
Institut für Mikrobiologie

Adresse

Weihenstephaner Berg 3
D- 85354 Freising-Weihenstephan

Telefon: 08161-71-3516
Telefax: 08161-71-4492
Home page: <http://www.weihenstephan.de/micbio>

Personal

Institutsleitung:	Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Siegfried Scherer [†]	71-3516
Sekretariat:	Gerlinde Völkel	-3516
Mitarbeiter:	Dipl.-Biol. Natasa Anastasov *	-3945
	Andrea Appel	-3516
	Andreas Bischof (ab 01.01.02)*	-5098
	Dipl.-Biol. Reinhard Braatz	-3518
	Dipl.-Biol. Geraldine Bresolin *	-3945
	Dr.rer.nat. Ehling-Schulz Monika *	-3945
	Angela Felsl*	-3516
	Rita Festl	-5566
	Dipl.-oec.troph. Martina Fricker (ab 01.11.02)*	-3945
	Dr.rer.nat. Thilo Fuchs (ab 01.09.02)*	-3517
	Dipl.-oec.troph. Stefanie Goerges (ab 01.01.02)*	-5570
	Dipl.-Biol. Julia Gruner (ab 01.03.02)*	-5570
	Gertrud Huith	-3946
	Angela Kempe	-5566
	Kinga Kiss, M.Sc.*	-5091
	Dipl.-Biol. Jochen Klumpp (ab 01.11.02)*	-3851
	Dipl.-Ing. Jan Kretzer (ab 01.10.02)*	-3859
	Dipl.-oec.troph. Evi Lang Halter*	-3946
	PD Dr.rer.nat. Martin J. Loessner	-3859
	Dr.oec.troph. Melanie Loessner*	-5091
	Dipl.-Ing. Maija Laurikkala (bis 31.05.02)*	-3945
	Hildegard Maier	-5564
	Ariel Maoz, M.Sc. *	-5091
	Dr.oec.troph. Ralf Mayr	-3851
	Dr.rer.nat. Simone Müller (ab 01.03.02)*	-5570
	Dr.rer.nat. Helene Oberreuter (bis 28.02.02)*	-5570
	Anita Podolinsky*	-5566
	Ingrid Rachinger	-5566
	Anneliese Rieder	-5098

Peter Satorhelyi, M.Sc. *	-5091
Patrick Schiwiek	-3504
Dr.rer.nat. Herbert Seiler	-3519
Dr.rer.nat. Barbara Silakowski*	-5091
Ingrid Vogelmann*	-5566
Dr.rer.nat. Natasa Vukov (bis 31.12.02)*	-3859
Dipl.-oec.troph. Mareike Wenning *	-5570
Dr.rer.nat. Markus Zimmer*	-3859
teilweise: 1 Praktikantin, 1 Lehrling, Azubi Biologielaborant	

Gäste: Agnes Bodor, Szent István Universität, Budapest, Ungarn
(ab 04.11.2002)
Noelle Brennan, Moorepark Teagasc, Cork, Ireland
(04.06. – 21.06.2002)

¹ Der Institutsleiter ist zugleich Professor für Mikrobielle Ökologie am Department für Biowissenschaftliche Grundlagen. Das Lehrgebiet wurde von der Fakultät weder mit Stellen noch mit Mitteln ausgestattet.

* Diese Mitarbeiter werden aus Drittmitteln bezahlt.

Forschung:

Arbeitsgruppe:

Genomische Studien an Salmonellen

Gruppenleiter: Thilo M. Fuchs

Die Enteritis-Salmonellosen des Menschen gehören zu den bedeutendsten Infektionskrankheiten des Gastrointestinaltraktes. Sie werden durch eine Vielzahl verschiedener Salmonellen verursacht, die in der Regel vom Tier auf den Menschen übertragen werden. Obgleich die meisten Salmonellen ihren originären Standort vorwiegend bei verschiedenen landwirtschaftlich genutzten Tierarten besitzen, persistieren sie dort oft subklinisch bzw. symptomlos und lösen erst beim Menschen Gastroenteritis aus.

Unser zunehmendes Wissen über die molekularbiologischen Mechanismen, die einer *Salmonella*-Infektion zugrunde liegen, wird in Zukunft eine verbesserte Bekämpfung der Enteritis-Salmonellosen ermöglichen. Es kann sogar daran gedacht werden, durch gezielten Knockout an der Virulenz beteiligter Gene („Attenuation“) einen Salmonellen-Stamm zu erzeugen, der als Impfstoff-Träger eingesetzt wird. Dabei dient der nicht mehr krankheitsauslösende *Salmonella*-Stamm als Vehikel, um das Antigen eines anderen Bakteriums oder Virus in die Nähe von Zellen des Immunsystems zu bringen.

Allerdings haben die in den vergangenen Jahren durchgeführten Sequenzierungen bakterieller Genome ein überraschendes Ergebnis zu Tage befördert: je nach Organismus können 20-40% der gefundenen Genen bislang keine Funktion zugeordnet werden. Das bedeutet, dass einige

zelluläre Mechanismen nur unzureichend charakterisiert sind oder bislang vollständig unbekannt sind.

Wir stellen im folgenden zwei Beispiele dafür vor, wie für eine große Zahl dieser Gene eine vorläufige Funktionszuordnung durchgeführt werden kann, der dann in ausgewählten Einzelfällen eine detaillierte Charakterisierung folgt.

“Screening” des *Salmonella*-Genoms nach Genen, die zum intrazellulären Überleben und Wachstum beitragen

Screening the Salmonella genome for genes contributing to intracellular survival and growth

Thilo M. Fuchs, Heide Niesalla, Elke Freissler, Jochen Klumpp *et al.*

Wir entwickelten einen neuen „Screening“-Ansatz, um solche Gene zu identifizieren, die an der intrazellulären Vermehrung von *Salmonella enterica* serovar Typhimurium beteiligt sind. Dieser Ansatz umfasst (i) ein genetisches System, das auf dem Prinzip der homologen Rekombination basiert und zur genomweiten insertionalen Mutagenese eingesetzt wird, und (ii) ein Hochdurchsatz-Verfahren, mit dessen Hilfe solche Mutanten isoliert werden, die sich bei der Infektion von Makrophagenzellen als attenuiert (abgeschwächt) herausstellen. Dazu wurden kurze, chromosomale Fragmente in einen temperatursensitiven Vektor kloniert; durch insertionale Duplikationsmutagenese, gefolgt von einem Selektionsschritt bei nicht permissiver Temperatur, wurden 9125 individuelle Mutanten erzeugt (Abb. 1).

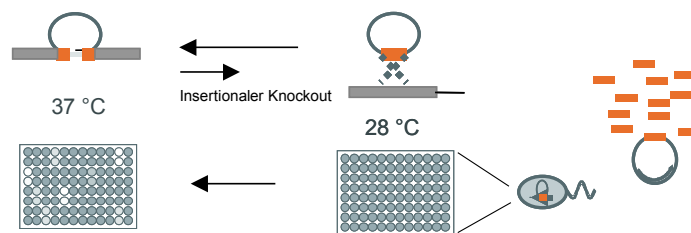


Abb. 1: Mutagenese durch insertionalen Knockout. Chromosomale Fragmente, die kürzer sind als ein durchschnittliches Gen, werden in einen Vektor kloniert, der bei 37°C nicht mehr replizieren kann. Die Integration des kompletten Vektors und damit die insertionale Mutagenese erfolgt ortsspezifisch über homologe Rekombination.

Wir wollten nun wissen, welche Gene am Überleben und der Replikation von *S. typhimurium* in Makrophagenzellen, die eine wichtige Zwischenstation bei einer Infektion sind, beteiligt sind. Dazu ersetzten wir den Infektionsassay mit Makrophagen im 24-Well-Format durch ein Hochdurchsatzverfahren in Mikrotiterplatten. Zusätzlich wurde die Zahl der nach der Infektion überlebenden Zellen nicht durch arbeitsaufwendiges Ausplattieren und Auszählen der Bakterien bestimmt, sondern durch die Messung der optischen Dichte der jeweiligen Zelllysate im ELISA-Reader. Die Korrelation zwischen beiden Verfahren zeigt die Abbildung 2.

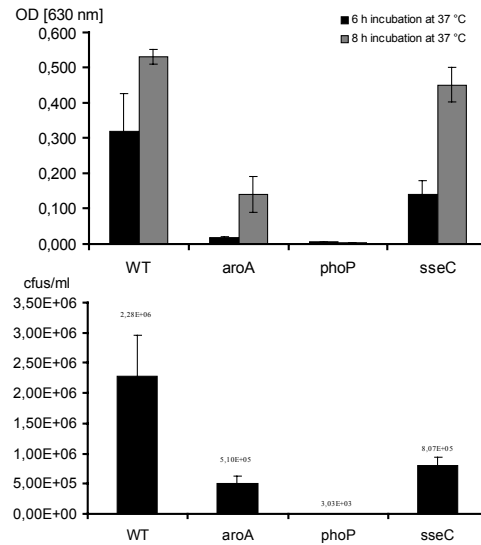


Abb. 2: Die Überlebensrate verschiedener *S. typhimurium* -Mutanten in Makrophagen-Zellen. Um nach erfolgter Zellyse die Zahl der überlebenden Bakterien quantitativ zu erfassen, bieten sich zwei Verfahren an, nämlich die OD-Messung (oben) und das aufwendigere Ausplattieren der Lysate (unten). Beide Verfahren korrelieren in qualitativer Hinsicht miteinander. Deutlich erkennbar ist die geringere Überlebensrate der eingesetzten Stämme im Vergleich zum Wildtyp. Die Knockout-Mutante des Regulatorgens *phoP* ist dabei stärker attenuiert als die *aroA*- oder *sseC*-Mutante. Während AroA am zellulären Metabolismus beteiligt ist, handelt es sich bei dem von *sseC* codierten Protein um ein sekretiertes Protein.

Dieser neuartige Makrophagen-Infektionsassay erlaubte uns die Testung aller 9125 Mutanten, von denen 438 Klone in ihrer intrazellulären Replikationsfähigkeit stark beeinträchtigt waren. Diese Mutanten wurden mittels PCR-Amplifikation des ursprünglichen Fragmentes und dessen anschließender Sequenzierung weiter charakterisiert. Dazu wurde eine Genomkarte von *Salmonella typhimurium* erstellt, in der bereits bekannte Virulenzfaktoren, darunter die sog. *Pathogenitätsinseln*, mit den von uns identifizierten Genen abgeglichen wurde. Wir definierten schließlich eine Reihe von möglichen neuen Faktoren, die am intrazellulären Überleben von *Salmonella* Stämmen maßgeblich beteiligt sind, unter ihnen solche, deren Funktion bislang unbekannt war. Die Abbildung 3 zeigt die funktionale Gliederung dieser Gene, die nach einem Knockout zur Attenuierung von *S. typhimurium* führen können.

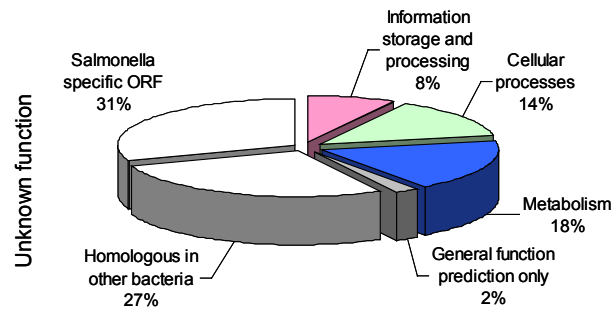


Abb. 3: Gruppierung der identifizierten *Salmonella*-Gene, die nach insertionalem Knockout zur Attenuierung geführt haben. Die Mehrzahl der Gene fällt in die Kategorien Transport, Metabolismus und Regulation. Für etwa 30% der identifizierten Sequenzen konnten wir keine Homologie zu Proteinen anderer Bakterien feststellen. Es handelt sich hier vermutlich um Faktoren, die spezifisch an der Salmonellen-Virulenz Anteil haben.

In der Folge werden wir aus der Vielzahl an gefundenen Genen einige auswählen und zunächst durch sog. „In-frame-Deletionen“ validieren. Hierbei interessieren uns vor allem „hot-spots“, also Regionen im *Salmonella*-Genom, in denen attenuierende Gene in enger Nachbarschaft liegen. Durch den Vergleich mit Daten anderer pathogener Organismen wie Listerien wollen wir ein genaueres Bild der Vorgänge bei der intrazellulären Replikation dieser Bakterien zeichnen.

Genomische Mutagenese eines Gram-negativen Bakteriums: Definition des Sets der essentiellen Gene von *Salmonella*

Genomic mutagenesis of a Gram negative bacteria: Definition of a set of essential genes in Salmonella

Thilo M. Fuchs, Karin Knuth *et al.*

Das oben beschriebene Verfahren zur Herstellung einer genomweiten Mutantenbank wurde von uns in eine Strategie zur Identifikation essentieller Gene integriert. Unter essentiellen Genen verstehen wir Gene, die auch unter Laborbedingungen für das Bakterium nicht verzichtbar sind und daher auch nicht mutagenisiert werden können. Solche Gene sind generell Zielpunkte für Antibiotika. Diese Strategie beinhaltet i) die genannte Knockout-Mutagenese, ii) das „Screening“ einer kompletten Mutantenbank nach lethalen Insertionsereignissen, und iii) die Identifikation geeigneter und neuer antibakterieller Targets.

Die in einem konditional replizierenden Vektor vorliegende Fragmentbank wurde in *S. typhimurium* transformiert; die unter permissiven Bedingungen kultivierten Transformanten wurden vereinzelt und als Referenzbank gesichert. Eine im 96-Well-Format vorliegende Kopie dieser Bank wurde anschließend unter nicht-permissiven Bedingungen selektioniert. In diesem Schritt überlebten nur solche Klone, bei denen a) ein Rekombinationsereignis eingetreten war und b) dieses Rekombinationsereignis keine lethalen Folgen für den betroffenen

Klon hatte. In den Fällen, in denen aufgrund der insertionalen Rekombination keine überlebensfähigen Bakterien auffindbar blieben, waren offenbar essentielle Gene betroffen (Abb. 1).

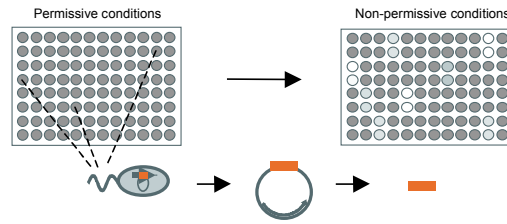


Abb. 1: Eine Referenzbank, bestehend aus Klonen von *S. typhimurium* mit frei replizierendem Vektor als Träger einer Fragmentbank, wurde im 96-Well-Format erstellt. Wachstum der Einzelklone unter nicht-permissiven Bedingungen, unter den der Vektor nicht mehr replizieren kann, führt zur Selektion von Insertionsmutanten (grau). Klone, bei denen die Insertion über homologe Rekombination lethal ist, deuten auf klonierte Fragmente hin, die Teil essentieller Gene sind (weiß).

Etwa 500 solcher wachstumsdefizienter Mutanten wurden identifiziert. Durch Rückgriff auf die Referenzbank konnten die jeweiligen Fragmente amplifiziert und anschließend sequenziert werden. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)-Analyse nach Homologien zu bereits bekannten Genen untersucht. Ergebnis dieser Arbeit war eine genomische Karte lethaler Insertionsmutanten (Abb. 2).

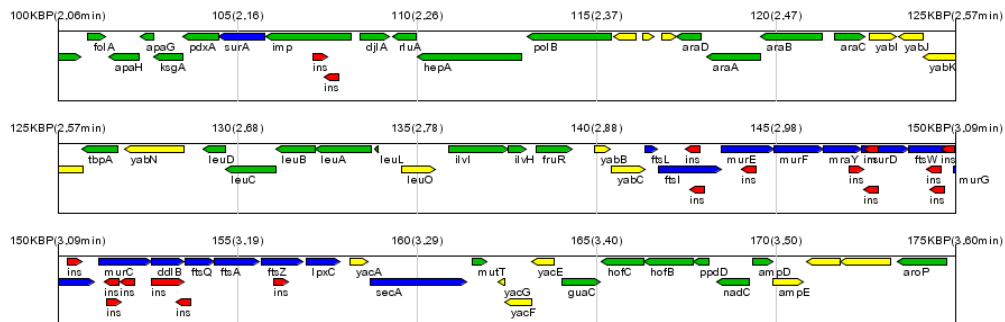


Abb. 2: Ausschnitt aus der Genomkarte von *S. typhimurium*. Die dunklen Pfeile stellen bereits bekannte essentielle Gene dar, durch das Verfahren der Insertionsmutagenese identifizierte Fragmente, die Teile essentieller Gene sind, sind als kurze Pfeile den Genen unterlegt. Die hier gezeigte Region umfasst das Gencluster der Murein-Biosynthese. Einige Antibiotika wie Bacitracin oder Ampicillin sind gegen die Zellwandsynthese und damit gegen die Funktion der Gene der Murein-Biosynthese gerichtet.

Aus den ermittelten Fragmenten leiteten wir etwa 220 Gene ab; diese Gene machen schätzungsweise die Hälfte aller für *S. typhimurium* essentiellen Gene aus. Darunter findet sich eine Vielzahl von Genen, die für Proteine unbekannter Funktion codieren. Um aus der Gesamt-

gruppe die vielversprechendsten antibakteriellen Zielmoleküle herauszufiltern, wendeten wir ein Validierungsschema an, das die Verbreitung der Gene in anderen, medizinisch relevanten Bakterien untersuchte. Wir erhielten als Ergebnis ein Muster orthologer Proteine, die teilweise nur in einer oder wenigen Spezies vorkommen, teilweise in den meisten der untersuchten Pathogenen gefunden werden konnten (Abb. 4). Die identifizierten „Targets“ können direkt zur Wirkstoffentwicklung eingesetzt werden.

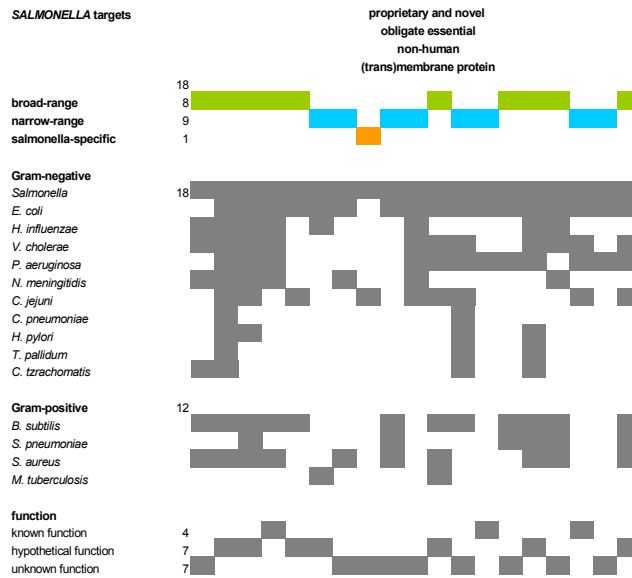


Abb. 3: Essentielle Proteine von *Salmonella* aus unserem Ansatz, die nach den Kriterien Löslichkeit und fehlende Homologie zum Humangenom ausgewählt wurden. Die Aminosäuresequenzen wurden anschließend mit den Proteinen medizinisch relevanter Bakterien verglichen. Je nach Homologiegrad eignen sich die einzelnen Targets zur Entwicklung von Spezies-spezifischen oder Breitband-Antibiotika.

Arbeitsgruppe: Molekularbiologie von Bakteriophagen

Gruppenleiter: Martin J. Loessner

Listeria monocytogenes ist ein opportunistischer Infektionserreger, welcher vor allem für Ungeborene, Kleinkinder, Schwangere, ältere Menschen und Personen mit geschwächtem Immunsystem gefährlich sein kann. Der Keim ist in der Lage, die Blut-Hirn Schranke und die Plazenta-Barriere zu überwinden und kann sowohl Meningiten diaplazentare Foetus-Infektionen verursachen. Listerien werden meist oral mit der Nahrung aufgenommen und kommen in Lebensmitteln häufig vor, besonders in solchen tierischer Herkunft. Speziell Milchprodukte wie verschiedene Weichkäse, rohe und fermentierte Fleischwaren, Geflügel, aber auch Feinkostwaren, Salate und Cremespeisen sind häufig (bis zu 50%) mit *Listeria* kontaminiert.

Clostridium perfringens ist ein gram-positiver, anaerober Sporenbildner welcher ubiquitär vorkommt und mit einfachen Mitteln aus Sedimenten und (insbesondere fäkal verunreinigten) Böden isoliert werden kann. Ebenso kann das Bakterium häufig aus Lebensmitteln isoliert werden; etwa enthalten 50% aller getesteten Fleischproben enthielten lebensfähige Zellen. Dies ist insbesondere bedenklich, da viele Stämme von *C. perfringens* in der Lage sind Erkrankungen von Menschen und Tieren zu verursachen. lebensmittelbedingte Erkrankungen reichen von *Enteritis nekroticans* (Darmbrand) beim Menschen und verwandten Erkrankungen bei Tieren bis zu Lebensmittelvergiftungen durch die Bildung des sogenannten Cpe Enterotoxins. Die häufig und weltweit bei Zuchtgeflügel (aber auch nicht domestizierten Vögeln) auftretende nekrotische Enteritis führt zu beachtlichen ökonomischen Verlusten in der Geflügel-Industrie. Auch subklinische Infektionen mit *C. perfringens* führen zu erhöhtem Futterkonsum und geringerem Schlachtgewicht. Zur Kontrolle dieser Infektionen werden in der Geflügelzucht Antibiotika oft auch schon prophylaktisch (als "Wachstumsförderer") eingesetzt. Jedoch ist in der Europäischen Union (EU) die Benutzung der hier gebräuchlichsten Antibiotika wegen der möglichen Ausbildung von Kreuzresistenzen mit therapeutisch wichtigen Antibiotika untersagt (EU-Richtlinie 70/524/EWG), zur Zeit wird strebt die EU sogar ein generelles Verbot an. Diese Situation macht die Entwicklung von neuartigen antimikrobiellen Wirkstoffen zur Kontrolle von *C. perfringens* zu einem aktuellen Thema.

Durch molekularbiologische Methoden ist es möglich geworden die speziellen Eigenschaften von bakteriellen Viren (Bakteriophagen) für den gezielten Nachweis und die Kontrolle dieser unerwünschten Bakterien in Lebensmitteln und der Umwelt zu nutzen. Wir interessieren uns unter anderem für die Enzyme und Proteine der Zellwand-lyisierenden Systeme von Phagen für *Listeria monocytogenes* und *Clostridium perfringens*. Die Ergebnisse der Grundlagenorientierten Arbeiten dienen als Basis für verschiedene methodische Weiterentwicklungen.

Funktionelle Analyse des Hol118 Holins: Regulation der Porenbildung durch einen N-terminal verkürzten Inhibitor

Functional analysis of the Hol118 holin: Regulation of pore formation by an N-terminally truncated inhibitor
Natasia Vukov, Siegfried Scherer, Martin Loessner

Für den zeitlichen Verlauf und die effektive intrazelluläre Lyse von phageninfizierten Bakterien ist außer den Endolysinen als Mureinhydrolasen meist noch ein zusätzliches Protein nötig, welches über Porenbildung in der Cytoplasma-Membran den Durchtritt der Endolysine an das Zellwand-Substrat ermöglicht. Diese kleinen hydrophoben Proteine werden aufgrund ihrer Funktion als Holine bezeichnet. Die Primär-Sequenzen der Holinen sind sehr heterogen; es gibt fast keine signifikanten Homologien, außer bei einzelnen Phagen von taxonomisch sehr nah verwandten Bakterien. Wir haben ein Derivat des Phagen Lambda gt11 konstruiert, $\lambda\Delta\text{Stf}$, in dem das native Holin Gen S vollständig deletiert wurde und eine eingeführte EcoRI - Schnittstelle das Einfügen eines heterologen Holin Gens erlaubt. Die Expression der Lysozym-Kassette mit den klonierten Holin Genen kann mittels Prophagen-Induktion von $\lambda\Delta\text{Stf}$ durch Inaktivierung des temperatursensitiven CIts857 Repressors erreicht werden. Beobachtung und Verlauf des zeitlichen Verlaufes der Lyse ermöglicht einen Vergleich der Funktion verschiedener Holine. Als erstes wurden die in der Funktion unterschiedliche Varianten des Lambda S Holins getestet. Die Expression des S105 Effektors führte zu sehr

schneller, vorzeitiger Lyse, während der Inhibitor S107 deutlich schlechter lysierte. Dieses entspricht den Erwartungen und zeigt die Funktionalität des Systems. Die membranpermeabilisierende Aktivität des Hol118 Holins des *Listeria monocytogenes* Bakteriophagen A118 wurde ebenfalls getestet: Erstaunlicherweise lysiert $\lambda\Delta\text{Sthf}::\text{hol118}$ in *E. coli* die Zellen relativ spät, 90 min nach Induktion. Die Lyse konnte auch nicht durch eine Zerstörung des Membranpotentials vorzeitig induziert werden. Etwa 20 Minuten nach der $\lambda\Delta\text{Sthf}::\text{hol118}$ Prophagen-Induktion war Hol118 in der inneren Membranfraktion von *E. coli* immunologisch nachweisbar. Entsprechend konnte das Hol118 Protein auch in der Membran von *Listeria* Zellen nach A118 Infektion nachgewiesen werden (Abb. 1).

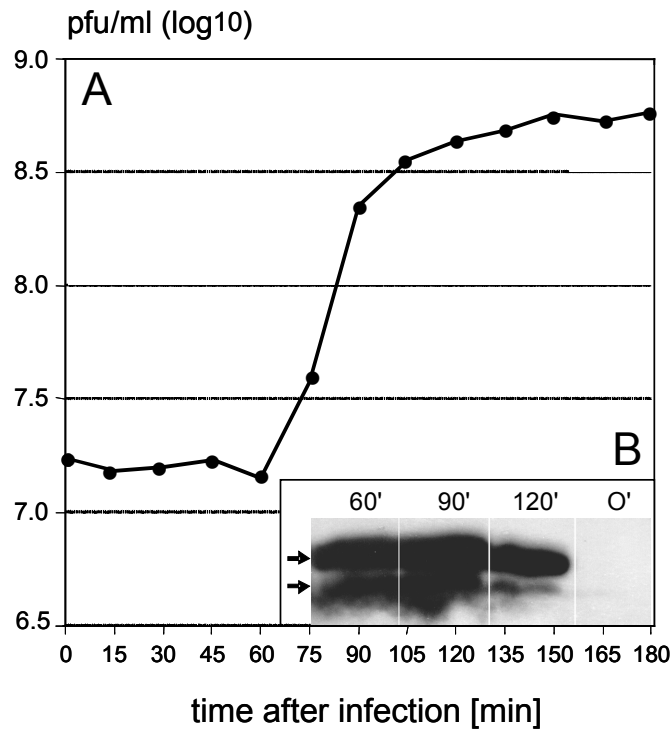


Abb. 1: Nachweis von Hol118 in Membranen von *Listeria* Zellen nach Infektion mit A118. **A:** Ein-Stufen-Wachstums-Kurve von A118 mit *Listeria monocytogenes* 1001 als Wirt. **B:** Western Blotting zeigt das zwei verschiedene Spezies des Hol118 Proteins (Pfeile) in der bakteriellen Cytoplasma-Membran erscheinen; die untere Bande repräsentiert den Hol118(83) Inhibitor.

Um den potentiellen doppelten Start zu untersuchen, wurden Mutationen im N-Terminus eingeführt und der Effekt dieser Mutationen getestet. Veränderungen des ersten und vierten ATGs hatten keinen bedeutenden Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der Lyse. "Toeprinting" auf der *hol118* mRNS zeigte ein zusätzliches ATG Start Kodon an Nukleotid-Position 40 in *hol118*. *In vitro* Versuche zeigten, dass diese Hol118(83) Variante von *hol118* tatsächlich translatiert wird (Abb. 2).

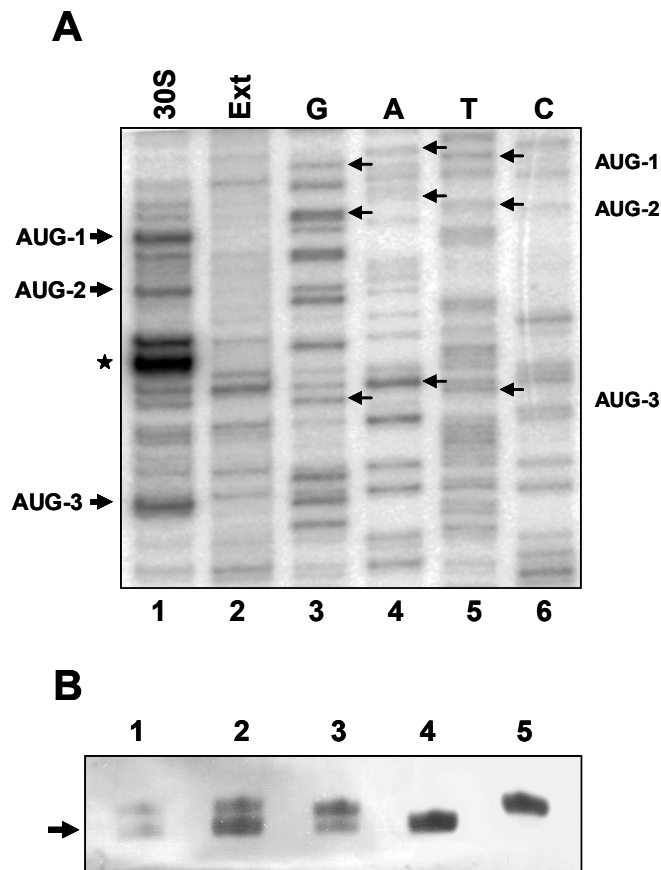


Abb. 2: Toeprint Analyse und *in-vitro* Translation von *hol118* und verschiedenen Mutanten Genen. **A:** 30S Translations-Initiierung durch Komplex Bildung auf *hol118* mRNA. Die entstehenden Signale welche den normalen Start-Codons entsprechen sind mit Pfeilen markiert. Ein unspezifisches Signal ist mit einem Stern markiert. Die Banden auf der rechten Seite bilden die exakte Nukleotidsequenz ab. **B:** Nachweis der Polypeptid-Produkte von durch *in-vitro* Translation synthetisierten Hol118 Varianten. Spur 1, pSPhol118(wt); Spur 2, pSPhol118(96); Spur 3, pSPhol118(93); Spur 4, pSPHol118 Δ M1Y13 (kodiert für Hol118(83)); Spur 5, pSPHol118M14I. Die untere Bande entspricht Hol118(83) (siehe Pfeil).

Das gekürzte Protein kann nur zwei Transmembrandomänen in der Membran bilden, ist nicht mehr funktionsfähig und kann das Endolysin R in $\lambda\Delta$ Sthf nicht mehr komplementieren. Diese funktionellen Eigenschaften von Hol118(83) zeigten eindeutig, dass die erste Transmembrandomäne für die porenbildende Funktion des Holins essentiell ist. Ersatz des M14 ATG Kodons in die für die Initiation der Translation in der Regel nicht verwendeten CTG oder ATT (M14L, M14I) führte zu zunehmend schnelleren Lyse (Abb. 3). Diese Ergebnisse zeigen eine Inhibitor-Funktion von Hol118(83), welches auch *in trans* Hol118 induzierte Lyse verhindern kann. Auf Grund dieser Ergebnisse wird ein neues Modell postuliert: Hol118(83), das an

Nukleotid-Position 40 des *hol118* Gens startet, funktioniert als der Inhibitor der Lyse, und hat somit einen Einfluss auf die Regulation der Dauer der Latenzphase des A118 Bakteriophagen.

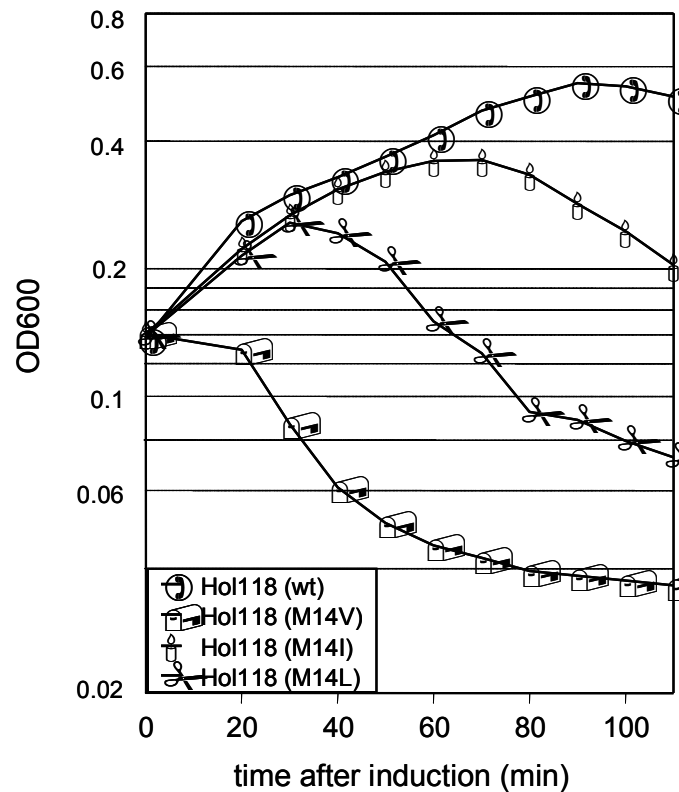


Abb. 3: Lyse-Profile von *E. coli* lysogenisiert mit $\lambda\Delta$ Sthf Varianten, welche hol118M14I, hol118M14L oder hol118M14V tragen. Verglichen mit dem Wildtyp-Allel, führt die Mutation von AUG-3 und die dadurch entstehenden M14 Substitutionen in den drei mutierten Holinen zur Eliminierung der Inhibitor Synthese. Dieses wiederum bedingt eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Beschleunigung der Lyse.

Mit den Waffen des Feindes: Eine virale Murein-Hydrolase zur Zerstörung von *Clostridium perfringens*

With the weapons of the enemy: A viral murein hydrolase for destruction of Clostridium perfringens

Markus Zimmer, Siegfried Scherer, Martin J. Loessner

Bakterielle Viren sind die wohl am häufigsten vorkommenden selbstreplizierenden Einheiten auf diesem Planeten. Durch eine enzymatische Lyse der Wirtszelle am Ende des viralen Vermehrungszyklus wird die Nachkommenschaft freigesetzt. Diese Lyse wird in der Regel verursacht durch die Zusammenarbeit zweier phagenkodierter Proteine, dem Holin und dem Endolysin. Das Holin ist ein niedermolekulares, hydrophobes Protein, welches sich in die Zell-

membran eingelagert und nach Oligomerisierung durch die Ausbildung eines "Lochs" innerhalb der Membran dem Endolysin den Zugang zu seinem Substrat, dem Murein, gewährt. Endolysine sind Peptidoglykan-hydrolysierende Enzyme, deren Aktivität zur einer sehr schnellen und spezifischen Lyse der Wirtszelle führt. Sie haben zudem die Eigenschaft auch bei exogener Zugabe die Zellwand von Bakterien zerstören zu können. Kürzlich wurde berichtet das Endolysine in in-situ Applikationen zur Kontrolle von naso-pharyngealen *Streptococcus*-Infektionen erfolgreich eingesetzt werden können. Auch konnte gezeigt werden, dass ein rekombinant in *Lactococcus lactis* produziertes und mittels eines Signalpeptids exportiertes *Listeria*-Phagen-Endolysin in der Lage ist, *Listeria monocytogenes* Zellen im umgebenden Medium abzutöten. Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit einiger Zeit mit den möglichen praktischen Anwendungen von phagenkodierten Endolysinen, welche sich möglicherweise als spezifische und wirksame antimikrobielle Alternative zu gängigen Antibiotika eignen. Ob dieses auch für *Clostridium perfringens* zutrifft, sollte nun geklärt werden.

Das zunächst durch Bioinformatik identifizierte duale Lyse-System kodiert für ein Holin und ein Endolysin. Die Analysen des Produktes von Gen 20 (als ply3626 bezeichnet) wiesen auf eine mögliche N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase Domäne im aminoterminalen Bereich des Polypeptides hin, welches sich auch in der lokalen Sequenzähnlichkeit von Ply3626 zu einer Reihe anderer Amidasen zeigt (Abb. 1). Diese lokal begrenzte Verwandtschaft weist außerdem auf eine modulare Domänenstruktur des Ply3626 Enzyms hin. Häufig besitzen diese hochspezialisierten Enzyme eine enzymatisch aktive Domäne welche mit einer Zellwandbindenden Domäne fusioniert ist, welche das Enzym in die Nähe des zu hydrolysierenden Substrates bringt, und die lytische Spezifität des Enzyms ganz entscheidend mitbedingt. Im Vergleich mit dem gesamten Enzym (siehe nächster Abschnitt) zeigte ein C-terminal verkürztes Ply3626 Endolysin (mit vollständiger N-terminaler Amidase Domäne) keinerlei lytische Aktivität. Dieses spricht dafür dass hier nicht nur der N-Terminus sondern auch der C-Terminus eine essentielle Rolle für die lytische Aktivität des Enzyms besitzt.

Das Endolysin-kodierende Gen ply3626 wurde zunächst in einen gängigen Stamm von *Escherichia coli* kloniert und exprimiert. Es war jedoch keine Enzymaktivität nachweisbar, und weitere Untersuchungen haben gezeigt dass die Zellen nicht in der Lage waren das Ply3626 Protein zu synthetisieren. Als Ursache dafür konnte der sehr verschiedenen G+C Gehalte der involvierten Organismen (*E. coli* 50.8 % bzw. *C. perfringens* 28.6 %) und der damit verbundenen unterschiedlichen Benutzung von Codons ausgemacht werden. Nachdem der zur heterologen Produktion ausgewählte Stamm mit zusätzlichen Kopien von in *E. coli* selten vorkommenden Gene für tRNA^{Arg} und tRNA^{Ile} ausgestattet wurde, war die Proteinsynthese möglich. Die hierbei nach Induktion zunächst beobachtete Bildung von unlöslichen Einschlusskörpern konnte durch eine starke Absenkung der Expressionsrate (Temperatur, Transkriptionsrate) vermieden werden. Die in der cytoplasmatischen Fraktion vorliegenden rekombinanten Endolysine zeigten spezifische lytische Aktivität gegenüber *Clostridium perfringens* Zellen (siehe unten). Eine aminoterninale Veränderung des Enzyms durch das Hinzufügen eines Hexa-Histidin Polypeptides (HPL3626) hatte keinen negativen Effekt auf die enzymatische Aktivität und erlaubte eine einfache und schnelle Aufreinigung der aktiven Enzyme mittels Nickel-Chelat Affinitätschromatographie.

Lebende Zellen von 48 getesteten *C. perfringens* Stämme waren sensitiv gegenüber der Ply3626 Murein Hydrolase (Abb. 2), und wurden innerhalb kurzer Zeit lysiert. Im Gegensatz

dazu waren andere *Clostridium*-Arten generell nicht empfindlich, und auch andere Bakterien (insgesamt 34 Stämme) wurden von den Enzymen nicht lysiert. Diese hohe Spezifität von Ply3626 gegenüber *C. perfringens* ist von hohem Wert für nun mögliche Anwendungen, zum Beispiel die Entwicklung neuer biologischer Maßnahmen zur Kontrolle der Entwicklung von *C. perfringens* in Lebensmitteln, Futtermitteln oder auch komplexen mikrobiellen Lebensgemeinschaften. Diese äußerst spezifische lytische Wirkung scheint ein übergeordnetes Merkmal von phagenkodierten Endolysinen zu sein. In anderen Untersuchungen konnten wir bereits Genus- oder manchmal auch Spezies-spezifische Lyse durch rekombinante Endolysine von Bakteriophagen für *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* oder *Staphylococcus aureus* beobachten. Dieses Spektrum unterschiedlicher Zielorganismen soll durch weitere Untersuchungen noch ausgebaut werden.

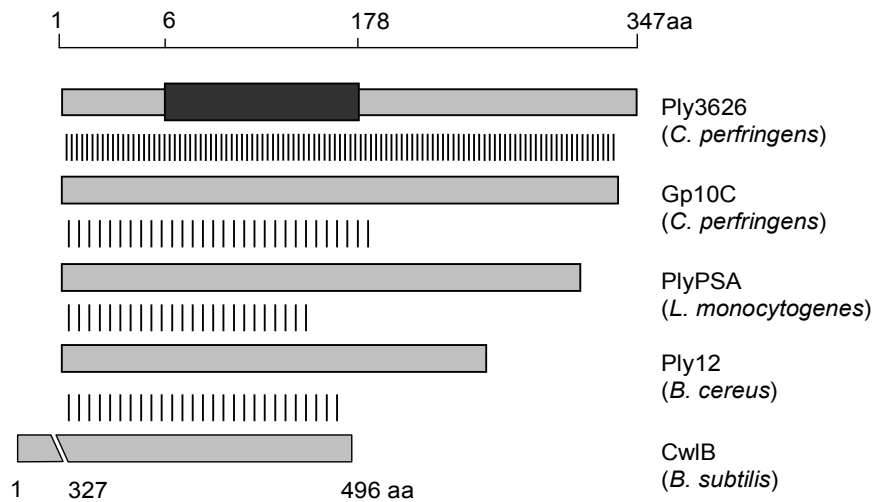


Abb. 1: Der Vergleich der Aminosäure-Sequenzen zeigt die Ähnlichkeiten im aminoterminalen Bereich von Ply3626 zu anderen lytischen Amidasen. Der dunkel eingefärbte Bereich markiert die wahrscheinliche N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase Domäne. Die Größe der Proteine (in Aminosäuren) wird durch den Maßstab angedeutet.

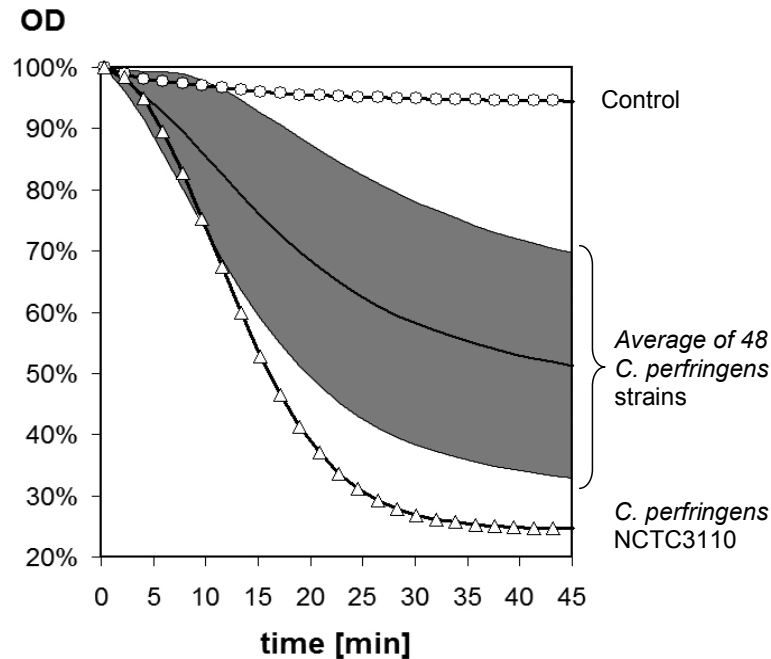


Abb. 2: Zusammenfassung der Lyse-Assays von *Clostridium* Zellsuspensionen mit rekombinantem Ply3626. Die prozentuale Abnahme der optischen Dichte (OD600, Y-Achse) wird nach der Zugabe des Enzyms zu *C. perfringens* Zellen über die Zeit (X-Achse) verfolgt. Die untere Kurve (Dreiecke) visualisiert die Lyse von *C. perfringens* NCTC 3110 Zellen, dem Wirtstamm von ϕ 3626. Die Negativkontrolle (Extrakt von *E. coli* ohne Enzym) ist oben angedeutet (Kreise). Die "durchschnittliche" Lyse von 48 unterschiedlichen *C. perfringens* Stämmen wird durch die schwarze Linie repräsentiert und die Standardabweichung durch den grau schattierten Bereich.

Arbeitsgruppe: Identifizierung lebensmittelrelevanter Mikroorganismen

Gruppenleiter: Herbert Seiler

Validierung der Gesamtkeimzahlbestimmung von Milch mit dem MicroFoss-System

Determination of total viable counts in dairy products with the MicroFoss Analyzer

Angelika Michl, Michael Kümmerle, Herbert Seiler

Der MicroFoss-Analyser (MFA) ist ein relativ neues Gerät zur Schnellbestimmung von Keimzahlen. In einem Röhrchen befindet sich ein spezifisches Voll- oder Selektiv-Flüssigmedium. Hierin wird die flüssige Probe direkt oder nach Verdünnung mit Pufferlösung überführt; stückige Proben werden zuvor homogenisiert. Am Boden des Röhrchens befindet sich ein Agarpfropfen mit Redox- und pH-Indikatoren. Mikrobielle Stoffwechselprodukte diffundieren in den Agar und verändern die optische Dichte. Diese wird alle sechs Minuten

gemessen. Geringste, signifikante Differenzen gegenüber dem Ausgangswert werden über eine Bebrütungszeit-abhängige Kalibrationskurve in Keimzahlen der Ausgangsprobe umgerechnet. Je schneller die Kurve ansteigt (bei $\sim 10^6$ Keimen/ml), umso höher war die Ausgangskeimzahl. Nach Vorgabe sollte die Bestimmung der Gesamtkeimzahl (Gkz) höchstens 20 h dauern. Unter Berücksichtigung der Arbeitsroutine hätte man also am Tag nach dem Ansetzen der Probe das Ergebnis vorliegen, bei sehr hoher Ausgangskeimzahl schon am gleichen Tag.

Wir überprüften das Gerät hinsichtlich der Erfassung von Gkz'en. Die Proben stammten aus der Routine einer Molkerei. Es wurden die Produkte Rohmilch (RM) und pasteurisierte Milch (PM) untersucht. Im Vergleich wurden die Keimzahlen nach dem Koch'schen Plattenverfahren mit PCA bestimmt. Es standen auch die Daten des Milchprüfings zur Verfügung (Bactoscan-Methode). Für die Kalibrierungskurven wurden Proben bebrütet und dann mit UHT-Milch verdünnt. Die Kalibrierung der Gkz von RM zeigte einen guten Korrelationskoeffizienten von -0,91. In einer ersten Versuchsphase ergaben sich für die Gkz-Bestimmungen von Milch aus Tanksammelwagen sehr gute Übereinstimmungen zwischen den Methoden. Selten betrug die Abweichungen mehr als eine log-Einheit. Später aber wurden mit dem MFA die Rohmilchkeimzahlen scheinbar immer höher und erreichten innerhalb von zwei Wochen eine unakzeptable Abweichung gegenüber den Kontrollen. Offenbar hatte sich die Populationsstruktur in der RM so stark verändert, dass die Kalibrierung nicht mehr zutreffend war. Es wäre also eine neue Kalibrierung erforderlich gewesen. Demnach wird die Reaktionsgeschwindigkeit im MFA von der Keimzahl und der Populationsstruktur bestimmt. Nachdem letztere aber eine "black box" für die Routineanalyse im Molkereilabor ist und unvorhersehbaren Schwankungen unterliegt, kann diese Methode bei gleicher Gkz keine stabilen Werte liefern.

Die Kalibrierung von PM-Proben mit 113 Werten ergab den Korrelationskoeffizienten -0,94. Diese Daten waren auch für thermisierte Milch und Erhitzerproben passend. Aber auch hier blieb die Flora offenbar nicht stabil, da nach einer anfänglichen Phase guter Korrelation zwischen den Methoden später mit dem MFA deutliche Fehlbestimmungen in Serie zu verzeichnen waren. Im Übrigen ergaben sich auch immer wieder unerklärbare deutliche Ausreißer mit der MFA-Methode. Diese waren nicht immer reproduzierbar, waren aber nachweislich nicht personenbezogen.

Es ist plausibel, dass bei gleicher Keimzahl eine *Bacillus cereus*- bzw. *B. subtilis*-dominierte Flora sich im MFA jeweils unterschiedlich einer Korrelationskurve zuordnet. Noch gravierender sind wohl die Abweichungen, wenn die Flora der Probe von einer Bazillen-Dominanz zu einer Milchsäurebakterien-, Enterobakterien- oder Pseudomonaden-Dominanz wechselt. Demnach ist der MFA eher ein System für die Bestimmung der voraussichtlichen Haltbarkeit der Milch. Die Änderung der optischen Dichte ist ein Summenparameter für mikrobielle Stoffwechselaktivitäten. Offenbar eignet sich das System weniger für eine dauerhaft gute Bestimmung der Gkz. Unsere Erwartung, dass in Milch eine generell annähernd gleiche Populationszusammensetzung vorläge und damit der Einfluss von Floraverschiebungen auf das Testsystem sich innerhalb eines tolerierbaren Bereichs bewegen würde, wurde nicht bestätigt.

Nachweis von Coliformen und *Escherichia coli* in Milch mit dem MicroFoss-System

Determination of coliform counts and E. coli counts in dairy products with the MicroFoss Analyzer

Angelika Michl, Michael Kümmerle, Herbert Seiler

Wir überprüften das Gerät hinsichtlich der Erfassung von Coliformen- (Cf) und *Escherichia coli* (EC)-Keimzahlen im Routinebetrieb einer Molkerei. Es wurden die Produkte Rohmilch, Pasteurisierte Milch, Thermisierte Milch und Butter untersucht. Im Vergleich wurden die Keimzahlbestimmungen nach dem konventionellen Koch'schen Plattenverfahren mit Chromocult-Agar und VRB-Agar durchgeführt. Bestätigungsidentifizierungen erfolgten mit Enterotube, API-20/50E, FTIR-Spektroskopie, 16s-rDNA-Sequenzierung u.a. Der Test auf Cf bzw. EC wurde in den Versuchen entgegen den Herstellerempfehlungen von 9 - 10 h auf 18 bzw. 15 h verlängert.

Eine Übereinstimmung zwischen MFA und Agarplattentest war gegeben. Vereinzelt signalisierte die MFA-Methode gegen Ende unserer Bebrütungszeit ein falsch positives Ergebnis. Dies lässt sich aber vermeiden, wenn man entsprechend den Herstellerempfehlungen den Ansatz nach 9-10 h abbricht. Hierbei schlagen dann beim Nachweis auf Cf keine nicht-Cf *Enterobacteriaceae* und beim Nachweis auf EC keine Cf durch. Auf den Platten wurden vereinzelt falsch positive Ergebnisse notiert. Die Identifizierung der Kolonien ergab, dass es sich nicht um EC oder Cf, sondern um andere *Enterobacteriaceae*, Pseudomonaden und Acinetobakterien handelte; deren Kolonien können gelegentlich mit Cf oder EC verwechselt werden. Demnach ist die Plattenmethode weniger selektiv als die MFA-Methode. Insgesamt wurden aber zu wenige positive Proben untersucht, als dass man über die Güte der quantitativen Analyse bereits eine abschließende Aussage treffen könnte.

Die meisten Molkereiprodukte sollten generell frei von EC und Cf sein. Folglich ist eigentlich nur ein Ja/Nein-Ergebnis gefragt. Dies lässt sich mit konventionellen Methoden (z.B. BGL-Bouillon) relativ einfach erzielen. Somit ist es überlegenswert, ob sich trotz der guten Ergebnisse mit dem MFA die Investitionskosten lohnen. Wir sehen vor allem ein Potenzial für die Qualitätskontrolle von Rohmilcherzeugnissen, also bei Proben, bei denen die Kenntnis der absoluten Keimzahlen dieser Organismen wichtig ist.

Populationsstruktur von *Enterobacteriaceae* in Milch und Milchprodukten

Diversity of Enterobacteriaceae in dairy products

Angelika Michl, Michael Kümmerle, Herbert Seiler

Im Rahmen der Untersuchung über den MicroFoss-Analyzer wurden *Enterobacteriaceae* aus Rohmilch (RM), pasteurisierter Milch (PM), thermisierter Milch (TM) und Butter isoliert und identifiziert. Von 269 Proben RM waren 5 positiv; 19 Stämme wurden isoliert und identifiziert. Die entsprechenden Zahlen für PM, TM und Butter betragen 405/10/15, 57/18/26 und 328/137/229. Hiervon wurden 263 Isolate identifiziert: 24 von RM, 15 von PM, 26 von TM und 198 von Butter. Am häufigsten wurde *Klebsiella oxytoca* mit 58 Isolaten nachgewiesen, gefolgt von *Escherichia coli* (75), *Enterobacter cloacae* (49), *Citrobacter freundii* (30), *Enterobacter intermedius* (18), *Klebsiella planticola* (9), *Kluyvera ascorbata* (6), *Enterobacter amnigenus* (5), *Serratia liquefaciens* (4), *Klebsiella terrigena* (2) sowie *Buttiauxella izardii*,

Erwinia rhaganti, *Klebsiella pneumoniae*, *Obesumbacterium proteus*, *Pantoea stewartii*, *Proteus mirabilis* und *Yersinia enterocolitica* (je 1).

Bei einigen Isolaten ergab sich ein vager Verdacht auf Salmonellen. Die Tests mit SIM, FTIR-Spektroskopie, *Salmonella*-Ident-Agar und Antikörper-Agglutination sprachen dafür. Andererseits waren die Kolonien auf XLD und BPLS nicht typisch; auch die 16s-rDNA-Sequenzierung ergab ein eher negatives Resultat. Zur Absicherung wurden Stämme an das RKI in Berlin zur Identifizierung geschickt. Von dort wurde zweifelsfreie Entwarnung gegeben. Es handelte sich um *Enterobacter* spp. und *Klebsiella* spp. Demnach war es zu einer unspezifischen Agglutination mit dem polyvalenten *Salmonella*-Antiserum gekommen. Dies belegt die Bedeutung einer Bestätigungsreaktion für solche Fälle, damit nicht unnötiger wirtschaftlicher Schaden entsteht. Das Risiko einer Isolierung von im *Salmonella*-Agglutinationstest falsch positiven Enterobakterien ist dann weniger gegeben, wenn die Kolonien aus einer *Salmonella*-selektiven Anreicherung isoliert wurden. Bei der Untersuchung von Milch und Milchprodukten auf Salmonellen ist demnach dieser Primärschritt unerlässlich.

Schnelle Analyse von Käsereifungskulturen mit FTIR-Mikrospektroskopie

Fast analysis of cheese ripening floras by FT-IR microspectroscopy

Vera Theilmann, Mareike Wenning, Siegfried Scherer

Die Oberflächenreifungsflora von Rotschmierekäse ist sehr komplex und besteht zum überwiegenden Teil aus coryneformen Bakterien. In der Regel ist die genaue Zusammensetzung der Flora jedoch nicht bekannt, da neben eingesetzten Reifungsorganismen auch die individuelle Hausflora des produzierenden Betriebes einen wesentlichen Einfluss auf die Käsequalität haben kann. Eine Flora, deren Zusammensetzung nicht bekannt ist, lässt sich jedoch nicht standardisieren und auch nicht kontrollieren, so dass dem Betrieb ein wichtiges Mittel zur Sicherung gleichbleibender Produktqualität fehlt. Eine Methode zur einfachen Analyse gemischter Reifungsflora auch hinsichtlich ihrer quantitativen Zusammensetzung könnte einen wichtigen Beitrag zur Qualitätssicherung leisten. FTIR-Mikrospektroskopie kann hier das geeignete Verfahren sein, da Mikroorganismen ohne vorherige Isolation aus einer Probe über Infrarotspektren identifiziert werden können.

Die Probe wird in geeigneter Verdünnung auf einem festen Medium unter standardisierten Bedingungen inkubiert und die enthaltenen Mikroorganismen wachsen zu Mikrokolonien heran, die dann über eine Abstempelvorrichtung von der Agarplatte auf ein IR-transparentes Trägermaterial überführt werden. Das IR-Mikroskop kann auch als Lichtmikroskop verwendet werden und ist an das Spektrometer und einen Computer angeschlossen. Die ca. 100 µm großen, auf das Trägermaterial überführten Kolonien werden detektiert und markiert und anschließend automatisiert gemessen. Über einen Vergleich mit Referenzspektren einer vorher erstellten Datenbank können die gemessenen Kolonien identifiziert werden.

Die Erstellung der Datenbank mit Referenzspektren für coryneforme Bakterien impliziert die Erarbeitung eines standardisierten Protokolls für die Anzucht der Mikroorganismen. Der wichtigste Faktor für die Erzielung guter Spektren ist der Zeitpunkt des Transfers der Kolonien von der Agarplatte auf das Trägermaterial, da hierdurch die Größe der Kolonien determiniert wird. Aufgrund sehr unterschiedlicher Wachstumsgeschwindigkeiten der verschiedenen

Spezies wurden drei Stempelzeitpunkte bei 20, 30 und 48 h festgelegt. Für den Aufbau der Datenbank wurden 54 Stämme aus 17 Spezies gewählt; 43 Stämme wurden mit einem Spektrum abgelegt, da sie eindeutig einem Stempelzeitpunkt zugeordnet werden konnten, 11 Stämme dagegen wurden mit zwei Spektren für zwei verschiedene Stempelzeitpunkte in der Datenbank hinterlegt.

Die Anwendbarkeit der Methode wurde anschließend in einer Analyse der Oberflächenflora eines schmieregereiften Schnittkäses geprüft. Als Referenzmethode für die Identifizierung diente die bereits sehr gut etablierte FTIR-Spektroskopie mit Keimsuspensionen. Innerhalb von 4 Tagen wurden insgesamt 1000 Spektren von Mikrokolonien, verteilt auf drei Stempelzeitpunkte nach 20, 30 und 48 h, aufgenommen und mit der Referenzdatenbank identifiziert. Über den computergesteuerten Objektisch des Mikroskops können die Kolonien nach der Messung wieder exakt angesteuert, mit einem Zahnstocher vom Stempel auf eine Agarplatte überführt und nach anschließender Bebrütung mit alternativen Methoden, in diesem Fall FTIR-Spektroskopie mit Keimsuspensionen, identifiziert werden. In unserer Analyse wurden stichprobenartig ca. 130 Kolonien vom Stempel gepickt und die Identifizierungen der Mikrospektroskopie zum großen Teil bestätigt. Abb. 1 zeigt das Dendrogramm der Messungen nach 48 Stunden. Die Flora des untersuchten Käses setzt sich demnach aus mindestens vier verschiedenen Organismen zusammen; *Staphylococcus equorum*, *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium ammoniagenes/casei* (diese beiden Spezies sind phänotypisch sehr ähnlich und darum kaum zu unterscheiden) bzw. *Corynebacterium glutamicum* und einer Spezies, die bisher noch nicht identifiziert werden konnte.

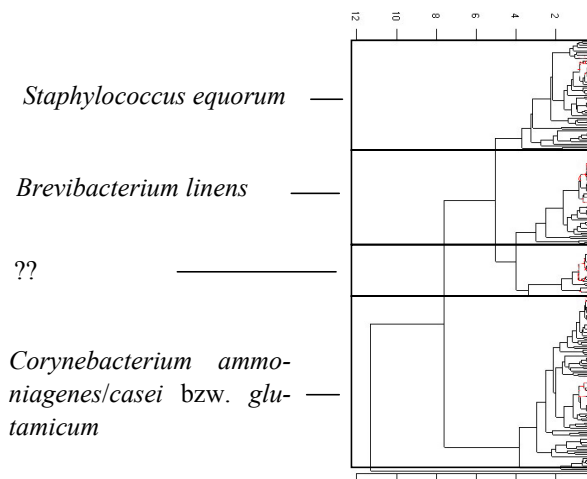


Abb. 1: Dendrogramm der Messungen des Stempelzeitpunktes 48 h mit Zuordnung der Identifizierungen.

Innerhalb einer Woche ist es uns gelungen, mit einer großen Stichprobe von 1000 Mikrokolonien die komplette aerobe Flora eines Schnittkäses quantitativ zu analysieren. Zudem konnten die Identifizierungen der Mikrospektroskopie durch FTIR-Spektroskopie mit Ausnahme der noch nicht in der Datenbank vertretenen Organismen bestätigt werden. Die Benennung der

noch nicht identifizierten Spezies und der nicht eindeutig identifizierten Organismen soll mit 16S rDNA-Sequenzierungen geklärt werden.

Arbeitsgruppe:

Mikrobiologie von oberflächengereiften Käsen

Gruppenleiter: Siegfried Scherer

Die Zusammensetzung der Reifungsflora von Rotschmiereweichkäsen aus Deutschland (Limburger, Romadur) oder Frankreich (z.B. Münster, Epoisses) ist außerordentlich komplex.

Für die Produktion von Rotschmierekäsen ist die Entwicklung einer fehlerfreien, geschlossenen Schmiereoberfläche unerlässlich. Um Käse mit einem hohen Qualitätsstandard zu produzieren, wird bei der Herstellung in kleineren und auch größeren Betrieben die traditionelle Methode des „Alt-Jung-Schmierens“ verwendet. Mit dem Schmierevorgang wird dabei erwünschte mikrobielle Flora von bereits gereiften auf die „jungen“ Käse übertragen.

Jedoch können dabei auch unerwünschte, pathogene Mikroorganismen wie z.B. *Listeria monocytogenes* immer wieder auf die neuen Produktionschargen übertragen werden und sich zu hohen Keimzahlen auf der Oberfläche entwickeln. Eine rasche Entwicklung der Oberflächenflora verhindert das Wachstum von diesen unerwünschten und/oder pathogenen Mikroorganismen und trägt daher entscheidend zur Qualitäts-, wie auch Produktsicherung bei. Allerdings weisen die Schmierekulturen, wenn sie aus der Flüssigkultur auf den jungen Käse übertragen werden häufig eine verzögerte Anwachsrate auf. Die Bakterien sind am Käse starken abiotischen Stressoren (niederer pH, hohe Salzkonzentration, tiefe Temperaturen) ausgesetzt und eine gezielte Streß-Antwort auf diese Umweltbedingungen ist für die schnelle Entwicklung einer geschlossenen Schmiereoberfläche unerlässlich. Dass Rotschmiere-bakterien die Fähigkeit haben am Käse zu überleben impliziert, dass spezielle Mechanismen in den Bakterien existieren, sich an die geänderten Umweltbedingungen anzupassen. Die molekularbiologischen Faktoren der Stressantwort von Coryneformen Bakterien sind bisher unbekannt. Das Ziel dieses Projekts ist, auf molekularer wie auch proteinanalytischer Ebene, ein besseres Verständnis für das Verhalten von Rotschmierebakterien auf der Käseoberfläche zu erwerben um in Zukunft Schmierekulturen zu erzeugen, die gegenüber Stressoren toleranter und daher für den Einsatz in der Rotschmierekäseproduktion geeigneter sind.

Adaptation von Reifungskulturen an sauren pH

Acid adaptation of cheese ripening strains

Kinga Kiss, Barbara Silakowski, Siegfried Scherer

Käsereifung ist ein komplexer Prozess, der vor allem Glykolyse, Fettspaltung und Proteolyse umfasst. Während des Reifungsprozesses werden Hefen (*Debaryomyces hansenii*) und Bakterien (Coryneforme, Staphylokokken) von bereits gereiften auf die grünen Käse übertragen. Diese Mikroorganismen sind u. a. für das charakteristische Aroma eines Käses verantwortlich. Da die Reifung ein langwieriger und aufwendiger Prozess ist, zeigt die Käseindustrie großes Interesse an der Verkürzung dieser Zeit.

Während des Reifungsprozesses spielt der Säure-Abbau eine Hauptrolle. Am Anfang des Reifestadiums liegt der pH des Käses im sauren Bereich (pH 5.5), so dass nur die säure-toleranten Hefen in der Lage sind, darauf zu wachsen. Das Wachstum der Bakterien beginnt dann erst, wenn der pH des Käses alkalischer wird. Daraus kann man folgern, dass der Reifungsprozess beschleunigt werden kann, wenn die Bakterien adaptiert wären, bei pH 5.5 zu wachsen.

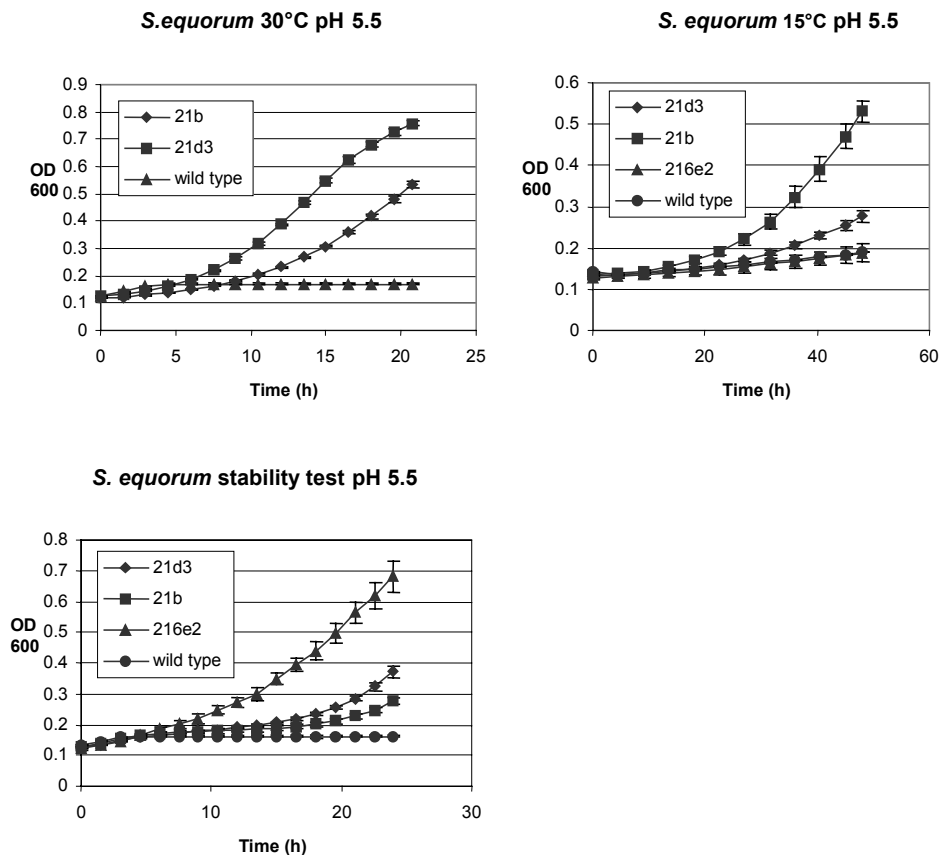


Abb 1: Wachstumskurven von *S. equorum* und den pH-adaptierten Mutanten

Von den Oberflächen-Reifungskulturen, *Corynebacterium variabile*, *C. ammoniagenes*, *Staphylococcus equorum* und *Kocuria palustris*, wurden mit Hilfe von pH-Gradienten-Agarplatten Kolonien isoliert, die bei pH 6 bzw. pH 5.5 wuchsen. Die Wachstumseigenschaften der so erhaltenen pH-Mutanten wurden bei 15°C und 30°C mit einem honeycomb well reader, Bioscreen C überprüft. Die Stabilität der Mutanten wurde so überprüft, indem sie für 24 Stunden bei pH 7,2 bebrütet wurden, und dann wieder bei dem pH weiter inkubiert wurden, auf den sie adaptiert wurden. Die pH-Mutanten der vier Stämme wuchsen bei 30 °C und niedrigem pH wesentlich besser als die entsprechenden Wildtyp-Stämme. Die pH-Mutanten von *C. variabile* und *S. equorum* wuchsen bei 15°C wesentlich besser als der Wildtyp. Jedoch verlieren diese beiden Mutanten ihre vorteilhaften Veränderungen, nach einer 24-stündigen Bebrütung bei neutralem pH. Die Wachstumsraten der pH-Mutanten von *C. am-*

moniogenes und *K. palustris* waren gleich bzw. schlechter als die der jeweiligen Wildtypen bei 15°C. Jedoch sind diese Mutanten in der Lage die erworbenen vorteilhaften Veränderungen nach einer 24-stündigen Bebrütung bei pH 7,2 beizubehalten.

Temporal stability and biodiversity of two complex, anti-listerial cheese ripening microbial consortia.

Ariel Maoz, Ralf Mayr and Siegfried Scherer

The development of the microbial consortia during the ripening of red smear cheeses is achieved by transferring ripening cultures onto the surface of younger ones according to the old young smearing method. In the present study temporal stability, and diversity of, bacterial species composition as well as anti-listerial potential of two different, complex and undefined microbial consortia (R and K) from red smear soft cheeses was investigated.

Organisms	No. of isolates			
	Factory R		Factory K	
	A	B	A	B
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	-	4	90	76
<i>Brevibacterium linens</i>	7	4	2	22
<i>Corynebacterium variabile</i>	83	80	-	-
<i>Corynebacterium casei</i>	4	1	-	-
<i>Microbacterium gubbeenense</i>	-	5	-	-
Unknown Gram positive coccus	6	4	-	-
<i>Marinolactobacillus psychrotolerans</i>	-	-	2	1
Unknown lactic acid bacterium	-	2	-	-
<i>Halomonas venusta</i>	-	-	3	-
<i>Halomonas variabilis</i>	-	-	1	1
<i>Halomonas</i> sp.	-	-	2	-
Total	100	100	100	100

Table 1: Composition of two undefined surface floras derived from German commercial mature red smear soft cheeses produced in factory R and K, respectively. Each flora was derived at the beginning (A) and at the end (B) of a six-month period from retail red smear cheeses. The total cell counts of consortium R at sampling (A) and (B) were 4.0×10^9 CFU/g smear and 3.2×10^9 CFU/g smear, respectively. The total cell counts of consortium K at sampling (A) and (B) were 2.9×10^8 CFU/g smear and 3.8×10^8 CFU/g smear, respectively.

Samples from two food producers (R and K) were collected two times (A and B) each in six months intervals and a total of 400 bacterial isolates were identified by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy and 16S rDNA sequence analysis. Coryneform bacteria represented the majority of the isolates (94.5% of the total isolates), with certain species being predominant (Table 1). In addition, *Marinolactobacillus psychrotolerans*, *Halomonas venusta*,

Halomonas variabilis, *Halomonas* sp. (10^6 between 10^7 cfu per gram) and unknown Gram positive bacteria (10^7 between 10^8 cfu per gram) are described for the first time in this environment (Table 1). The composition of consortium R was quite stable within a period of six months. At both time points of sampling the dominant species was *Corynebacterium variabile* (83% and 80%, respectively), while no Gram negatives were isolated (Table 1). Consortium K appeared to be very different. It was dominated by a species of another genus and revealed less diversity of the coryneform subflora on the species level, as well as less stability of the composition over time. The most significant change was an increase of the proportion of *Brevibacterium linens* up to 22% of the isolates at the second sampling, compared to 2% at the first sampling (Table 1). Alongside this increase, the proportion of the dominant *Arthrobacter nicotianae* dropped from 90% to 76%.

The *in situ* evaluation of the antilisterial activity yielded major flora differences, too. While consortium R had a stable, extraordinary high antilisterial potential *in situ* (Fig.1), the antilisterial activity of consortium K was lower and it decreased with time (data not shown).

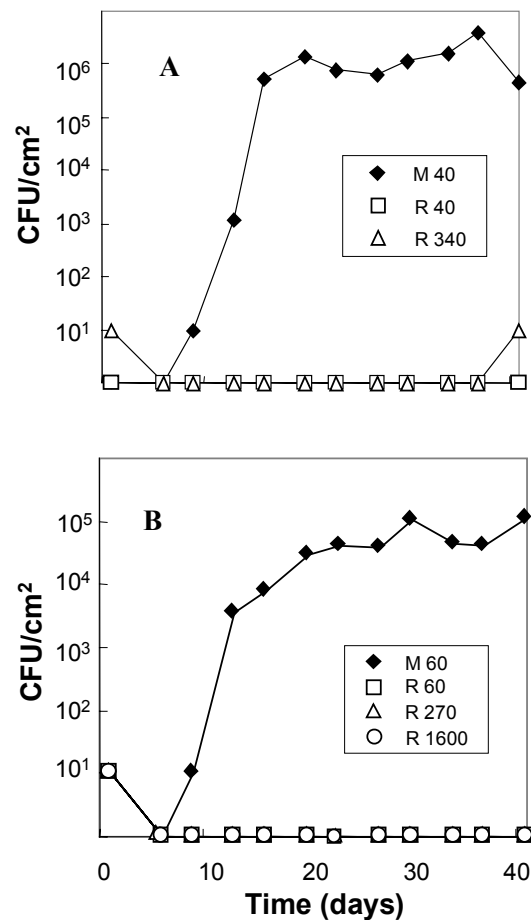


Fig. 1: Growth of *Listeria monocytogenes* on soft cheese in the presence of the complex undefined red smear surface consortium R after contamination at day 1. The ex-

perimental series (A) and (B) were performed with floras harvested from mature retail red smear soft cheeses of factory R, with production dates six months apart. The numbers in the legend indicate the contamination level per ml smear water. Flora M served as a control. It is a defined culture derived from red smear soft cheese of factory M.

The cause for the anti-listerial activity of the two consortia remained unknown, but is not due to the secretion of soluble, inhibitory substances. Our data indicate that the stability over time, and a potential anti-listerial activity, are individual characteristics of the ripening consortia which can be monitored and used for a safe food production without artificial preservatives.

DNA-Microarray Analyse der pH-Stressantwort von *Corynebacterium glutamicum*

*DNA microarray analysis of the pH stress response in *Corynebacterium glutamicum**

Peter Satorhelyi, Barbara Silakowski, Volker Wendisch

Bakterien sind in ihrer natürlichen Umgebung ständig wechselnden Lebensbedingungen ausgesetzt. Zur Anpassung an diese Verhältnisse müssen sie als erstes bestimmte Umweltparameter als Signal wahrnehmen. Erst dann kommt es zu einer spezifischen Stressantwort, veränderter Genregulation und letztendlich zur Synthese spezieller Proteine. Im Fall des pH-Stresses zu der Expression sogenannter pH-Stressantwortproteine. Die pH-Stressantwort spielt eine existentielle Rolle sowohl bei pathogenen Bakterien als auch bei fermentativen Mikroorganismen, die in der Lebensmittelproduktion zum Einsatz kommen. Beim pH-Stress unterscheidet man zwischen einer sofortigen pH-Schockantwort und die über einen längeren Zeitraum wirkende pH-Adaptation.

Ziel dieses Projekts ist die Untersuchung der molekularen Antwort von *Corynebacterium glutamicum* auf Säure-Stress. *C. glutamicum* ist ein Gram-positives Bodenbakterium mit wirtschaftlicher Relevanz in der L-Glutaminsäure und L-Lysin Produktion.

Für die Bestimmung der Zellantwort auf sauren pH wurden zwei kontinuierliche Fermentationen in einem Turbidostat durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen vom neutralen pH 7,5 auf pH 5,7 gebracht.

Die Veränderungen im Transkriptionsmuster der pH-adaptierten Zellen wurde mittels DNA-Microarray, der PCR-Produkte aller ca. 3500 annotierten ORFs trägt, untersucht. In den an pH 5,7 adaptierten *C. glutamicum* Zellen stieg der RNA Level von 28 Genen um mehr als Faktor vier und der von 3 Genen fiel um mehr als Faktor vier. Um den Effekt dieser Gene während der pH-Stressantwort zu bestätigen, wurden Deletionsmutanten hergestellt. Dazu wurde zuerst ein interner Teil des zu deletierenden Gens (ca. 300 bp) über PCR amplifiziert. Dieses Fragment wurden in ein Plasmid kloniert, das eine Kanamycin-Resistenz trägt und nicht in *C. glutamicum* replizieren kann. Nach Elektroporation von *C. glutamicum* mit dem Plasmid und Selektion auf Kanamycin können nur diejenige Zellen überleben, die das Plasmid durch homologe Rekombination in ihr Genom integriert haben. Durch die Integration des Plasmides kommt es zur Deletion in dem zu inaktivierenden Gen. Wenn dieses Gen nun eine wichtige Rolle beim Überleben und Wachstum im sauren pH hat, dann sollte die Mutante eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Säure zeigen.

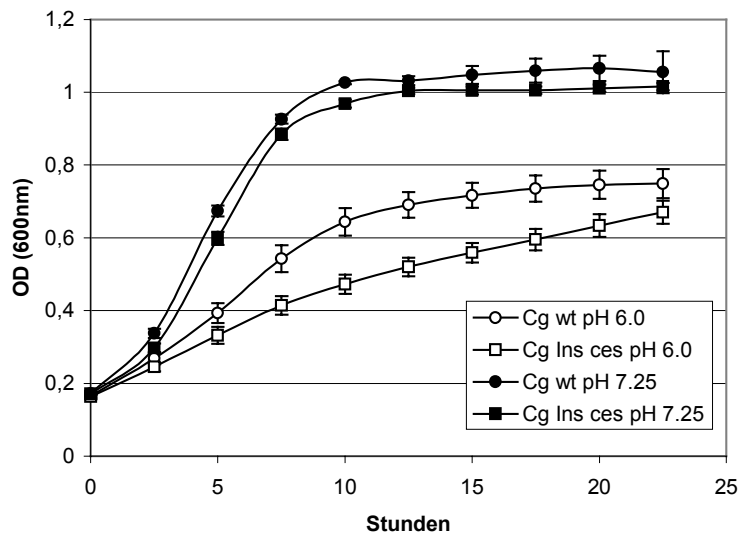


Abb.:1: Vergleich der Wachstumsraten des *C. glutamicum* Wildtypstammes bei pH 7.25 (○) und pH 6.0 (●) mit der von ORF2779(ces-cation efflux system)-Deletionsmutante bei pH 7.25 (□) und pH 6.0 (■).

Bisher wurden von sieben unter pH-Stress verstärkt exprimierten Genen Deletionsmutanten hergestellt. Nur die Mutante des ORF2779 zeigt eine erhöhte Sensitivität gegenüber Säure (Abb. 1). ORF2779 kodiert für ein Protein, das eine hohe Homologie zu einem bekannten Kationeneffluxsystem aufweist. Um weitere Einblicke in die komplexe Antwort von *C. glutamicum* während der pH-Adaptation zu gewinnen, sollen weitere hochregulierte Gene inaktiviert und charakterisiert werden.

Arbeitsgruppe:

Mikrobielle Ökologie lebensmittelrelevanter Krankheitserreger

Gruppenleiter: Siegfried Scherer

Fast alle Mikroorganismen besitzen Regulationsmechanismen, die es ihnen erlauben, sich an verschiedene Stressbedingungen zu adaptieren. Hierzu gehören Osmostress, Sauerstoffstress, Veränderungen des pH, Hitze, Kälte und andere. Im Lebensmittelbereich spielt die Anpassung von Mikroorganismen an Kälte eine besondere Rolle, weil man viele Lebensmittel durch Kühlung vor dem Verderb schützen möchte. Durch eine immer besser funktionierende Kühlkette bilden kältetolerante Mikroorganismen ein immer größeres Problem, denn einige Mikroorganismen überleben oder vermehren sich problemlos in der Kälte und bewirken dann einen Verderb. Bei Pathogenen besteht zusätzlich die Gefahr von Lebensmittelvergiftungen. Untersuchungen in diesem Problemfeld sind wichtig, um die Lebensmittelverarbeiter und nachfolgend die Verbraucher vor Schäden und Krankheiten zu bewahren.

In unserer Gruppe werden zu diesem Themenkomplex zum einen das gram negative *Yersinia enterocolitica*, zum anderen die gram positiven Bazillen der *Bacillus cereus*-Gruppe untersucht. *Y. enterocolitica* ist mit steigenden Fallzahlen an Lebensmittelvergiftungen beteiligt. Dies ist wahrscheinlich seiner extremen Psychrotoleranz (Wachstum bis -5°C) zuzuschreiben. Hauptquelle sind tierische Lebensmittel wie Fleisch und Milch. Der mesophile *Bacillus cereus*, sowie dessen nah verwandter psychrotoleranter *Bacillus weihenstephanensis* sind Verderberreger der Milch. Durch ihre Sporen überleben sie Pasteurisation und das nachfolgende Wachstum von *B. weihenstephanensis* limitiert die Haltbarkeit der Milch. Zudem sind diese Organismen Toxinbildner.

Kälteschockinduktion und transkriptionelle Analyse einer DEAD-Box RNA-Helicase des psychrotoleranten Pathogens *Yersinia enterocolitica*

Cold shock induction and transcriptional analysis of the DEAD box RNA helicase in the psychrotolerant pathogen Yersinia enterocolitica

Nataša Anastasov Siegfried Scherer

Kältetolerante Bakterien stellen im Lebensmittelbereich ein großes Problem dar. *Yersinia enterocolitica* ist ein extremes Beispiel für ein solches „psychrotolerantes“ Bakterium, da es bis zu Temperaturen von -5°C noch zum Wachstum befähigt ist, während *E. coli* bereits bei 8°C ein Wachstumsminimum erreicht.

Nach einem Kälteschock (plötzliche Temperaturabnahme) werden neben den sogenannten „Hauptkälteschockproteinen“ (mCsp) auch andere Proteine synthetisiert, wie zum Beispiel die PNPase und die DEAD-Box RNA-Helicase. Diese spielen eine entscheidende Rolle bei der Kälteadaptation von *E. coli* und werden daher von uns in *Y. enterocolitica* untersucht. Die Sequenzierung des kompletten *pnp-nlp1-deaD*-Locus wurde mit Hilfe von PCR, inverser PCR und Primer-walking durchgeführt. Die Transkription des *pnp-nlp1-deaD* Locus wurde mittels Northern-Blot und Primer-Extension analysiert. Dabei entdeckten wir spezifische *pnp* and *deaD2* Promotoren in der *pnp-nlp1-deaD*-Genregion (Abb. 1).

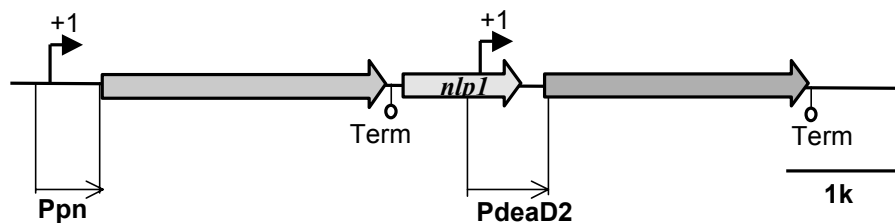
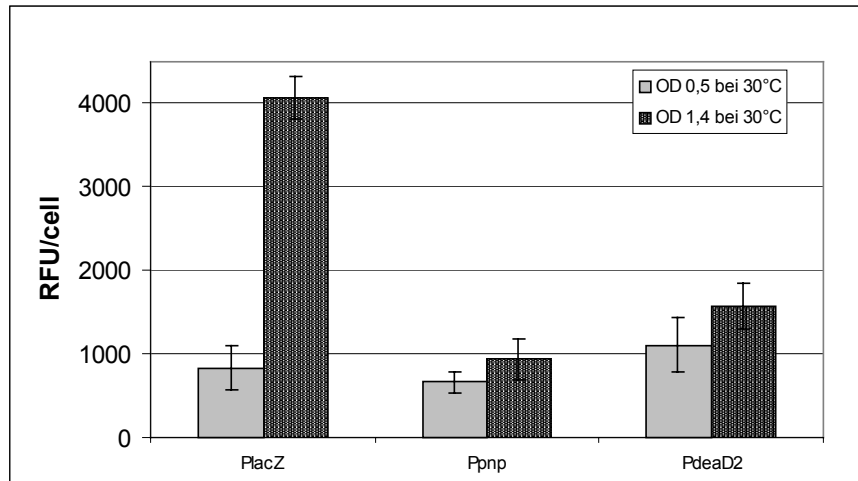


Abb. 1: Überblick über den *pnp-nlp1-deaD*-Genlocus aus *Y. enterocolitica*. Die Pfeile markieren entsprechende Genposition. +1 ist der Transkriptionsstart, der durch Primer-Extension-Experimente ermittelt wurde. „Term“ ist der Terminatorsequenz. Die untere Pfeile markieren die Bereiche, die zur Erstellung der transkriptionellen Fusionen mit *egfp* eingesetzt wurden.

A)



B)

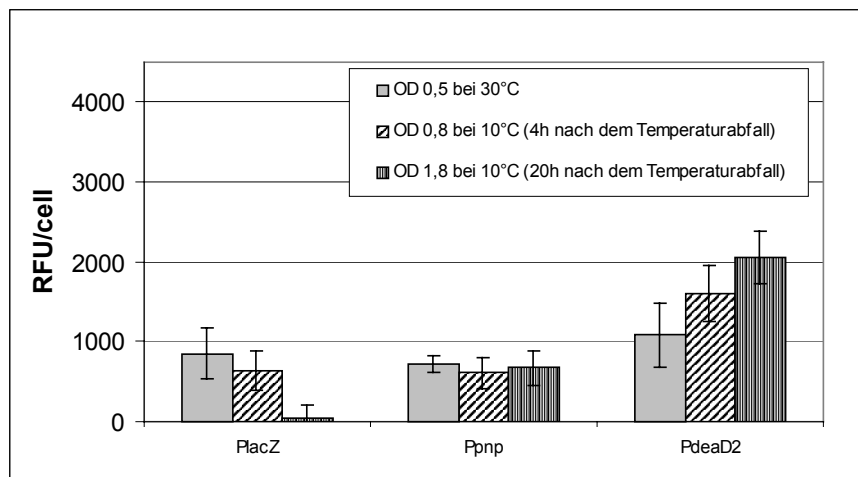


Abb. 2: Die Säulen zeigen die gemessene Fluoreszenz ausgehend (A) der induzierten Promotoren bei 30°C und (B) nach dem Kälteschock von 30°C auf 10°C.

Zur weiteren Analyse der Promotorregionen wurden spezifische Bereiche (Abb. 1) vor ein Reportergen kloniert. Bei dem Reportergen handelt es sich um *egfp* (Enhanced Green Fluorescent Protein), eine Variante des nativen *gfp*-Genes, welche im Vergleich zum wildtypischen GFP eine verstärkte und stabilere Fluoreszenz aufweist. Als Kontrolle wurde der mit dem *egfp* Reportergen fusionierte *lacZ* Promotor eingesetzt. Zellen von *Y. enterocolitica* wurden mit den vektoriellen Konstrukten, die eine transkriptionelle Fusion zwischen den einzelnen Promoterfragmenten und dem *egfp*-Gen trugen, transformiert. Anschließend wurden die

jeweiligen Promotoraktivitäten bei 30°C und 10°C mittels eines Multilable-Zählers für Fluoreszenz-Messungen vorgenommen. Abb. 2 zeigt, dass der *lacZ* Promotor, welcher als Kontrolle dient, sehr hohe Aktivität bei 30°C und keine Aktivität bei 10°C hat. Die Aktivität des *pnp* Promotors bei 30°C und 10°C bleibt konstant, während der *deaD2*-Promotor bei 30°C und noch besser bei 10°C aktiv ist. Solche unterschiedlichen Promotoraktivitäten können für biotechnologische Prozesse und die Produktion von Proteinen bei niedrigen Temperaturen von großem Nutzen sein.

Identifizierung kälteinduzierter Gene in der Kälteadaptationsphase bei dem psychrotoleranten Lebensmittelpathogen *Yersinia enterocolitica*

*Identification of cold-induced genes of the cold-adaptation-phase in the psychrotolerant food pathogen *Yersinia enterocolitica**

Geraldine Bresolin, Thilo M. Fuchs, Siegfried Scherer

Yersinia enterocolitica ist ein psychrotoleranter, humanpathogener Mikroorganismus, welcher durch kontaminierte Nahrungsmittel und Trinkwasser auf den Menschen übertragen wird. Im Menschen kann eine Infektion mit *Y. enterocolitica* eine akute Gastroenteritis auslösen, die meist jedoch ohne weitere Behandlung wieder abklingt. Das Vorkommen von *Y. enterocolitica* in Lebensmitteln ist insofern bedenklich, da dieser Organismus die Fähigkeit besitzt bei Kühlschranktemperaturen zu überleben und zu proliferieren.

Die Reaktion auf Kältestress in Bakterien lässt sich in zwei Phasen unterteilen. Unmittelbar nach einer Temperaturabnahme tritt die sogenannte Kälteschockantwort ein, die sich besonders durch die transiente Überexpression der Hauptkälteschockproteine auszeichnet, welchen eine entscheidende Funktion im ersten Schritt der Anpassung an Kälte zugeschrieben wird. Daran anschließend folgt die Kälteadaptationsphase. Diese zeichnet sich durch die Expression sogenannter Kälteadaptationsproteine aus, welche bei niedrigen Temperaturen in einem höheren Ausmaß synthetisiert werden als unter optimalen Temperaturen.

Ziel dieses Projekts ist die molekularbiologische Charakterisierung der bislang noch wenig erforschten Kälteadaptationsphase, die vermutlich entscheidend dazu beiträgt, dass psychrotolerante Mikroorganismen, im Gegensatz zu mesophilen Mikroorganismen, ein Wachstum bei niedrigen Temperaturen möglich ist.

Die Untersuchung der Kälteadaptationsphase bringt die Schwierigkeit mit sich, dass das Bakterienwachstum bei niedrigen Temperaturen im Vergleich zum Wachstum bei optimaler Temperatur stark beeinträchtigt ist. *Y. enterocolitica* weist bei 30°C eine Verdopplungszeit von 45 Minuten auf, während sich die Zellen bei 10°C nur noch alle 4,5 Stunden teilen (Abb.1). Die Berücksichtigung dieses Kriteriums bei der Identifizierung neuer Kälteadaptationsproteine war bislang kaum möglich, da die dafür am häufigsten angewandte Methode, nämlich die 2D-Gelelektrophorese, für die Erfassung mehrerer paralleler Messpunkte zu aufwendig wäre.

Die Identifizierung kälteinduzierter Gene in *Y. enterocolitica* während des fortdauernden Wachstums im Kalten wurde durch einen Screening-Assay unter Einsatz eines promoterlosen Luciferase-Reportersystems erzielt. Mit diesem Versuchsaufbau war es möglich, die Korrelation zwischen Bakterienwachstum und Promotoraktivität über einen längeren Zeitraum zu

messen. Mit Hilfe einer Transposonmutagenese wurden zufällig transkriptionale Fusionen zwischen chromosomalen Promotoren und dem *lux*-Reporter generiert. Ein kälteinduziertes Gen lässt sich damit relativ einfach detektieren, da eine entsprechende Transposonmutante eine höhere Lichtemission bei niedrigen Temperaturen aufweist als unter optimaler Temperatur, was wiederum von der erhöhten Promotoraktivität herrührt.

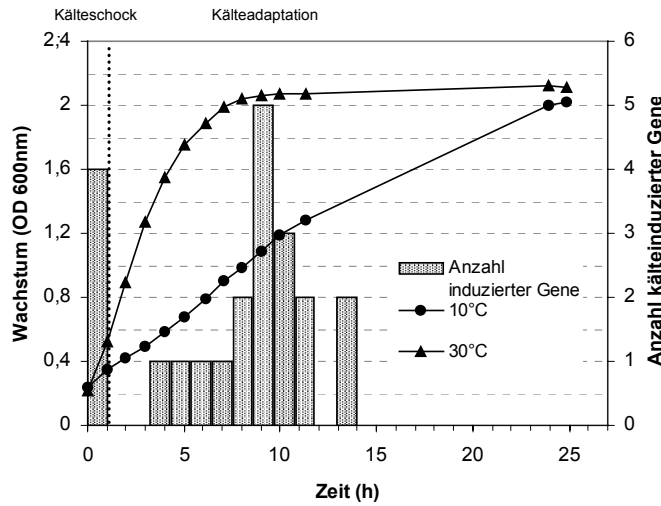


Abb.1: Wachstumskurven von *Y. enterocolitica* bei 30°C und 10°C. Die Säulen geben die Anzahl kälteinduzierter Gene während der jeweiligen Wachstumsphasen bei 10°C wieder.

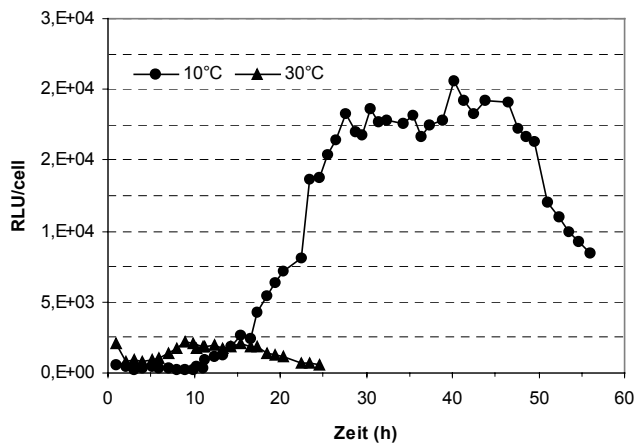


Abb.2: Lumineszenzkurven einer Transposonmutante bei 30°C und 10°C.

Insgesamt wurden 5700 Transposonmutanten hinsichtlich ihres Wachstums und ihrer Lichtemission bei 30°C sowie bei 10°C untersucht. Es konnten 21 verschiedene Gene mit erhöhter Promotoraktivität im Kalten detektieren und sequenziert werden, beispielhaft sind in

Abb.2 die entsprechenden Lumineszenzkurven einer Transposonmutante bei 10°C und 30°C dargestellt. Die Gene ließen sich zu folgenden funktionalen Gruppen zusammenfassen: Regulation, Transport, Motilität, Signaltransduktion, Metabolismus und Pathogenität. Die meisten dieser Gene wurden bislang noch nicht mit Kältestress in Verbindung gebracht. Wie in Abb. 1 ersichtlich ist, scheint die späte lineare Wachstumsphase, welche der späten exponentiellen Wachstumsphase bei normaler Temperatur entspricht, einen besonderen Stellenwert in der Kälteadaptation einzunehmen, da in dieser Phase die meisten kälteinduzierten Gene detektiert wurden. Welche Rolle diese Phase bei der Kälteadaptation und welche Funktionen die identifizierten kälteinduzierten Gene spielen, soll in weiteren Versuchen analysiert werden.

Enterotoxine und Cytotoxizität des psychrotoleranten Lebensmittelverderbers *Bacillus weihenstephanensis*

*Enterotoxins and cytotoxicity of the psychrotolerant food spoilage bacterium *Bacillus weihenstephanensis**

Ralf Mayr, Lotte Stenfors, Per Einar Granum, Siegfried Scherer

Pathogene und Lebensmittel verderbende kältetolerante Bakterien in Nahrungsmitteln sind aus Sicht des Verbraucherschutzes und der Lebensmittelsicherheit von zentraler Bedeutung. Aufgrund der sich ändernden Ernährungsgewohnheiten in den westlichen Kulturen wird diese Bedeutung noch größer werden. Der Trend zu Convenience Food aller Art nimmt stetig zu und wird weiterhin stark steigen. Die entsprechenden Produkte werden gekühlt vertrieben und mit immer längeren Haltbarkeitsfristen versehen.

Aufgrund seines ubiquitären Vorkommens und seiner hitzeresistenten Sporen ist das erst vor kurzem von uns beschriebene Bodenbakterium *Bacillus weihenstephanensis* in vielen rohen, teilverarbeiteten und ganz zubereiteten Lebensmitteln und Speisen als kältetoleranter Verderbskeim nachweisbar. Bislang war nicht geklärt, ob diese Spezies auch als Lebensmittelvergifter eine Gefahr darstellt. Um diese Frage zu beantworten, wurden 50 aus Milch isolierte *Bacillus weihenstephanensis* Stämme untersucht, ob auch hier das bei der eng verwandten mesophilen Art *Bacillus cereus* nachweisbare pathogene Potential vorhanden ist.

B. cereus wirkt teilweise cytotoxisch. Neben einem emetischen Toxin produziert diese Spezies mindestens drei Enterotoxine, welche zu Lebensmittelvergiftungen mit Diarrhoe führen. Das hämolytische Enterotoxin Hbl besteht aus drei Proteinen (B, L₁, L₂). Das Enterotoxin Nhe besteht ebenfalls aus drei Proteinen, ist jedoch nicht hämolytisch. Das dritte Enterotoxin wurde kürzlich nach einem Ausbruch in Frankreich mit drei Todesfällen beschrieben. Dieses CytK bezeichnete Toxin besteht aus einem Protein von 34kDa mit nekrotischer und hämolytischer Wirkung.

Von allen 50 *Bacillus weihenstephanensis* Stämmen wurde die cytotoxische Aktivität in einem Zellkulturtest analysiert. Dieses Assay ermittelt die Hemmung der Proteinsynthese in Vero Zellen aufgrund des (reduzierten) Einbaus von radioaktivem [¹⁴C]Leucin. Darüber hinaus wurden 23 ausgewählte Stämme mittels PCR auf die Anwesenheit von Genabschnitten untersucht, die für die drei Enterotoxine Hbl, Nhe und CytK codieren. Zusätzlich wurde für diese 23 Stämme die Produktion von Enterotoxinen mit zwei kommerziellen immunologischen Testkits der Hersteller Oxoid und TECRA® International getestet.

Tab. 1: Cytotoxizität von 50 *Bacillus weihenstephanensis* Stämmen und Nachweis von Enterotoxin-Genen und -Proteinen mittels PCR und immunologischer Tests.

Stammnummer	Cytotoxizität ²	<i>HblD</i> (L ₁)	<i>nheB</i> (39kDa)	<i>cytK</i>	Oxoid kit (L ₂)	TECRA® kit (41 kDa)
WSBC 10201	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10202	+++	+	+	-	-	+
WSBC 10203	++(+)	+	+	-	+	+
WSBC 10204 ³	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10206	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10208	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10209	++(+)	-	+	-	-	+
WSBC 10210	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10211	++	+	+	-	-	+
WSBC 10212	+	+	+	-	-	+
WSBC 10377	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10378	++	+	+	-	+	+
WSBC 10379	++	+	+	-	+	+
WSBC 10380	-	-	+	-	-	+
WSBC 10381	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10382	++	+	+	-	+	+
WSBC 10383	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10384	-	+	+	-	-	+
WSBC 10385	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10386	-	-	+	-	-	-
WSBC 10387	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10388	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10389	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10390	++(+)	+	+	-	+	+
WSBC 10391	+	+	+	-	+	+
WSBC 10392	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10393	-	-	+	-	-	+
WSBC 10394	+++	-	+	-	-	+
WSBC 10395	-	-	+	-	-	+
WSBC 10396	++(+)	+	+	+	+	+
WSBC 10397	+	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10398	-	+	+	-	-	+
WSBC 10399	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10400	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10401	-	-	+	-	-	+
WSBC 10402	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10403	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10404	+	+	+	-	-	+
WSBC 10405	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10406	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10407	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10408	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10409	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10410	-	+	+	-	-	+
WSBC 10411	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10412	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10413	-	-	+	-	+	-
WSBC 10414	-	NG	NG	NG	NG	NG
WSBC 10415	-	-	+	-	+	-
WSBC 10416	-	NG	NG	NG	NG	NG

¹Bei den PCR Ergebnissen bedeutet "+" die Amplifikation einer Bande korrekter Länge; "-" bedeutet, dass mittels Gelelektrophorese kein PCR-Produkt nachweisbar war.

²Hemmung der Proteinsynthese in Prozent, nach Zugabe von 100µl Testlösung.

>90% = +++, 80-90% = ++(+), 50-80% = ++, 30-50% = +, 20-30% = ±, <20% = -.

NG = nicht getestet

Beim Oxoid Kit werden mit Antikörpern beschichtete Latexpartikel verwendet, welche die L₂ Einheit (codiert durch *hblC*) des hämolyten Enterotoxins Hbl nachweisen. Der TECRA® Test wird in Antikörper beschichteten Wells durchgeführt und detektiert die 41-kDa Einheit des nicht hämolytischen Enterotoxins Nhe (codiert durch *nheA*). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Sechs der 50 getesteten *Bacillus weihenstephanensis* Stämme waren stark cytotoxisch. Ihre Hemmung der Proteinsynthese um $\geq 80\%$ ist der Cytotoxizität von Lebensmittel vergiftenden *B. cereus* Stämmen vergleichbar. 72% der Stämme waren im vorliegenden Test nicht cytotoxisch. Mittels PCR war in allen 23 getesteten Stämmen das Gen für das 39kDa Protein des nicht hämolytischen Enterotoxins Nhe nachweisbar. Bei 14 Stämmen verlief auch der PCR-Nachweis für die L₁ Komponente des hämolytischen Enterotoxins positiv. Nur ein Stamm trug das Gen für das dritte Enterotoxin, CytK, welches auch in *B. cereus* sehr selten vorgefunden wird. Die z.T. unterschiedlichen Resultate von PCR und korrespondierenden immunologischen Test beruhen v.a. darauf, dass jeweils unterschiedliche Komponenten des betreffenden Enterotoxins nachgewiesen wurden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass cytotoxische Aktivität und Gene für essentielle Pathogenitätsfaktoren auch in der Art *Bacillus weihenstephanensis* weit verbreitet sind. Außerdem wurde der Nachweis erbracht, dass viele Stämme solche Faktoren unter den getesteten Bedingungen auch tatsächlich bilden.

Dissertationen und Diplomarbeiten

Dissertationen

Vukov, Natasa: „Functional analysis of heterologous holin proteins in a λ Δ Sthf genetic background.“

Zimmer, Markus: „Complete Genome Sequence and Characterization of the Lysis System of the temperate *Clostridium perfringens* Bacteriophage ϕ 3626.“

Loewe, Laurence: „Evolutionary Bioinformatics: Predicting Gene Stability of Asexual Genomes by Global Computing.“

Diplomarbeiten

Schmitz, Markus: „Untersuchungen zur Betriebshygiene an verschiedenen Produktionslinien in einem lebensmittelverarbeitendem Betrieb.“

Günther, Susanne: „Einsatz von verschiedenen bacteriocinbildenden Bakterienstämmen zur Hemmung von *Listeria monocytogenes* auf der Oberfläche von Rotschmiereweichkäse.“

Fricke, Martina: „Die Auswirkung der Reifungstemperatur auf die Zusammensetzung und die antilisterielle Aktivität von bakteriellen Rotschmiere-Oberflächenkulturen.“

Korn, Corinna: „Zellwandbindende Domänen von Phagenlysinen zur Anreicherung und Erfassung von *Listeria*.“

Michl, Angelika: „Nachweis der aeroben Gesamtkeimzahl, sowie der aeroben Koloniezahlen von *E. coli*, coliformen Bakterien und *Enterobacteriaceae* in Milch und Milchprodukten mit dem MicroFoss-Verfahren – Überprüfung der Praxistauglichkeit einer neuen Schnellmethode.“

Gleich, Ingrid: „Keimdauer von Sporen psychrotropher Clostridien in gekühlten realen Lebensmitteln.“

Beratung

Im Jahr 2002 wurden wiederum zahlreiche Molkereien sowie lebensmittelverarbeitende Betriebe bei mikrobiologisch bedingten Betriebsstörungen beraten. Mitarbeiter des Institutes beteiligten sich in verschiedenen Fällen aktiv an der Fehlersuche, bei der Ortsbegehungen durchgeführt, Vorschläge zur Verbesserung der Qualitätssicherung gemacht und der Funktionszustand von Anlagen überprüft wurde. Bei Schadensfällen wurden direkt vor Ort Störfallanalysen erstellt und Proben für die Laboruntersuchung gezogen.

Lehre, Vorträge

Lehre

	Wintersemester		Sommersemester	
	Vorlesung	Übung	Vorlesung	Übung
Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau				
<i>Milchwissenschaft / Ökotröphologie</i>				
Allgemeine Mikrobiologie	2	3	-	-
Lebensmittelmikrobiologie	-	-	2*	3
Mikrobiologie der Milch und Milchprodukte	1	3	-	-
<i>Pflanzenproduktion / Gartenbau</i>				
Allgemeine Mikrobiologie	2	-	-	-
Mikrobielle Ökologie	-	-	2**	2
Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften				
<i>Technische Biologie</i>				
Molekulare Genetik	2	-	-	-
Technische Mikrobiologie (Großpraktikum)	-	20	-	20
<i>Angewandte Ökologie</i>				
Mikrobielle Ökologie	-	-	2***	-
Fakultät für Brauwesen, Lebensmitteltechnologie und Milchwissenschaft				
<i>Lebensmitteltechnologie (Univ.)</i>				
Molekulare Genetik für Anfänger	2	-	-	-
<i>Lebensmitteltechnologie (FH)</i>				
Mikrobiologie der Milch und Milchprodukte	1	3	-	-

	Wintersemester		Sommersemester	
	Vorlesung	Übung	Vorlesung	Übung
Hörer aller Studiengänge				
Seminar on current problems in applied microbiology	2	-	2	-

* zusammen mit Prof. Dr. G. Cerny

** zusammen mit Prof. Dr. B. Hock

*** zusammen mit PD Dr. Wagner

Vorträge und Poster

1. Wissenschaftliche Vorträge

Ehling-Schulz, M.; Scherer, S.:

„*Bacillus cereus* emetic Toxin, Cereulide: a Product of Non-Ribosomal Peptide Synthetase?“
Bacillus cereus, 2nd Meeting, Oslo, Norway, 30.-31.05.2002

„Rapid Typing of *Bacillus cereus* by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)“
Bacillus cereus, 2nd Meeting, Oslo, Norway, 30.-31.05.2002

„Emetic Toxin producing *Bacillus cereus* Isolates from geographically diverse Origin form single Cluster“

Bacillus cereus, 3rd Meeting, Bilthoven, Netherlands, 27.-29.11.2002

„Cereulide – Searching for the Molecular Basis of its Production“,
Bacillus cereus, 3rd Meeting, Bilthoven, Netherlands, 27.-29.11.2002

Goerges, S.; Scherer S.:

„Investigation on the microbiology of Limburger cheese“ 2. Meeting des EU-Projekts OLKI CT-2001-02228: „Biodiversity and anti-listerial activity of surface microbial consortia from Limburger, Reblochon, Livarol, Tilsit and Gubbeen cheese“, Freising, 25.04-27.04.2002

„ISO-grid[®] HGMF[™] method (Hydrophobic-Grid-Membrane Filter) for the rapid screening of antilisterial activity“ 2. Meeting des EU-Projekts OLKI CT-2001-02228: „Biodiversity and anti-listerial activity of surface microbial consortia from Limburger, Reblochon, Livarol, Tilsit and Gubbeen cheese“, Freising, 25.04-27.04.2002

„Investigations of yeast isolates from different European smear ripened cheeses by FTIR spectroscopy“ 3. Meeting des EU-Projekts OLKI CT-2001-02228: „Biodiversity and anti-listerial activity of surface microbial consortia from Limburger, Reblochon, Livarol, Tilsit and Gubbeen cheese“, Caen, Frankreich 26.09-28.09.2002

Loessner, M.J.:

„Schnell und einfach: Nachweisverfahren für *Listeria monocytogenes* auf Basis zellwandbindender CBD Proteine“, Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie der DGHM, Karlsruhe, 21.-22.03.2002

„The weapons of the enemy: viral tools for detection and control of pathogenic bacteria in foods”, Food Microbiology Group, Nestle Research Center, Lausanne, Schweiz, 15.05.2002

„Light and lysis: Viral tools for detection and control of pathogenic bacteria“, Institute of Genetics and Microbiology, Universität Lausanne, Lausanne, Schweiz, 16.05.2002

„Neue Entwicklungen für den Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln“, Forschungszentrum Karlsruhe, Fortbildungszentrum für Technik und Umwelt, Seminar Molekularbiologische Nachweismethoden für pathogene Mikroorganismen in Lebensmitteln“, LGL Oberschleißheim, 01.07.2002

„Mit den Waffen des Feindes: Viren als molekulare Werkzeuge zur Detektion und Kontrolle pathogener Bakterien“, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, TU Dresden, 02.07.2002

„*Listeria* bacteriophages: Using the weapons of the enemy“, FEMS Symposium: The Versatility of *Listeria* Species, Izmir, Türkei, 09.-11.10.2002

„The weapons of the enemy: viral tools für detection and control of pathogenic bacteria” Seminar der Gesellschaft für biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig, 24.10.2002

„Neue Entwicklungen für den Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln“, Forschungszentrum Karlsruhe, Fortbildungszentrum für Technik und Umwelt, Seminar Molekularbiologische Nachweismethoden für pathogene Mikroorganismen in Lebensmitteln“, LGL Oberschleißheim, 28.10.2002

„The weapons of the enemy: viral enzymes for selective targeting of pathogenic bacteria“, Banbury Symposium on Phage Therapy – Potentials and challenges. Banbury Center, Cold Spring Harbor Laboratory (CSHL), New York, USA, 13.-15.11.2002

Loewe, L.:

„evolution@home: Experiences with Work Units that Span More than 7 Orders of Magnitude”, Workshop „Global and Peer-to-Peer Computing on Large Scale Distributed Systems”, at IEEE International Symposium on Cluster Computing and the Grid (CCGrid'2002), Berlin-Brandenburg Academy of Sciences and Humanities, Berlin, 24.05.2002

Mayr, R.:

„Main techniques of microbiological quality assurance”, Seminar “Microbiological quality assurance beyond standards”, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic, 19.11.2002

„Quality aspects of ESL milk”, Seminar “Microbiological quality assurance beyond standards”, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic, 19.11.2002

Scherer, S.:

„Detection and control of pathogenic microorganisms in milk products”, Veterinärmedizinische Universität, Wien, 28.-29.01.2002

„Pathogene Mikroorganismen in Lebensmitteln“, Vortrag an der ETH Zürich, 28.02.-01.03.2002

Scherer, S.; Ehling-Schulz, M.; Christiansson, A.:

„Project Culture Collection – Advancement of the Work“, *Bacillus cereus*, 3rd Meeting, Bilt-hoven, Netherlands, 27.-29.11.2002

Seiler, H.:

„Schadfallanalysen bei Sauermilchprodukten“, 5. Wangener Milch-Fachtagung, Dr.-Oskar-Farny-Institut, Wangen, 14.-15.11.2002

Wenning, M.:

„Schnelle Identifizierung von lebensmittel-relevanten Hefen und Bakterien durch FT-IR Mikroskopie“, Weihenstephaner Milchwirtschaftliche Herbsttagung, Weihenstephan, 10.-11.10.2002

Wenning, M.; Seiler, H.; Scherer, S.:

„Identification of food-related microorganisms by FTIR microspectroscopy“, Workshop “FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostic“, Robert Koch-Institut, Berlin, 24.-25.10.2002

Zimmer, Markus:

„Mit den Waffen des Feindes: ein virales Endolysin zur Zerstörung von *Clostridium perfringens*“, Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie der DGHM, Karlsruhe, 21.-22.03.2002

2. Posterpräsentationen

Bauer, J.; Muffler, A.; Schramm, M.; Weich, S.; von Stetten, F.; Scherer, S.; Sorgenfrei, O.:

„Genome-wide transcription profiling in industrial yeasts and *Corynebacterium glutamicum*“, Nutrigenomic Conference, Noordwijk, NL (28.02.-01.03.2002)

Fuchs, T.M., et al.:

„Trapping lethal insertions: A powerful tool for the identification of novel antimicrobial targets of pathogenic bacteria“, GenoMik-Kompetenznetzwerke der Universitäten Bielefeld, Göttingen und Würzburg, Tagungsort Bielefeld (10.-11.10.2002)

„Efficient identification of Salmonella genes involved in intracellular survival and growth by GSM“, GenoMik-Kompetenznetzwerke der Universitäten Bielefeld, Göttingen und Würzburg, Tagungsort Bielefeld (10.-11.10.2002)

Maoz, A.; Mayr, R.; Scherer, S.:

„Stability of the composition of bacterial red smear surface floras and their anti-listerial activity as evaluated *in situ* on red smear cheeses“, FEMS Symposium: The Versatility of *Listeria* Species, Izmir, Türkei (09.-11.10.2002)

Mayr, R.:

„Mikrobiologie von ESL-Milch“, Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie der DGHM, Karlsruhe (21.-22.03.2002)

Mayr, R.; Gutser, K.; Busse, M.; Scherer, S.:

„Microbiology of ESL (extended shelf life) milk“, 26. IDF World Dairy Congress 2002, Paris (24.-27.09.2002)

Veröffentlichungen

Ehling-Schulz, M., Schulz, S., Wait, R., Görg, A., Scherer, S.: The UV-B stimulon of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* comprises early shock proteins and late acclimation proteins. – In: *Molecular Microbiology* 46 (2002), S. 827-843

Loessner, M., Scherer, S.: Listerien - Aktuelle Lage und Entwicklung neuer Schutz- und Reifungskulturen. Teil II. – In: *DMZ* 123 (2002), S. 217-221

Loessner, M.J., Kramer, K., Ebel, F., Scherer, S.: C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. – In: *Molecular Microbiology* 44 (2002), S. 335-349

Loewe, L.: *evolution @home*: Experiences with work units that span more than 7 orders of magnitude in computational complexity. – In: HE Bal et al. (eds.) *Proceedings of the 2nd IEEE/ACM International Symposium on Cluster Computing and the Grid (CCGrid2002)*, Berlin, Germany, IEEE Computer Society (2002), S. 425-431

Loewe, L.: Global computing for bioinformatics – In: *Briefings in Bioinformatics* Vol. 3, No 4. (2002), S. 377-388

Maoz, A., Mayr, R., Bresolin, G., Neuhaus, K., Francis, K.P., Scherer, S.: Sensitive In Situ Monitoring of a Recombinant Bioluminescent *Yersinia enterocolitica* Reporter Mutant in Real Time on Camembert Cheese. – In: *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2002), S. 5737-5740

Oberreuter, H., Seiler, H., Scherer, S.: Identification of coryneform bacteria and related taxa by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. – In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52 (2002), S. 91-100

Oberreuter, H., Charzinski, J., Scherer, S.: Intraspecific diversity of *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis* based on partial 16S rDNA sequence analysis and Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. – In: *Microbiology* 148 (2002), S. 1523-1532

Scherer, S., Loessner, M.: Listerien - Aktuelle Lage und Entwicklung neuer Schutz- und Reifungskulturen. Teil 1. – In: *DMZ* 123 (2002), S. 173-178

Scherer, S., Neuhaus, K.: „Life at Low Temperatures“. - In: *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community* (2002), invited review, in press.

Scherer, S., Seiler, H.: Computergestütztes Identifizierungssystem (FTIR-Technologie) für Starterkulturen und Verderbsorganismen in der Lebensmittelindustrie. – In: Dokumentation der 60. FEI-Diskussionstagung 2002 und der Kölner FoodTec-Tage (2002), S. 49-54

Seiler, H.: Yeasts in Milk and Milk Products. – In: Encyclopedia of Dairy Sciences edited by Hubert Roginski, John W. Fuquay and Patrick F. Fox, Academic Press (2002), S. 2761-2769

Stenfors, L.P., Mayr, R., Scherer, S., Granum, P.E.: Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. – In: FEMS Microbiology Letters 215 (2002), S. 47-51

Wenning, M., Seiler, H., Scherer, S.: Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy, a Novel and Rapid Tool for Identification of Yeasts. – In: Applied and Environmental Microbiology 68 (2002), S. 4717-4721

Zimmer, M., Scherer, S., Loessner, M.J.: Mit den Waffen des Feindes: Eine virale Murein-Hydrolase zur Zerstörung von *Clostridium perfringens*. – In: Hyg. Mikrobiol. 6 (2002), S. 55-59

Zimmer, M., Scherer, S., Loessner, M.J.: Genomic Analysis of *Clostridium perfringens* Bacteriophage ϕ 3626, Which integrates into *guaA* and Possibly Affects Sporulation. – In: Journal of Bacteriology 184 (2002), S. 4359-4368

Zimmer, M., Vukov, N., Scherer, S., Loessner, M.J.: The Murein Hydrolase of the Bacteriophage ϕ 3626 Dual Lysis System Is Active against All Tested *Clostridium perfringens* Strains. – In: Applied and Environmental Microbiology 68 (2002), S. 5311-5317