jb.169.10.4765-4769.1987.

Olschlager, T., A. Turba and V. Braun (1991):

Binding of the Immunity Protein Inactivates Colicin-M.

Molecular Microbiology 5: 1105-1111. DOI: DOI 10.1111/j.1365-2958.1991.tb01883.x.

Pao, S., M. R. Ettinger, M. F. Khalid, A. O. Reid and B. L. Nerrie (2008):

Microbial quality of raw aquacultured fish fillets procured from Internet and local retail markets.

J Food Prot 71: 1544-1549. DOI: 10.4315/0362-028x-71.8.1544.

Petersen, K. E. and W. O. James (1998):

Agents, vehicles, and causal inference in bacterial foodborne disease outbreaks: 82 reports (1986-1995).

J Am Vet Med Assoc 212: 1874-1881.

Phillips, D., D. Jordan, S. Morris, I. Jenson and J. Sumner (2008):

A national survey of the microbiological quality of retail raw meats in Australia.

J Food Prot 71: 1232-1236. DOI: 10.4315/0362-028x-71.6.1232.

Picard, B., J. S. Garcia, S. Gouriou, P. Duriez, N. Brahimi, E. Bingen, J. Elion and E. Denamur (1999):

The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection.

Infect Immun 67: 546-553.

Pilsl, H. and V. Braun (1995a):

Evidence that the immunity protein inactivates colicin 5 immediately prior to the formation of the transmembrane channel.

J Bacteriol 177: 6966-6972. DOI: 10.1128/jb.177.23.6966-6972.1995.

Pilsl, H. and V. Braun (1995b):

Novel colicin 10: assignment of four domains to TonB- and TolC-dependent uptake via the Tsx receptor and to pore formation.

Mol Microbiol 16: 57-67. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02391.x.

Pilsl, H. and V. Braun (1995c):

Strong function-related homology between the pore-forming colicins K and 5.

J Bacteriol 177: 6973-6977. DOI: 10.1128/jb.177.23.6973-6977.1995.

Pilsl, H., H. Killmann, K. Hantke and V. Braun (1996):

Periplasmic location of the pesticin immunity protein suggests inactivation of pesticin in the periplasm.

J Bacteriol 178: 2431-2435. DOI: 10.1128/jb.178.8.2431-2435.1996.

Pons, A. M., F. Delalande, M. Duarte, S. Benoit, I. Lanneluc, S. Sable, A. Van Dorsselaer and G. Cottenceau (2004):

Genetic analysis and complete primary structure of microcin L.

Antimicrob Agents Chemother 48: 505-513.

Pons, A. M., N. Zorn, D. Vignon, F. Delalande, A. Van Dorsselaer and G. Cottenceau (2002):

Microcin E492 is an unmodified peptide related in structure to colicin V.

Antimicrob Agents Chemother 46: 229-230. DOI: 10.1128/aac.46.1.229-230.2002.

Pugsley, A. P. (1987):

Nucleotide sequencing of the structural gene for colicin N reveals homology between the catalytic, C-terminal domains of colicins A and N.

Mol Microbiol 1: 317-325. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1987.tb01938.x.

Pugsley, A. P. (1988):

The immunity and lysis genes of ColN plasmid pCHAP4.

Mol Gen Genet 211: 335-341. DOI: 10.1007/BF00330613.

Ranjbar, R., F. Safarpour Dehkordi, M. H. Sakhaei Shahreza and E. Rahimi (2018):

Prevalence, identification of virulence factors, O-serogroups and antibiotic resistance properties of Shiga-toxin producing Escherichia coli strains isolated from raw milk and traditional dairy products.

Antimicrob Resist Infect Control 7: 53. DOI: 10.1186/s13756-018-0345-x.

Rebuffat, S. (2012):

Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria.

Biochem Soc Trans 40: 1456-1462. DOI: 10.1042/BST20120183.

Richter, L., E. D. Plessis, S. Duvenage and L. Korsten (2021):

High prevalence of multidrug resistant Escherichia coli isolated from fresh vegetables sold by selected formal and informal traders in the most densely populated Province of South Africa.

J Food Sci 86: 161-168. DOI: 10.1111/1750-3841.15534.

Roos, U., R. E. Harkness and V. Braun (1989):

Assembly of colicin genes from a few DNA fragments. Nucleotide sequence of colicin D.

Mol Microbiol 3: 891-902. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1989.tb00238.x.

Samyn, B., M. Martinez-Bueno, B. Devreese, M. Maqueda, A. Galvez, E. Valdivia, J. Coyette and J. Van Beeumen (1994):

The cyclic structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48.

FEBS Lett 352: 87-90. DOI: 10.1016/0014-5793(94)00925-2.

Sandiford, S. and M. Upton (2012):

Identification, characterization, and recombinant expression of epidermicin NI01, a novel unmodified bacteriocin produced by Staphylococcus epidermidis that displays potent activity against Staphylococci.

Antimicrob Agents Chemother 56: 1539-1547. DOI: 10.1128/AAC.05397-11.

Santos, A. C., A. C. Zidko, A. C. Pignatari and R. M. Silva (2013):

Assessing the diversity of the virulence potential of *Escherichia coli* isolated from bacteremia in Sao Paulo, Brazil.

Braz J Med Biol Res 46: 968-973. DOI: 10.1590/1414-431X20133184.

Schamberger, G. P. and F. Diez-Gonzalez (2002):

Selection of recently isolated colicinogenic *Escherichia coli* strains inhibitory to *Escherichia coli* O157:H7.

J Food Prot 65: 1381-1387. DOI: 10.4315/0362-028x-65.9.1381.

Schneider, T., S. Hahn-Lobmann, A. Stephan, S. Schulz, A. Giritch, M. Naumann, M. Kleinschmidt, D. Tuse and Y. Gleba (2018):

Plant-made *Salmonella* bacteriocins salmocins for control of *Salmonella* pathovars.

Sci Rep 8: 4078. DOI: 10.1038/s41598-018-22465-9.

Schramm, E., J. Mende, V. Braun and R. M. Kamp (1987):

Nucleotide sequence of the colicin B activity gene *cba*: consensus pentapeptide among TonB-dependent colicins and receptors.

J Bacteriol 169: 3350-3357. DOI: 10.1128/jb.169.7.3350-3357.1987.

Schroeder, C. M., D. G. White and J. H. Meng (2004):

Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*.

Food Microbiology 21: 249-255. DOI: 10.1016/S0740-0020(03)00074-1.

Schulz, S., A. Stephan, S. Hahn, L. Bortesi, F. Jarczowski, U. Bettmann, A. K. Paschke, D. Tuse, C. H. Stahl, A. Giritch and Y. Gleba (2015):

Broad and efficient control of major foodborne pathogenic strains of *Escherichia coli* by mixtures of plant-produced colicins.

Proc Natl Acad Sci U S A 112: E5454-5460. DOI: 10.1073/pnas.1513311112.

Severinov, K., E. Semenova, A. Kazakov, T. Kazakov and M. S. Gelfand (2007):

Low-molecular-weight post-translationally modified microcins.

Molecular Microbiology 65: 1380-1394. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05874.x.

Smajs, D., L. Micenkova, J. Smarda, M. Vrba, A. Sevcikova, Z. Valisova and V. Woznicova (2010):

Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor.

BMC Microbiol 10: 288. DOI: 10.1186/1471-2180-10-288.

Smajs, D., H. Pilsl and V. Braun (1997):

Colicin U, a novel colicin produced by *Shigella boydii*.

J Bacteriol 179: 4919-4928. DOI: 10.1128/jb.179.15.4919-4928.1997.

Smarda, J. and V. Obdrzalek (1966):

Colicine Q.

Zentralbl Bakteriolog Orig 200: 493-497.

Smarda, J., J. Petrzalova and B. Vyskot (1987):

Colicin Js of *Shigella sonnei*: classification of type colicin "7".

Zentralbl Bakteriolog Mikrobiolog Hyg A 263: 530-540. DOI: 10.1016/s0176-6724(87)80196-7.

Smarda, J. and D. Smajs (1998):

Colicins--exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*.

Folia Microbiol (Praha) 43: 563-582. DOI: 10.1007/bf02816372.

Soto Beltran, M., C. P. Gerba, A. Porto Fett, J. B. Luchansky and C. Chaidez (2015):

Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from small Mexican retail markets of queso fresco.

Int J Environ Health Res 25: 140-148. DOI: 10.1080/09603123.2014.915016.

Stouthamer, A. H. and G. A. Tjeze (1966):

Bacteriocin production by members of the genus *Klebsiella*.

Antonie Van Leeuwenhoek 32: 171-182. DOI: 10.1007/BF02097457.

Toba, M., H. Masaki and T. Ohta (1988):

Colicin E8, a DNase which indicates an evolutionary relationship between colicins E2 and E3.

J Bacteriol 170: 3237-3242. DOI: 10.1128/jb.170.7.3237-3242.1988.

Tulini, F. L., C. T. Lohans, K. C. Bordon, J. Zheng, E. C. Arantes, J. C. Vederas and E. C. De Martinis (2014):

Purification and characterization of antimicrobial peptides from fish isolate *Carnobacterium maltaromaticum* C2: Carnobacteriocin X and carnolysins A1 and A2.

Int J Food Microbiol 173: 81-88. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.019.

van den Elzen, P. J., H. H. Walters, E. Veltkamp and H. J. Nijkamp (1983):

Molecular structure and function of the bacteriocin gene and bacteriocin protein of plasmid Clo DF13.

Nucleic Acids Res 11: 2465-2477. DOI: 10.1093/nar/11.8.2465.

Vassiliadis, G., D. Destoumieux-Garzon, C. Lombard, S. Rebuffat and J. Peduzzi (2010):
Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47.

Antimicrob Agents Chemother 54: 288-297. DOI: 10.1128/AAC.00744-09.

Viejo, M. B., D. Gargallo, S. Ferrer, J. Enfedaque and M. Regue (1992):
Cloning and DNA sequence analysis of a bacteriocin gene of *Serratia marcescens*.

J Gen Microbiol 138 Pt 8: 1737-1743. DOI: 10.1099/00221287-138-8-1737.

Vorster, S. M., R. P. Greebe and G. L. Nortje (1994):

Incidence of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in Ground Beef, Broilers and Processed Meats in Pretoria, South Africa.

J Food Prot 57: 305-310. DOI: 10.4315/0362-028X-57.4.305.

Waturangi, D. E., F. Hudiono and E. Aliwarga (2019):

Prevalence of pathogenic *Escherichia coli* from salad vegetable and fruits sold in Jakarta.

BMC Res Notes 12: 247. DOI: 10.1186/s13104-019-4284-2.

Werner, S., O. Breus, Y. Symonenko, S. Marillonnet and Y. Gleba (2011):

High-level recombinant protein expression in transgenic plants by using a double-inducible viral vector.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108: 14061-14066. DOI: 10.1073/pnas.1102928108.

Wilson, K. A., M. Kalkum, J. Ottesen, J. Yuzenkova, B. T. Chait, R. Landick, T. Muir, K. Severinov and S. A. Darst (2003):

Structure of microcin J25, a peptide inhibitor of bacterial RNA polymerase, is a lassoed tail.

J Am Chem Soc 125: 12475-12483. DOI: 10.1021/ja036756q.

Wirawan, R. E., N. A. Klesse, R. W. Jack and J. R. Tagg (2006):

Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*.

Appl Environ Microbiol 72: 1148-1156. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1148-1156.2006.

Yagoub, S. O. (2009):

Isolation of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. from Raw Fish Sold in Fish Market in Khartoum State.

Journal of Bacteriology Research, 1, 85-88. .

Yang, S. C., C. H. Lin, C. T. Sung and J. Y. Fang (2014):

Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals.

Front Microbiol 5: 241. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00241.

Yap, M., M. L. Chau, S. H. P. Hartantyo, J. Q. Oh, K. T. Aung, R. A. Gutierrez and L. C. Ng (2019):

Microbial Quality and Safety of Sushi Prepared with Gloved or Bare Hands: Food Handlers' Impact on Retail Food Hygiene and Safety.

J Food Prot 82: 615-622. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-18-349.

Zhao, C., B. Ge, J. De Villena, R. Sudler, E. Yeh, S. Zhao, D. G. White, D. Wagner and J. Meng (2001):

Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area.

Appl Environ Microbiol 67: 5431-5436. DOI: 10.1128/AEM.67.12.5431-5436.2001.

Sekundärliteratur:

BVL (2020): Berichte zur Lebensmittelsicherheit – Zoonosen-Monitoring 2019.

www.bvl.bund.de/ZoonosenMonitoring

Letzter Zugriff am 23.04.2021 um 17:34

Ferdman, Roberto A.

<https://www.washingtonpost.com/news/wonk/wp/2015/08/05/there-are-a-lot-more-cows-in-a-single-hamburger-than-you-realize/?noredirect=on>

Letzter Zugriff 15.07.2020 um 16:45

GRAS Notice (GRN) No. 593, 2015

<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/default.htm>

Letzter Zugriff am 07.01.2020 um 20:23

GRAS Notice (GRN) No. 676, 2016

<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/default.htm>

Letzter Zugriff am 07.01.2020 um 20:23

GRAS Notice (GRN) No. 775, 2017

<https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/gras-notice-inventory>

Letzter Zugriff am 07.01.2020 um 20:25

Robert Koch-Institut. Bericht: Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch, Deutschland 2011. Berlin 2011.

https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/E/EHEC/EHEC_O104/EHEC-Abschlussbericht.pdf

Letzter Zugriff am 03.01.2021 um 15:30

Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten 2018. Jahresstatistik meldepflichtiger Krankheiten nach Bundesland, Deutschland, 2017 und 2018.

https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahresstatistik_2018.pdf?__blob=publicationFile

letzter Zugriff am 03.01.2021, 16:55

Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten 2019. Jahresstatistik meldepflichtiger Krankheiten nach Bundesland, Deutschland, 2018 und 2019.

https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahresstatistik_2019.pdf?__blob=publicationFile

letzter Zugriff am 03.01.2021, 16:57

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073&from=de>

Letzter Zugriff am 15.07.2020 um 15:31

Zusatzstoff-Zulassungsverordnung vom 29. Januar 1998 (BGBl. I S. 230, 231), zuletzt durch Artikel 23 der Verordnung vom 5. Juli 2017 (BGBl. I S. 2272) geändert
https://www.gesetze-im-internet.de/zzulv_1998/BJNR023100998.html
Letzter Zugriff am 30.12.2020 um 18:59

Anhang

Verordnung (EG) Nr 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel L 338/16 und L 338/17

Lebensmittelkategorie	Mikroorganismen	Probenahmeplan ⁽¹⁾		Grenzwerte ⁽²⁾		Analytische Referenzmethode ⁽³⁾	Stufe, für die das Kriterium gilt	Maßnahmen im Fall unbefriedigender Ergebnisse
		n	c	m	M			
2.1.6. Hackfleisch/Faschiertes	Aerobe mesophile Keimzahl (γ)	5	2	5×10^5 KBE/g	5×10^6 KBE/g	ISO 4833	Ende des Herstellungsprozesses	Verbesserungen in der Herstellungshygiene und bei Auswahl und/oder Herkunft der Rohstoffe
	<i>E. coli</i> ⁽⁸⁾	5	2	50 KBE/g	500 KBE/g	ISO 16649-1 oder 2	Ende des Herstellungsprozesses	Verbesserungen in der Herstellungshygiene und bei Auswahl und/oder Herkunft der Rohstoffe
2.1.7. Separatorenfleisch ⁽⁹⁾	Aerobe mesophile Keimzahl	5	2	5×10^5 KBE/g	5×10^6 KBE/g	ISO 4833	Ende des Herstellungsprozesses	Verbesserungen in der Herstellungshygiene und bei Auswahl und/oder Herkunft der Rohstoffe
	<i>E. coli</i> ⁽⁸⁾	5	2	50 KBE/g	500 KBE/g	ISO 16649-1 oder 2	Ende des Herstellungsprozesses	Verbesserungen in der Herstellungshygiene und bei Auswahl und/oder Herkunft der Rohstoffe
2.1.8. Fleischzubereitungen	<i>E. coli</i> ⁽⁸⁾	5	2	500 KBE/g oder cm^2	5 000 KBE/g oder cm^2	ISO 16649-1 oder 2	Ende des Herstellungsprozesses	Verbesserungen in der Herstellungshygiene und bei Auswahl und/oder Herkunft der Rohstoffe

⁽¹⁾ n = Anzahl der Probeneinheiten der Stichprobe; c = Anzahl der Probeneinheiten, deren Werte zwischen m und M liegen.

⁽²⁾ Bei Nummern 2.1.3-2.1.5: m = M

⁽³⁾ Es ist die neueste Fassung der Norm zu verwenden.

⁽⁴⁾ Die Grenzwerte (m und M) gelten nur für im destruktiven Verfahren entnommene Proben. Der tagesdurchschnittliche Log-Wert wird berechnet, indem zunächst ein Log-Wert eines jeden einzelnen Untersuchungsergebnisses ermittelt und dann der Durchschnitt dieser Log-Werte berechnet wird.

⁽⁵⁾ Die 50 Proben sind bei 10 aufeinander folgenden Probenerhebungen gemäß den in dieser Verordnung festgelegten Probenahmenvorschriften und -häufigkeiten zu entnehmen.

⁽⁶⁾ Die Anzahl der Proben, in denen Salmonellen nachgewiesen wurden. Der Wert c ist zu überprüfen, damit die Fortschritte bei der Verringerung der Salmonellenprävalenz berücksichtigt werden können. Mitgliedstaaten oder Regionen mit geringer Salmonellenprävalenz können auch schon vor der Überprüfung geringere c-Werte verwenden.

⁽⁷⁾ Dieses Kriterium gilt nicht für auf Einzelhandelsebene erzeugtes Hackfleisch/Faschiertes, sofern die Haltbarkeitsdauer des Erzeugnisses weniger als 24 Stunden beträgt.

⁽⁸⁾ *E. coli* wird hier als Indikator für fäkale Kontamination verwendet.

⁽⁹⁾ Diese Kriterien gelten für Separatorenfleisch, das mit Hilfe der in Anhang III Abschnitt V Kapitel III Nummer 3 der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs genannten Verfahren hergestellt wurde.

Interpretation der Untersuchungsergebnisse

Die angegebenen Grenzwerte beziehen sich auf jede einzelne untersuchte Probeneinheit, außer auf die Untersuchung von Schlachtkörpern, bei denen sie sich auf die Sammelproben beziehen.

Die Testergebnisse weisen auf die mikrobiologischen Bedingungen des entsprechenden Herstellungsprozesses hin.

Enterobacteriaceae und aerobe mesophile Keimzahl bei Schlachtkörpern von Rindern, Schafen, Ziegen, Pferden und Schweinen:

- befriedigend, sofern der tagesdurchschnittliche Log-Wert $\leq m$ ist,
- akzeptabel, sofern der tagesdurchschnittliche Log-Wert zwischen m und M liegt,
- unbefriedigend, sofern der tagesdurchschnittliche Log-Wert $> M$ ist.

Salmonella in Schlachtkörpern:

- befriedigend, sofern *Salmonella* in höchstens c/n Proben nachgewiesen wird,
- unbefriedigend, sofern *Salmonella* in mehr als c/n Proben nachgewiesen wird.

Nach jeder Probenerhebung werden die Ergebnisse der 10 letzten Probenerhebungen bewertet, um die n Anzahl an Proben zu ermitteln.

E.coli und aerobe mesophile Keimzahl bei Hackfleisch/Faschiertem, Fleischzubereitungen und Separatorenfleisch:

- befriedigend, sofern alle gemessenen Werte $\leq m$ sind,
- akzeptabel, sofern möglichst viele c/n -Werte zwischen m und M liegen und die übrigen Werte $\leq m$ sind,
- unbefriedigend, sofern ein gemessener Wert oder mehrere gemessene Werte $> M$ sind oder mehr als c/n -Werte zwischen m und M liegen.

Publikationen

Veröffentlichungen zum Thema

Rößner, A.; Andrack, J.; Gölz, G.; Forbrig, T.; Seidler, T.; Orquera, S.; Alter, T. (2019 / Poster): Reduction of *Escherichia coli* by colicin concentrate 2116 in media and in minced meat, 12. Doktorandensymposium, FB Veterinärmedizin, FU Berlin, Berlin, Germany

Roessner, A.; Andrack, J.; Gölz, G.; Forbrig, T.; Seidler, T.; Orquera, S.; Alter, T. (2019 / Poster): CFU reduction of *Escherichia coli* by *Escherichia coli* 2116 colicin concentrate in media and in minced meat, Bacteriocins and Antimicrobial Peptides - BAMP2019 Scientific Symposium - 13th International Scientific Conference on Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota and Health - IPC2019, Prague, Czech Republic

Rößner, A.; Andrack, J.; Gölz, G.; Seidler, T.; Forbrig, T.; Alter, T.; Orquera, S. (2018 / Vortrag): Reduction of *Escherichia coli* cell numbers by colicins, National Symposium on Zoonoses Research 2018, Berlin, Germany

Rößner, A.; Andrack, J.; Gölz, G.; Schulze, Y.; Seidler, T.; Forbrig, T.; Alter, T.; Orquera, S. (2018 / Poster): Keimzahlreduktion von *Escherichia coli* durch den Einsatz von Colizinen, 59. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft 2018, Garmisch-Partenkirchen, Germany

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Alter für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene der Freien Universität Berlin anzufertigen. Außerdem danke ich ihm herzlich für die Betreuung dieser Arbeit und die ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre am Institut.

Frau Dr. Stefanie Orquera danke ich für ihre intensive wissenschaftliche Betreuung zu Beginn meiner Arbeit und vor allem dafür mich für diese Thematik begeistert zu haben.

Frau Jennifer Andrack danke ich für ihr immer offenes Ohr, konstruktive Diskussionen, motivierende Worte in Phasen, wo es mal nicht nach Plan verlief und ihre Unterstützung, sowohl praktisch als auch fachlich im Labor. Es hat sehr viel Spaß gemacht die unzähligen Stunden im Labor gemeinsam zu verbringen. Jenny, ohne dich wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Ich danke dir für deine Kollegialität und Freundschaft.

Dem gesamten Lemi-Team danke ich vom Herzen für die familiäre Arbeitsatmosphäre. Ein besonderer Dank gilt Frau Christine Zilk und Frau Bettina Sahrada für die Herstellung der Nährmedien und Frau Dr. Vanessa Brückner für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für die beste Bürozeit zusammen.

Die Daten dieser Arbeit sind im Rahmen des vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie geförderten Projektes mit der ZIM Nr. KF2267305 erhoben worden. Ich bedanke mich bei den im Projekt involvierten Personen Herrn Prof. Dr. Tassilo Seidler, Frau Dr. Stefanie Orquera, Frau Jennifer Andrack, Frau Fiona Fölster, Frau Dr. Greta Gölz und Herrn Forbrig.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der Promotionszeit begleitet, unterstützt und motiviert haben. Vor allem danke ich meinen Eltern Birgit und Bernd für die bedingungslose Unterstützung während des Studiums. Meinem Bruder Timo danke ich für sein immer offenes Ohr. Außerdem danke ich meiner Oma Hanne-Lore und meinen Großeltern Helga und Herbert, die bis zum Schluss mitgefiebert haben.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 09.09.2021

Alina Tabea Rößner



mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-133-9