

Subletale Schädigung von Mikroorganismen – Entwicklung von  
Schädigungsprotokollen für den Einsatz in der Validierung und  
Evaluierung der Schädigung auf Basis zellulärer und  
molekularer Methoden

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Sabine Lindner**

geboren am 09.05.1988 in Rastatt

Mainz, Mai 2018

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2018

# Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis .....	I
II.	Abbildungsverzeichnis .....	IV
III.	Tabellenverzeichnis .....	VI
1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung .....	3
2.1	Bakterien in Nahrungsmitteln .....	3
2.2	Übersicht pathogener Bakterien mit Relevanz für die vorliegende Arbeit.....	5
2.3	Nachweis von Bakterien in Lebensmitteln .....	11
2.4	Stressantwort von Bakterien bei osmotischem Stress.....	17
2.5	Anpassung von Bakterien an osmotischen Stress.....	20
2.6	Hitzeschock-Antwort von Bakterien .....	25
2.7	Ziel der Arbeit.....	28
3	Material und Methode .....	29
3.1	Verwendete Bakterien .....	29
3.2	Verwendete Geräte .....	29
3.3	Verwendete Nährmedien, Chemikalien und Lebensmittel für die Schädigungs- und Validierungsversuche .....	30
3.4	Verwendete Chemikalien.....	31
3.5	Verwendete Internetseiten.....	33
3.6	Verwendete Software .....	34
3.7	Anzucht von Bakterien und Keimzahlbestimmung .....	34
3.7.1	Erstellung von gebrauchsfertigen Vorkulturen auf Plastikperlen .....	34
3.7.2	Anzucht von Bakterien .....	34
3.7.3	Keimzahlbestimmung.....	35
3.7.4	Untersuchung zur homogenen Durchmischung von Laktose-Proben ...	35
3.8	Protokolle zur Schädigung von Bakterien durch Trocknung und Hitze .....	36
3.8.1	Trocknung in Laktose-Monohydrat (nach Lindhardt 2014).....	36
3.8.2	Lagerung der in Laktose-Monohydrat getrockneten Bakterien .....	36
3.8.3	Trocknung in Milchpulver; verändert nach einer Methode von Margot et al. 2015 .....	37
3.8.4	Schädigung von Bakterien durch Hitze .....	37
3.8.5	Einfrieren von Hitzeschock-Kulturen .....	39
3.8.6	Durchführung der Oberflächentrocknung für die RT-Real-Time PCR ...	40
3.9	Molekularbiologische Untersuchungen.....	40
3.9.1	Proteinextraktion .....	40

3.9.1.1	Vergleich der Methoden nach Abrams et al. 2009, Velapatiño et al. 2013 und Stasyk et al. 2001 .....	42
3.9.1.2	Ultraschall-Zellaufschluss nach Abrams et al. 2009 .....	42
3.9.1.3	Proteinextraktion mittels Rehydration Sample Buffer nach Stasyk et al 2001 .....	43
3.9.1.4	Proteinextraktion mit Glasperlen nach Velapatiño et al. 2013 .....	43
3.9.1.5	Proteinbestimmung mit dem Nanodrop 2000/2000c .....	44
3.9.1.6	Proteinextraktion aus Reinkulturen, Hitzeschock-Kulturen und eingefrorenen Hitzeschock-Kulturen.....	45
3.9.1.7	Proteinextraktion aus Laktose-Proben.....	45
3.9.1.8	Proteinextraktion aus Milchpulverproben.....	46
3.9.1.9	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Protein Assay .	47
3.9.1.10	Aufreinigung von Proteinproben mittels 2D-Cleanup Kit.....	48
3.9.2	Durchführung der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-SDS Page) .....	49
3.9.2.1	Ansetzen von Äquilibrierungs-Puffern für die SDS-Page.....	50
3.9.2.2	Isoelektrische Fokussierung .....	50
3.9.2.3	Waschen von IPG-Streifen .....	51
3.9.2.4	Herstellung von Gelen (20x20 cm) für die zweite Dimension der SDS-Page.....	52
3.9.2.5	Durchführung der zweiten Dimension mit selbst hergestellten SDS-Gelen .....	53
3.9.2.6	Gelfärbung mit Coomassie .....	54
3.9.3	Massenspektrometrie-Analyse.....	56
3.9.3.1	Orbitrap Massenspektrometer .....	56
3.9.3.2	Isobaric Labeling: Tandem Mass Tag (TMT)-Labeling .....	56
3.9.3.3	Durchführung Massenspektrometrie-Analyse.....	57
3.9.4	Durchführung von RNA-Untersuchungen mittels Real-Time PCR .....	58
3.9.4.1	Auswahl von geeigneten Genen und Primern .....	59
3.9.4.2	RNA-Extraktion mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit .....	64
3.9.4.3	Reverse Transkription mit der SuperScript III Reverse Transkriptase von Invitrogen .....	65
3.9.4.4	Durchführung der Real-Time PCR zur Überprüfung der Primer .....	65
3.10	Einsatz der Laktose-Proben für Lebensmittel- bzw. Validierungsversuche .	67
3.10.1	Durchführung eines Lebensmittel- bzw. Validierungsversuchs nach ISO 16140-3 und ISO 6579.....	67
3.10.2	Vorversuche zum Validierungsversuchs .....	68
3.10.2.1	Keimzahlbestimmung einer Flüssigkultur .....	68

3.10.2.2	Keimzahlbestimmung der Laktose-Probe.....	68
3.10.2.3	Einstellen und Überprüfen der Keimzahl zur Animpfung des Lebensmittels.....	69
3.10.3	Durchführung des Lebensmittel- bzw. Validierungsversuchs.....	70
3.10.4	Statistische Auswertungen.....	71
4	Ergebnisse .....	73
4.1	Proteom-Untersuchungen mittels TMT-Labeling und Massenspektrometrie	73
4.1.1	Proteom-Analyse von <i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium ATCC® 14028 nach Trocknung in Laktose-Monohydrat .....	73
4.1.2	Untersuchung der Proteinextrakte von gestressten und ungestressten Bakterien mittels 2D-SDS-Page.....	78
4.2	Ergebnisse der Versuche zur Trocknung von Bakterien in Laktose- Monohydrat und Milchpulver .....	84
4.2.1	Ergebnisse Laktose-Trocknung .....	84
4.2.1.1	<i>Salmonella</i> ATCC® 14028 getrocknet in Laktose-Monohydrat .....	85
4.2.1.2	Lagerung getrockneter Laktose-Proben von <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028 bei 4°C und -20°C .....	89
4.2.1.3	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25932 und <i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> ATCC® 12228 getrocknet in Laktose-Monohydrat .....	93
4.2.1.4	<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC® 29004 getrocknet in Laktose- Monohydrat.....	97
4.2.2	Trocknung in Milchpulver .....	99
4.2.2.1	Milchpulver-Trocknung <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028 und <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC® 13076 .....	99
4.2.2.2	Milchpulver-Trocknung <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25932 und <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC® 12228 .....	101
4.2.2.3	Milchpulver-Trocknung <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC® 29004.....	104
4.2.2.4	Milchpulver-Trocknung <i>Escherichia coli</i> ATCC® 700728 .....	106
4.2.2.5	Milchpulver-Trocknung <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC® 19111 ..	108
4.2.3	Zusammenfassung Trocknungsversuche .....	109
4.3	Erstellung eines Modells zur Charakterisierung des Absterbeverhaltens von <i>Salmonella</i> Typhimurium bei Trocknung in Laktose-Monohydrat.....	111
4.4	Ergebnisse Hitzeschock-Versuche .....	113
4.4.1	Vorversuche zum Hitzeschock.....	114
4.4.2	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC® 19111 .....	114
4.4.3	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 700728.....	115
4.4.4	<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC® 29004 .....	116
4.4.5	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028 .....	117

4.4.6	Lagerung der Hitzeschock-Proben bei -80°C.....	118
4.4.7	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC® 19111 und <i>Escherichia coli</i> ATCC® 700728 Hitzeschock und Lagerung bei -80°C.....	119
4.4.8	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028 und <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC® 29004 Hitzeschock und Lagerung bei -80°C .....	120
4.4.9	Zusammenfassung Hitzeschock-Versuche .....	121
4.5	Lebensmittel- bzw. Validierungsversuch mit Laktose-getrockneten <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028.....	123
4.5.1	Ergebnisse der Vorversuche.....	123
4.5.2	Ergebnisse des Validierungs- bzw. Lebensmittelversuchs .....	126
5	Diskussion.....	132
5.1	Massenspektrometrie Detektion von Proteinen .....	132
5.1.1	Hochregulierte Proteine .....	132
5.1.2	Herunterregulierte Gene .....	145
5.2	SDS-Page .....	151
5.3	Diskussion Trocknungsversuche .....	151
5.3.1	Trocknung von Bakterien in Laktose-Monohydrat und Milchpulver.....	153
5.3.2	Vergleich der Stabilität von getrockneten Bakterien mit Literaturwerten ... ..	158
5.4	Diskussion Hitzeschock.....	163
5.5	Einsatz von geschädigten Bakterien für die Untersuchung von Lebensmitteln .....	166
6	Literaturverzeichnis .....	168
7	Anhang.....	188
7.1	Ergebnisse Normalisierungsversuche der Real-Time PCR.....	188
7.2	Homogene Durchmischung von Laktose-Proben .....	192
7.3	Keimzahlbestimmung auf Blutagar nach DIN 10161 (nach Lindner 2014)	197
7.4	Medien Zusammensetzung .....	198

## I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Ausgeschriebene Version
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
A	Ampère
Abkürzung	Ausgeschriebene Version
ANOVA	Analysis of variance / Varianzanalyse
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASB	Amidosulfobetain
ATCC®	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
$a_w$	Wasseraktivität
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BPW	Buffered peptone water; gepuffertes Peptonwasser
BSA	Rinderserumalbumin
Ca	Calcium
CASO	Casein-Soja-Pepton-Agar
cDNA	Complementary DNA, komplementäre DNA
CHAPS	3-[3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	Cefixim Kaliumtellurit
Da; kDa	Dalton; kilo-Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dITP	Desoxyinosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribunukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
D-Wert	Dezimale Reduktionszeit
EAEC	Enteroaggregativer <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	European Food Safety Authority
EG	Europäische Gemeinschaft
EHEC	enterohämorrhagischer <i>Escherichia coli</i>

ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPA	United States Environmental Protection Agency
EPEC	Enteropathogener <i>Escherichia coli</i>
ESSA	Enterobacter sakazakii Selektivagar
ec.	et cetera
ETEC	Enterotoxischer <i>Escherichia coli</i>
EU	Europäische Union
EG	Europäische Gemeinschaft
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Eisen
g	Gramm
h	Stunden
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HUS	hämolytisch-urämischen Syndrom
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IFT	Institute of Food Technologists
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
ISO	International Organization for Standardization
K <sup>+</sup>	Kaliumion
KBE	Kolonienbildene Einheiten
log	Logarithmus
m	Masse
M	Marker, bei Berechnungen: Masse
mA	Milli-Ampère
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MilliQ®	Wasseraufbereitungssystem der Firma Merck KGaA zur Erzeugung von Reinstwasser
min	Minuten
ml	Milliliter
MKTTn	Muller-Kauffmann Tetrathionat-Novobiocin Bouillon
mM	Millimol
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mPA	Mega-Pascal
MRD	Maximum recovery diluent; Maximale Wiederbelebungslösung
mRNA	Messenger RNA
MW	Mittelwert
n	Stoffmenge / Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid

NADP <sup>+</sup> /NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
p-Wert	Probability; statistischer Signifikanzwert
PALCAM	Polymyxin B, Akriflavin, Lithiumchlorid, Ceftazidim, Moxalactam
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction; Polymerasekettenreaktion
pH	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppGpp	Guanosin-3',5'-bispyrophosphat
rDNA	Ribosomale DNA
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species; reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolution per minute
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
RVS-Bouillon	Rappaport Vassiliadis Bouillon
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser.	Serovar
SMAC	Sorbitol-MacConkey Agar
ssDNA	einzelsträngige DNA
STEC	Shigatoxin-produzierender <i>Escherichia coli</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
T <sub>m</sub>	Schmelzpunkt
TMT	Tandem Mass Tag
U	Unit
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
V	Volt
VBNC	Viable but non culturable
VRB-Agar	Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Agar
x g	Einheit des zentrifugierens, vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung
XTP	Xanthosintriphosphat
z.B.	zum Beispiel
λ	Wellenlänge

## II. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Anzahl an bestätigten Fällen von Zoonose in der EU für das Jahr 2016 .....	4
<b>Abbildung 2:</b> Lebensmittel assoziiert mit Krankheitsausbrüchen.....	5
<b>Abbildung 3:</b> Auswirkungen von Dehydratation auf eine bakterielle Zelle .....	20
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung des Ablaufs einer Proteom-Analyse mittels Massenspektrometrie und TMT-Labeling.....	57
<b>Abbildung 5:</b> Proteom von <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC® 29004 ungestresst (links) und nach Trocknung in Laktose-Monohydrat (rechts).....	80
<b>Abbildung 6:</b> Proteom von <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028 ungestresst (links) und nach Trocknung in Laktose-Monohydrat (rechts).....	81
<b>Abbildung 7:</b> Proteom von <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028 ungestresst (links) und nach Hitzeschock bei 55°C für 2 Minuten (rechts).. ..	82
<b>Abbildung 8:</b> Proteom von <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028 ungestresst (links) und nach Hitzeschock bei 55°C für 2 Minuten und Lagerung bei -80°C (rechts) .....	83
<b>Abbildung 9:</b> <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028 getrocknet in Laktose-Monohydrat für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel.....	86
<b>Abbildung 10:</b> <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028 getrocknet in Laktose-Monohydrat für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel.....	87
<b>Abbildung 11:</b> <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028 getrocknet in Laktose-Monohydrat für 24 h bei 41°C und gelagert bei 4°C mit Kieselgel. ....	90
<b>Abbildung 12:</b> <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028 getrocknet in Laktose-Monohydrat für 24 h bei 41°C und gelagert bei -20°C mit Kieselgel. ....	91
<b>Abbildung 13:</b> <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC® 12228 getrocknet in Laktose- Monohydrat für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel. ....	93
<b>Abbildung 14:</b> <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25932 getrocknet in Laktose-Monohydrat für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel.....	94
<b>Abbildung 15:</b> <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC® 29004 getrocknet in Laktose-Monohydrat für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel.....	98
<b>Abbildung 16:</b> <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC® 13076 (SE) und <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028 (ST) getrocknet in Nestlé Beba Kindermilch für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel. ....	100
<b>Abbildung 17:</b> <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25932 getrocknet in Nestlé Beba Kindermilch für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel. ....	102
<b>Abbildung 18:</b> <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC® 12228 getrocknet in Nestlé Beba Kindermilch für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel. ....	103
<b>Abbildung 19:</b> <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC® 29004 getrocknet in Nestlé Beba Kindermilch für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel.....	105
<b>Abbildung 20:</b> <i>Escherichia coli</i> ATCC® 700728 getrocknet in Nestlé Beba Kindermilch für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel.....	107
<b>Abbildung 21:</b> <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC® 19111 getrocknet in Nestlé Beba Kindermilch für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel. ....	108
<b>Abbildung 22:</b> Modell zur Charakterisierung des Absterbens auf CASO-Agar von <i>Salmonella</i> ser.Typhimurium nach Trocknung in Laktose und Langzeitlagerung bei Raumtemperatur. ....	112
<b>Abbildung 23:</b> Hitzeschock von <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC® 19111. Der Hitzeschock wurde im Wasserbad bei 60°C für insgesamt 20 Minuten durchgeführt. ....	115
<b>Abbildung 24:</b> Hitzeschock von <i>Escherichia coli</i> ATCC® 700728. ....	116

<b>Abbildung 25:</b> Hitzeschock von <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC® 29004.....	117
<b>Abbildung 26:</b> Hitzeschock von <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028.....	118
<b>Abbildung 27:</b> Hitzeschock von <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC® 19111 und <i>Escherichia coli</i> ATCC® 700728 und Lagerung mit 15% Glycerin in CASO-Bouillon bei -80°C. ....	120
<b>Abbildung 28:</b> Hitzeschock von <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028 und <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC® 29004 und Lagerung mit 15% Glycerin in BPW-Bouillon bei -80°C.....	121
<b>Abbildung 29:</b> Schema zur Vorgehensweise der kulturellen Identifizierung von Salmonellen nach ISO-Norm 6579 (ISO 6579:2002). ....	131
<b>Abbildung 30:</b> Glyoxylat-Shunt-Stoffwechselweg .....	140
<b>Abbildung 31:</b> Überleben von <i>Cronobacter sakazakii</i> in pulverförmiger Säuglingsnahrung. ....	159
<b>Abbildung 32:</b> Relative Quantifizierung des Gens <i>recA</i> in verschiedenen Proben.....	189
<b>Abbildung 33:</b> Relative Quantifizierung des Gens <i>gapA</i> in verschiedenen Proben.....	190
<b>Abbildung 34:</b> Relative Quantifizierung des Gens <i>rpoD</i> in verschiedenen Proben. ....	191
<b>Abbildung 35:</b> Keimzahlen auf CASO-Agar von <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028, getrocknet in Laktose-Monohydrat und gelagert auf Kieselgel bei 4°C. Einzelkeimzahlen als Streudiagramm dargestellt.....	193
<b>Abbildung 36:</b> Keimzahlen auf XLD-Agar von <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028, getrocknet in Laktose-Monohydrat und gelagert auf Kieselgel bei 4°C. Einzelkeimzahlen als Streudiagramm dargestellt.....	193
<b>Abbildung 37:</b> Keimzahlen auf CASO-Agar von <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028, getrocknet in Laktose-Monohydrat und gelagert auf Kieselgel bei Raumtemperatur. Einzelkeimzahlen als Streudiagramm dargestellt.....	194
<b>Abbildung 38:</b> Keimzahlen auf XLD-Agar von <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028, getrocknet in Laktose-Monohydrat und gelagert auf Kieselgel bei Raumtemperatur. Einzelkeimzahlen als Streudiagramm dargestellt.....	194
<b>Abbildung 39:</b> Keimzahlen auf XLD-Agar von <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028, getrocknet in Laktose-Monohydrat und gelagert auf Kieselgel bei Raumtemperatur. Einzelkeimzahlen als Streudiagramm dargestellt.....	195

### III. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verschiedene Grenzwerte von Bakterien in Lebensmitteln.....	10
<b>Tabelle 2:</b> Wasseraktivität verschiedener Lebensmittel.....	13
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Bakterien.....	29
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Geräte.....	29
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete Nährmedien.....	30
<b>Tabelle 6:</b> Verwendete Chemikalien für die 2D-Gelelektrophorese.....	31
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Chemikalien für die Reverse Transkription und Real-Time PCR.....	33
<b>Tabelle 8:</b> Verwendete Internetseiten.....	33
<b>Tabelle 9:</b> Verwendete Software.....	34
<b>Tabelle 10:</b> Übersicht über Veröffentlichungen zum Thema Hitzeschock bei verschiedenen Bakterien.....	39
<b>Tabelle 11:</b> Übersicht über Extraktionsmethoden zur Extraktion von Proteinen aus Bakterien- und Säugerzellen.....	41
<b>Tabelle 12:</b> Proteinbestimmung mittels Nanodrop 2000/2000c. Die Konzentration der Proteine wurde bei 280 nm bestimmt.....	44
<b>Tabelle 13:</b> Verwendete Standardreihe für die Proteinbestimmung mittels BCA-Assay.....	48
<b>Tabelle 14:</b> Verwendetes Puffervolumen und Proteinmenge zur Rehydratation der IPG-Streifen.....	49
<b>Tabelle 15:</b> Programm zur Durchführung der Isoelektrische Fokussierung von 7 cm IPG-Streifen.....	51
<b>Tabelle 16:</b> Programm zur Durchführung der Isoelektrische Fokussierung von 17 cm IPG-Streifen.....	51
<b>Tabelle 17:</b> Programm zur Durchführung der zweiten Dimension der Gelelektrophorese.....	54
<b>Tabelle 18:</b> Angestrebte Vorverdünnung für den Lebensmittelversuch.....	70
<b>Tabelle 19:</b> Übersicht der verwendeten Veröffentlichungen zur Auswahl von Housekeeping Genen zur Normalisierung der Real-Time PCR.....	61
<b>Tabelle 20:</b> Primersequenzen der Stressgene für die RNA-Analyse.....	62
<b>Tabelle 21:</b> Primersequenzen Referenzgene für die Normalisierung der RNA-Analyse.....	63
<b>Tabelle 22:</b> Verwendete Menge und Konzentration der Reagenzien für die Reverse Transkription.....	65
<b>Tabelle 23:</b> Verwendete Menge und Konzentration der PCR-Reagenzien für die Real-Time PCR.....	66
<b>Tabelle 24:</b> Programm zur Durchführung der Real-Time PCR.....	66
<b>Tabelle 25:</b> Hochregulierte Proteine in Laktose getrockneten Bakterien.....	74
<b>Tabelle 26:</b> Herunterregulierte Proteine in Laktose getrockneten Bakterien.....	77
<b>Tabelle 27:</b> Veränderung der Keimzahl für die in Laktose getrockneten Proben von <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028.....	88
<b>Tabelle 28:</b> Schädigungsrate für <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028 getrocknet in Laktose-Monohydrat für 24 h bei 41°C.....	89
<b>Tabelle 29:</b> Keimzahlen der Kühlschranks-Probe von <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028 getrocknet in Laktose-Monohydrat und gelagert bei 4°C über einen Zeitraum von 460 Tagen.....	92
<b>Tabelle 30:</b> Keimzahlen der Gefrierschranks-Probe von <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028 getrocknet in Laktose-Monohydrat und gelagert bei -20°C über einen Zeitraum von 460 Tagen.....	92

<b>Tabelle 31:</b> Veränderung der Keimzahl für die in Laktose getrockneten Proben von <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25932 und <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC® 12228, gelagert bei Raumtemperatur. ....	96
<b>Tabelle 32:</b> Veränderung der Keimzahl für die in Laktose getrockneten Proben von <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC® 29004, gelagert bei Raumtemperatur. ....	98
<b>Tabelle 33:</b> Veränderung der Keimzahl für die in Nestlé Beba Kindermilch getrockneten Proben von <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC® 13076 und <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC®14028, gelagert bei Raumtemperatur. ....	101
<b>Tabelle 34:</b> Veränderung der Keimzahl für die in Nestlé Beba Kindermilch getrockneten Proben von <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25932 und <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC® 12228, gelagert bei Raumtemperatur. ....	104
<b>Tabelle 35:</b> Veränderung der Keimzahl für die in Nestlé Beba Kindermilch getrockneten Proben von <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC® 29004, gelagert bei Raumtemperatur. ....	106
<b>Tabelle 36:</b> Veränderung der Keimzahl für die in Nestlé Beba Kindermilch getrockneten Proben von <i>Escherichia coli</i> ATCC® 700728, gelagert bei Raumtemperatur.....	107
<b>Tabelle 37:</b> Veränderung der Keimzahl für die in Nestlé Beba Kindermilch getrockneten Proben von <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC® 19111, gelagert bei Raumtemperatur.....	109
<b>Tabelle 38:</b> Auflistung von Trendlinien-Formel verschiedener <i>Salmonella</i> ser.Typhimurium Proben nach Trocknung in Laktose und Lagerung bei Raumtemperatur. ....	112
<b>Tabelle 39:</b> Prozentuale Keimzahlabnahme auf CASO-Agar von <i>Salmonella</i> ser.Typhimurium Proben nach Trocknung in Laktose und Lagerung bei Raumtemperatur. ....	113
<b>Tabelle 40:</b> Überprüfung der konstanten Keimzahl verschiedener Flüssigkulturen von <i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium ATCC® 14028.....	124
<b>Tabelle 41:</b> Vorversuch zur Vorverdünnung der flüssigen Vorkultur.....	125
<b>Tabelle 42:</b> Vorversuch zur Vorverdünnung der Laktose-getrockneten Kultur.....	126
<b>Tabelle 43:</b> Vorverdünnung der Flüssig-Vorkultur für das Animpfen der Anfangsmilch. ....	127
<b>Tabelle 44:</b> Vorverdünnung der in Laktose getrockneten Vorkultur für das Animpfen der Anfangsmilch.....	127
<b>Tabelle 45:</b> Gesamtübersicht Validierungsversuch. ....	130
<b>Tabelle 46:</b> Zusammensetzung der verwendeten Medien.....	198

# 1 Zusammenfassung

Humanpathogene Bakterien sind auch in Lebensmitteln zu finden und können bei Verzehr Krankheiten auslösen, weswegen Lebensmittel anhand von vorgeschriebenen ISO-Normen auf pathogene Bakterien hin getestet werden müssen. Lebensmittel können für Bakterien eine stressige Umgebung darstellen und zur Schädigung der bakteriellen Zelle führen. Diese Bakterien können bei Einsatz von selektiven Nährmedien in den Lebensmitteln häufig nicht mehr nachgewiesen werden. Zur Entwicklung von Methoden- oder Nährmedien für den bakteriellen Nachweis sollen möglichst natürlich kontaminierte Lebensmittel verwendet werden, eine artifizielle Kontamination ist jedoch erlaubt. Eine Verwendung von geschädigten Bakterien für die artifizielle Kontamination ist von Vorteil um eine möglichst sensitive Methode zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Schädigung von Bakterien mittels Trocknung in Laktose-Monohydrat und Milchpulver sowie durch Hitze durchgeführt. Verwendet wurden relevante Bakterien für die Lebensmittelindustrie. Die entwickelten Protokolle sollen in zukünftigen Validierungen zur Generierung geschädigter Bakterien eingesetzt werden. Insgesamt zeigte sich, dass die verwendeten Methoden geeignet waren, um gestresste Bakterien zu erzeugen. Einige verwendete Bakterien konnten nur in Milchpulver getrocknet werden, nicht jedoch in Laktose-Monohydrat. Hierzu gehörten *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111, *Escherichia coli* ATCC® 700728 und *Salmonella enterica* ser. Enteritidis. Sowohl in Laktose als auch in Milchpulver konnte eine initiale Abnahme der Keimzahl nach der Trocknung beobachtet werden, bevor es zu einer Stabilisierung der Keimzahl kam. In Milchpulver getrocknete Bakterien können über einen längeren Zeitraum mit geringer Abnahme der Keimzahl gelagert werden. In Laktose-Monohydrat dauerte die initiale Abnahme der Keimzahl über mehrere Wochen an, bevor eine Stabilisierung eintrat. Im Vergleich zu Milchpulver nahm die Keimzahl in Laktose-Monohydrat jedoch auch nach der Stabilisierung deutlich schneller ab. Durch eine Lagerung der in Laktose-Monohydrat getrockneten Proben von *Salmonella enterica* ser. Typhimurium bei 4°C und -20°C konnte die Stabilität der Keimzahl deutlich erhöht werden. Bei der Behandlung durch Hitze konnten ebenfalls geschädigte Bakterien generiert werden, welche für etwa 140 Tage bei -80°C bei relativ stabiler Keimzahl und Schädigungsrate

gelagert werden konnten. Die Bakterien befanden sich in Nährbouillon mit 15% Glycerin.

In Laktose getrocknete *Salmonella enterica* ser. Typhimurium wurden für einen Validierungsversuch mit Milchpulver als Lebensmittel eingesetzt. Die Lebensmittelproben wurden mit verschiedenen Inokulationsstufen beimpft. Zum Vergleich wurde ein zweiter Ansatz mit einer ungestressten Flüssigkultur angeimpft. Es zeigte sich, dass die getrockneten Bakterien in den Untersuchungen ebenso gut nachgewiesen werden konnten wie die ungestressten Bakterien. Somit können sie für zukünftige Validierungsversuche eingesetzt werden.

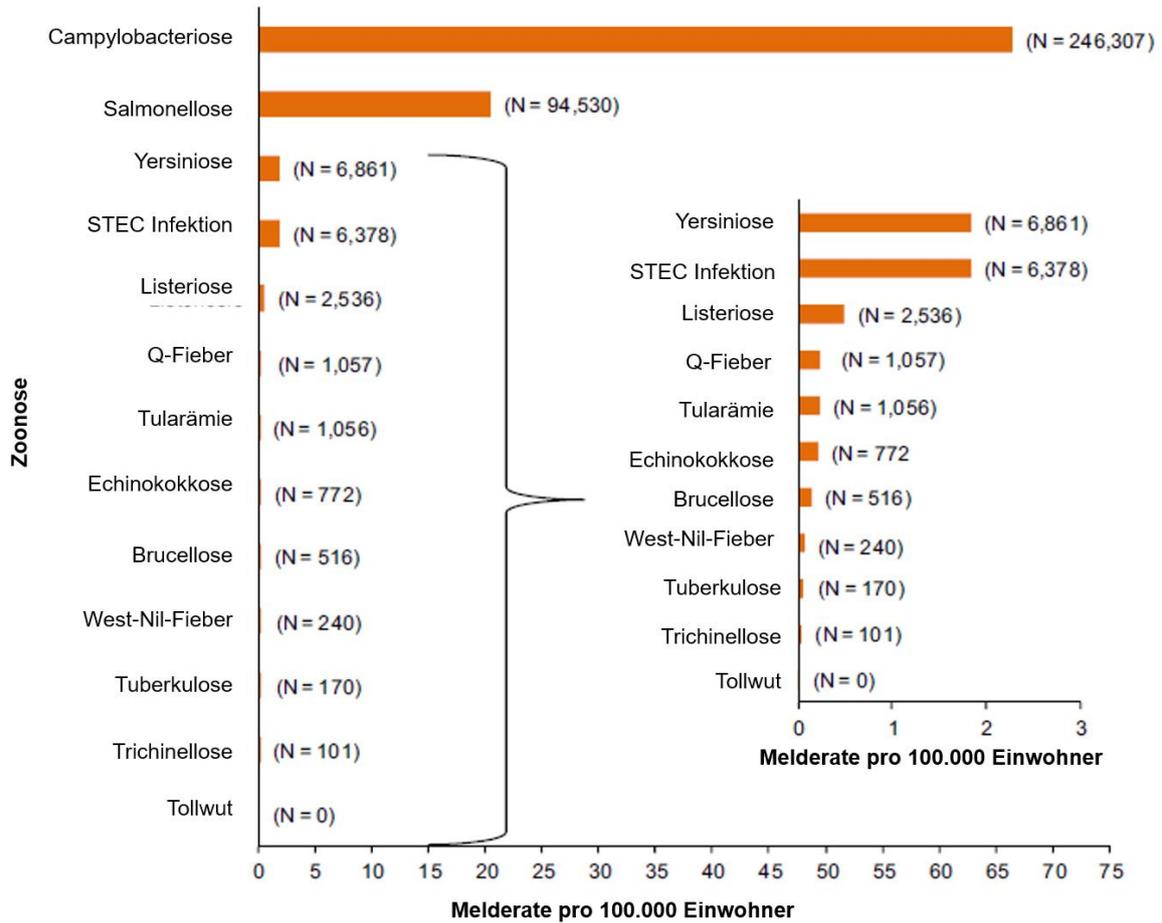
Durch Trocknung in Laktose-Monohydrat gestresste *Salmonella enterica* ser. Typhimurium zeigten in Proteomuntersuchungen deutliche Expressionsunterschiede relevanter Proteine zum Schutz der Zelle vor osmotischem Stress, Hungerstress und oxidativem Stress im Vergleich mit ungestressten Bakterien. Es konnten Transporter für Osmoprotektoren, Genregulatoren, Schutzproteine für die DNA sowie Proteine für alternative Stoffwechselwege mit einer höheren Expression detektiert werden. Die Funktion vieler Proteine, die in dieser Arbeit ermittelt wurden, ist noch nicht bekannt.

## 2 Einleitung

### 2.1 Bakterien in Nahrungsmitteln

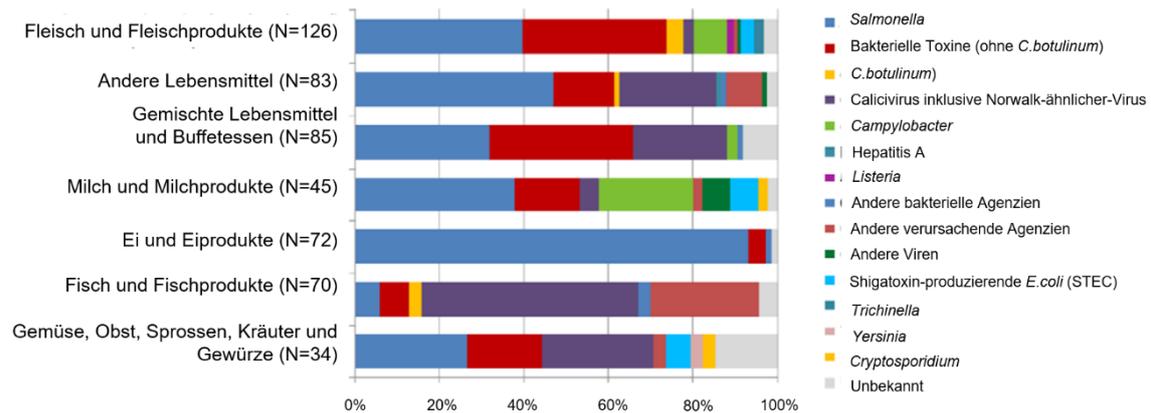
Mikroorganismen sind überall auf der Erde zu finden. Sie leben im Wasser, der Erde, in Tieren und Menschen (Ray 2004). Im menschlichen Darm befinden sich beispielsweise 500 – 1000 verschiedene Bakterienspezies (Sommer & Bächhed 2013). Diese Bakterien nehmen hier eine wichtige Funktion z.B. in der Umsetzung unverdaulicher Polysaccharide ein, sind an der Bildung von Vitaminen beteiligt und haben damit eine nützliche Funktion für den Menschen (Sommer & Bächhed 2013). In der Lebensmittelindustrie dienen vor allem Milchsäurebakterien der Fermentation von Nahrungsmitteln wie Käse, Joghurt, Würsten oder Sauerkraut. Durch diesen Vorgang werden die Textur, das Erscheinungsbild und der Geschmack beeinflusst. Auch wird vielen Bakterien, sogenannten probiotischen Bakterien, ein positiver Gesundheitseffekt für den Konsumenten zugeschrieben (Rosenberg 2013, S.241). Doch in Lebensmitteln können auch humanpathogene Mikroorganismen zu finden sein, welche für Lebensmittelinfektionen und Lebensmittelvergiftungen beim Menschen verantwortlich sein können. Zu diesen lebensmittelpathogenen Keimen gehören unter anderem *Clostridium botulinum*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*. Ein pathogenes Bakterium wird charakterisiert durch seine Fähigkeit in einen Wirt einzudringen, zu überleben und sich im Wirt zu vermehren (Bhunias 2008, S.4). Dabei wird die Verteidigung durch das Immunsystem überwunden. Ein pathogenes Bakterium ist in der Lage in einem Wirt zellulären Schaden durch die Etablierung in Geweben anzurichten. Dies kann zur Erkrankung des Wirtes bis hin zum Tod führen (Bhunias 2008, S.4). Durch verschiedene Behörden wie das Robert-Koch Institut oder die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit werden die Risiken der Kontamination von Lebensmitteln in der Europäischen Union überwacht und epidemiologische Daten erhoben. Für das Jahr 2016 wurden insgesamt 360.524 Fälle von humaner Zoonose in der EU gemeldet. Einige dieser Ausbrüche gehen ebenfalls auf kontaminierte Nahrungsmittel zurück (EFSA 2017). Die meisten Infektionen konnten für *Campylobacter* und *Salmonella* mit etwa 246.307 und 94.530 Fällen verzeichnet werden (EFSA 2017). In Abbildung 1 ist eine Übersicht über die Zoonosefälle in 2016 für die EU aufgezeigt. Insgesamt wurden

452 Tote durch eine Infektion mit *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, STEC und *Listeria* in der EU im Jahre 2016 festgestellt (EFSA 2017).



**Abbildung 1: Anzahl an bestätigten Fällen von Zoonose in der EU für das Jahr 2016 (EFSA 2017).**

Die meisten Lebensmittelgruppen, welche mit dem Ausbruch einer Erkrankung durch humanpathogene Bakterien in der EU in Verbindung gebracht wurden, sind in Abbildung 2 gezeigt. Zu sehen ist eine Übersicht über verschiedene lebensmittelbedingte Zoonose-Ausbrüche in der EU. Häufig mit Lebensmittelinfektionen assoziierte Lebensmittel sind Fleisch- und Wurstwaren sowie Milch- und Käseprodukte, Ei- und Eiprodukten, aber auch Fischprodukte (EFSA 2017).



**Abbildung 2: Lebensmittel assoziiert mit Krankheitsausbrüchen.** Häufigkeitsverteilung verschiedener Bakterien und Lebensmittel welche mit Lebensmittel bedingten Krankheitsausbrüchen assoziiert wurden. Gezeigt sind Fälle mit überzeugenden Beweisen im Jahr 2016 für die EU. Nicht gezeigt werden Wasser bedingte Ausbrüche (EFSA 2017).

## 2.2 Übersicht pathogener Bakterien mit Relevanz für die vorliegende Arbeit

*Listeria monocytogenes* ist ein Gram-positives, fakultativ anaerobes Stäbchen, welches ubiquitär in der Umwelt vorkommt. Es ist im Boden, im Wasser, den Ausscheidungen von Mensch und Tier sowie verschiedenen Lebensmitteln zu finden (Vázquez-Boland 2001; Robert-Koch Institut 2006). Von seinen sechs Spezies gilt lediglich *Listeria monocytogenes* als humanpathogen, auch wenn bereits über Einzelfälle von Infektionen durch *Listeria ivanovii* oder *Listeria seeligeri* berichtet wurde (Vázquez-Boland 2001). Häufig sind vor allem immundefiziente, ältere Menschen, Schwangere, Kinder oder Säuglinge anfällig für Infektionen mit humanpathogenen Bakterien (Vázquez-Boland 2001; Crum Cianflone 2008). Durch pathogene Bakterien hervorgerufene Erkrankungen können dabei vielfältig sein. *Listeria monocytogenes* kann sich beispielsweise über den Blutstrom in Leber, Milz und Plazenta ausbreiten und ist in der Lage die Blut-Hirnschranke zu überwinden (Vázquez-Boland 2001). Dies kann unter anderem Fehlgeburten auslösen, oder zu Listeriose beim ungeborenen Kind führen (Vázquez-Boland 2001; Robert-Koch Institut 2006). Zu den Symptomen einer Listeriose können grippeähnliche Symptome, sowie Gastroenteritis zählen. In schweren Fällen kann es zu Meningitis, Sepsis oder Enzephalitis kommen. Bei einer Infektion des Zentralnervensystems liegt die Sterblichkeitsrate bei 20 – 30% (Vázquez-Boland 2001; Robert-Koch Institut 2006). Der Hauptinfektionsweg des Menschen ist durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel (Robert-Koch Institut 2006). Aufgrund seiner hohen Toleranz für niedrige Temperaturen und pH-Werte, stellt das Bakterium eine große Herausforderung für die Lebensmittelindustrie dar (Robert-Koch Institut

2006). Hauptsächlich zu finden ist das Bakterium in Milch und Milchprodukten, verschiedenen Fleisch- und Wurstwaren wie Schweine- Rind- oder Geflügelfleisch sowie Rohwürsten oder Teewürsten (Robert-Koch Institut 2006). Auch Fischprodukte wie Räucherlachs und Rohkost, wie Kopfsalat, stellen Infektionsquellen dar (Robert-Koch Institut 2006).

*Salmonella* sind Gram-negative, fakultativ anaerobe Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Die Einteilung von *Salmonella* erfolgt in zwei Spezies, *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*, wobei die meisten humanpathogenen Vertreter in der Spezies *Salmonella enterica* angesiedelt sind (Crum Cianflone 2008). Das Bakterium *Salmonella* kann verschiedene Symptome, wie Gastroenteritis mit Übelkeit, Erbrechen und Durchfall sowie Fieber, abdominalen Krämpfen und Schüttelfrost hervorrufen (Bhunia 2008, S.204). Bakteriämie ist ein schwerer Verlauf der Salmonellose und tritt nur in 1 – 4 % der Patienten mit intaktem Immunsystem auf. Diese kann zu verschiedenen Komplikationen wie Meningitis, Pneumonie, Endokarditis, Bildung von Gefäßplaque oder Aneurysmen führen (Crum Cianflone 2008). Die Gattung *Salmonella* zählt zu einer der führenden Krankheitserreger durch Nahrungsmittel (De Souza Sant'Ana 2012). *Salmonella* wurde unter anderem in Fleisch- und Fleischprodukten wie z.B. in Truthahn-, Schweine-, Rind-, und Geflügelfleisch sowie Eiern und Eiprodukten detektiert. Des Weiteren ist *Salmonella* auch in getrockneten Samen, Sprossen, Gemüse, Gewürzen und Kräutern zu finden (EFSA 2017). Somit ist *Salmonella* auch in der Lage auf trockenen Lebensmitteln mit niedriger Wasseraktivität zu überleben (Gruzdev et al. 2012).

*Escherichia coli* ist eines der meist studierten Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae* (Vila et al. 2016). Bei *Escherichia coli* handelt es sich ebenfalls um ein Gram-negatives, fakultativ anaerobes, Stäbchenförmiges Bakterium. Bereits nach der Geburt kommt es zu einer Besiedelung des Magen-Darm-Trakts und zu einer Co-Existenz zwischen Bakterium und Mensch (Kasper et al.2004). Im Gegensatz zu diesen hilfreichen *Escherichia coli* Stämmen, gibt es auch humanpathogene Vertreter, die verschiedene Arten der Diarrhö hervorrufen können (Kasper et al.2004; Vila et al. 2016). Hierzu gehören enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (EHEC) oder auch Shigatoxin-produzierender *Escherichia coli* (STEC), Enterotoxischer *Escherichia coli* (ETEC), Enteropathogener *Escherichia coli* (EPEC), Enteroinvasiver *Escherichia coli* (EIEC) und Enteroaggregativer *Escherichia coli* (EAEC) (Vila et al. 2016). Zu den

Symptomen einer Infektion mit diesen Bakterien gehören andauernde, zum Teil blutige Diarrhö, Erbrechen und Fieber. Es kann zu einem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) mit terminalem Nierenversagen kommen. Auch neonatale Sepsis kann auftreten (Kasper et al. 2004; Vila et al. 2016). Fälle von Infektionen mit *E. coli* wurden im Zusammenhang mit Milch- und Milchprodukten, Eiscreme, Milchshake und Käse beobachtet (Farrokh et al. 2013). Auch aufgrund verschiedener Fleischprodukte, Sprossen oder Salat sind bereits Krankheitsausbrüche erfolgt (Yang et al. 2017).

*Cronobacter sakazakii* wurde ursprünglich als *Enterobacter sakazakii* bezeichnet und ist ein Gram-negatives Stäbchen aus der Familie der *Enterobacteriaceae* und wird in sieben Spezies eingeteilt (Yan et al. 2012). *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus* und *Cronobacter turicensis* gehören zu den humanpathogenen Bakterien und wurden in den letzten Jahren vor allem mit der Infektion von Neugeborenen in Verbindung gebracht (Edelson-Mammel et al. 2005; Yan et al. 2012). Symptome einer *Cronobacter* Infektion sind unter anderem nekrotisierende Enterokolitis, Bakteriämie und Meningitis mit einer Sterblichkeitsrate von 40 – 80 % (Yan et al. 2012). Vor allem in pulverförmiger Säuglingsnahrung wurde *Cronobacter sakazakii* häufig isoliert und zeigte in dem getrockneten Produkt eine Überlebensdauer von über zwei Jahren (Osaili & Forsythe 2009). Auch aus anderen Nahrungsmitteln konnte *Cronobacter sakazakii* bereits isoliert werden. Hierzu gehören Früchte und Gemüse, Müsli, Kräuter und Gewürze, Milch, Fleisch und Fisch. Eine Kontamination konnte sowohl auf verarbeiteten als auch auf rohen Nahrungsmitteln gefunden werden (Friedemann 2007). Aufgrund einer Kontamination dieser Lebensmittel mit *Cronobacter sakazakii* konnte bisher allerdings noch kein Einfluss auf die Gesundheit von Konsumenten festgestellt werden (Friedemann 2007).

Staphylokokken sind Gram-positive, fakultativ anaerobe Kokken, die ubiquitär in der Umwelt vorkommen und in der Luft, Wasser, Menschen und Tieren gefunden werden können (Hennekinne et al. 2010; Namvar et al. 2014). Die Unterteilung der mehr als 50 Spezies erfolgt anhand ihrer Fähigkeit zur Bildung von Koagulase. Somit entstehen zwei Gruppen, Koagulase-positive und Koagulase-negative Staphylokokken (Hennekinne et al. 2010; Namvar et al. 2014). Während *Staphylococcus aureus* zu den Koagulase-positiven Staphylokokken zählt, ist *Staphylococcus epidermidis* Koagulase-negative (Hennekinne et al. 2010; Namvar et al. 2014). Bei *Staphylococcus aureus* handelt es sich um ein Toxin-produzierendes Bakterium, welches mit

zahlreichen Ausbrüchen nach dem Verzehr kontaminierter Lebensmittel assoziiert wurde (Kadariya et al. 2014). Nach dem Verzehr kann es zu erhöhter Speichelbildung, Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö mit abdominalen Krämpfen kommen. Im Gegensatz zu den zuvor erwähnten humanpathogenen Keimen können sich die Symptome bereits nach 24 – 48 h wieder legen (Kadariya et al. 2014). Lebensmittel, die mit Ausbrüchen assoziiert wurden, sind Fleisch- und Fleischprodukte, Milch- und Milchprodukte, Hühner- und Eiprodukte, Salat, Bäckereiprodukte (Kadariya et al. 2014). Im Vergleich zu *Staphylococcus aureus* wird *Staphylococcus epidermidis* über die Mikroflora der Haut und das Epithelium übertragen. Dabei kommt es hauptsächlich durch medizinische Implantate, Prothesen und Nebeninfektionen nach einem operativen Eingriff zu einer Infektion mit *Staphylococcus epidermidis*. Bakteriämie oder Entzündungen des Mittelfells sind mögliche Symptome einer Infektion (Namvar et al. 2014).

Zu den Grenzwerten für pathogene Bakterien in Lebensmitteln gibt es eine Norm der Europäischen Kommission aus dem Jahre 2005. Hier werden Grenzwerte für verschiedene Lebensmittel wie Fleisch, Milch, Eiprodukte, Fischereiprodukte, Gemüse und Obst festgelegt (Europäische Gemeinschaft 2005). In Tabelle 1 werden einige Grenzwerte für die oben beschriebenen Bakterien aufgelistet. Zur Kontrolle von Lebensmittel auf bestimmte Bakterien werden immer noch hauptsächlich klassische mikrobiologische Methoden verwendet (Priyanka et al. 2016). Je nach Bakterium gibt es unterschiedliche ISO-Normen, die das experimentelle Vorgehen zur Prüfung eines bestimmten Lebensmittels bzw. zum Nachweis eines Bakteriums vorgeben (Europäische Gemeinschaft 2005). In Abbildung 29 ist das Vorgehen einer solchen ISO-Methode beispielhaft für das Bakterium *Salmonella* graphisch dargestellt (siehe Kapitel 4.5.2). Der Nachweis beginnt meist mit der Anreicherung des Lebensmittels in einem selektiven oder nicht-selektiven Medium (ISO 22964:2006; ISO 6579:2002; ISO 11290-1:2017). Für manche Bakterien erfolgt eine Überimpfung der Voranreicherung in ein zweites, flüssiges selektives Medium, bevor Ausstriche auf selektiven Agarmedien angelegt werden (ISO 11290-1:2017). Anhand der Ausstriche werden verdächtige Kolonien identifiziert und auf nicht-selektive Medien überimpft, bevor Identifizierungen mit biochemischen oder molekularbiologischen Methoden durchgeführt werden (ISO 22964:2006; ISO 6579:2002; ISO 11290-1:2017). Da dieser Nachweis oft sehr lange dauern kann, wurden in den letzten Jahren viele Methoden entwickelt, um eine schnellere Anreicherung und Identifizierung von Bakterien in

Lebensmitteln zu erzielen (Priyanka et al. 2016). Hier zu erwähnen sind vor allem die PCR sowie immunologische Methoden wie ELISA. Aber auch an der Detektion von Bakterien in Lebensmitteln durch Bacteriophagen, DNA Microarray oder Nanobiotechnology wird geforscht (Priyanka et al. 2016).

**Tabelle 1: Verschiedene Grenzwerte von Bakterien in Lebensmitteln (Europäische Gemeinschaft 2005).**

<b>Lebensmittel</b>	<b>Bakterium</b>	<b>Grenzwert</b>
Verzehrfertige Nahrung für Säuglinge oder spezielle medizinische Zwecke	<i>Listeria monocytogenes</i>	0 KBE in 25 g
Hackfleisch und Fleischerzeugnisse für den Rohverzehr	<i>Salmonella</i>	0 KBE in 25 g
Hackfleisch und Fleischerzeugnisse aus Huhn, Verzehr nach kochen	<i>Salmonella</i>	0 KBE in 25 g
Käse, Butter oder Sahne aus Rohmilch oder Milch die nicht pasteurisiert wurde	<i>Salmonella</i>	0 KBE in 25 g
Milchpulver und Molkepulver	<i>Salmonella</i>	0 KBE in 25 g
Eiprodukte	<i>Salmonella</i>	0 KBE in 25 g
Ausgekeimte Samen, vorgeschnittene Früchte und Gemüse	<i>Salmonella</i>	0 KBE in 25 g
Käse, Milchpulver und Molkepulver	<i>Staphylococcus</i> Enterotoxine	Nicht detektiert in 25 g
Getrocknete Folgemilch	<i>Salmonella</i>	0 KBE in 25 g
Getrocknete Säuglingsnahrung und getrocknete Diät-nahrung für spezielle medizinische Zwecke	<i>Cronobacter</i>	0 KBE in 10 g
Sprossen	Shigatoxin- produzierender <i>E. coli</i>	0 KBE in 25 g
Käse aus Rohmilch	Koagulase-positive Staphylokokken	10 <sup>4</sup> – 10 <sup>5</sup> KBE/g
Milchpulver und Molkepulver	<i>Enterobacteriaceae</i>	10 KBE/g
	Koagulase-positive Staphylokokken	10 – 100 KBE/g
Getrocknete Säuglingsnahrung	<i>Enterobacteriaceae</i>	0 KBE in 10 g
Getrocknete Folgemilch	<i>Enterobacteriaceae</i>	0 KBE in 10 g
Eiprodukte	<i>Enterobacteriaceae</i>	10 – 100 KBE/g
Käse hergestellt aus Milch oder Molke die Hitzebehandelt wurde	<i>Escherichia coli</i> (Indikatorbakterium)	100 – 1000 KBE/g

### 2.3 Nachweis von Bakterien in Lebensmitteln

Viele pathogene Bakterien wie *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* oder *Escherichia coli* verbringen einen Teil ihres Lebens in humanen oder tierischen Wirten, sind aber gleichzeitig ubiquitär vorkommende Bakterien, die in vielen Bereichen der Umwelt wie Wasser, Boden, Kot oder auch Nahrungsmitteln zu finden sind (Winfield & Groisman 2003; Vázquez-Boland et al. 2001; Andino & Hanning 2015; van Elsas et al. 2011). Dort sind sie mit einer Vielfalt an unterschiedlichen Umweltbedingungen konfrontiert, wie niedriges Nahrungsangebot, Temperaturschwankungen oder unterschiedliche osmotische Bedingungen (Winfield & Groisman 2003; Gruzdev et al. 2012). Bakterien besitzen für ihr Wachstum einen Optimumbereich vieler Faktoren wie Wasseraktivität, pH-Wert oder Temperatur, sowie einen Minimum- und Maximumbereich, in dem immer noch Wachstum möglich ist (Institute of Food Technologists & Food and Drug Administration 2001). Doch auch außerhalb dieses Bereichs können viele Bakterien noch überleben und unter günstigen Umweltbedingungen ihr Wachstum wieder aufnehmen (Wu 2008; Busta 1975). Vor allem in der Lebensmittelindustrie spielt die Kontrolle von pathogenen Mikroorganismen, zum Schutz des Konsumenten vor einer Lebensmittelvergiftung, eine große Rolle (Institute of Food Technologists & Food and Drug Administration 2001; Wu 2008). Über verschiedene Routen können pathogene Mikroorganismen in Nahrungsmittel und die Produktionsfläche gelangen. Hier zu nennen sind Rohmaterialien (z.B. landwirtschaftliche Produkte), Luft, Wasser, Kontaktmaterialien, Personal oder Ungeziefer (Beuchat 2011, S. 11-13). Zur Kontrolle von Mikroorganismen in Lebensmitteln werden vor allem die oben erwähnten Faktoren für das optimale bakterielle Wachstum modifiziert (Institute of Food Technologists & Food and Drug Administration 2001). Hierzu gehört die Wasseraktivität von Nahrungsmitteln. Mikroorganismen benötigen Wasser in verfügbarer Form um zu wachsen und sich zu vermehren (Institute of Food Technologists & Food and Drug Administration 2001; Lebre et al. 2017). Dies wird auch als Wasseraktivität ( $a_w$ ) bezeichnet und wird definiert als Verhältnis des Wasserdampfdrucks des Lebensmittels zum Wasserdampfdruck von reinem Wasser bei derselben Temperatur (Institute of Food Technologists & Food and Drug Administration 2001; Esbelin et al. 2018). Der  $a_w$  von reinem Wasser ist 1,0, der  $a_w$  eines komplett dehydrierten Produktes 0,0 (Institute of Food Technologists & Food and Drug Administration 2001). Die Wasseraktivität eines Lebensmittels kann durch die Zugabe von Salz, Zucker oder durch die physikalische Entfernung von Wasser z.B. durch Trocknung gesenkt werden

(Institute of Food Technologists & Food and Drug Administration 2001; Esbelin et al. 2018). Das Wachstum der meisten pathogenen Bakterien kann durch eine Wasseraktivität unter 0,91 kontrolliert werden (Institute of Food Technologists & Food and Drug Administration 2001; Burgess et al. 2016). In Tabelle 2 ist die Wasseraktivität verschiedener Lebensmittel beispielhaft aufgelistet. Auch über den pH-Wert kann das Wachstum von Mikroorganismen in Nahrungsmitteln kontrolliert werden. Einige Lebensmittel sind bereits von Natur aus leicht sauer oder alkalisch, durch Fermentation oder den Zusatz von Säuren kann der pH-Wert von Lebensmitteln allerdings weiter gesenkt werden (Institute of Food Technologists & Food and Drug Administration 2001; Wesche et al. 2009). Ein weiterer Punkt ist die Lagertemperatur von Lebensmitteln bzw. das Abtöten von Mikroorganismen durch Hitze. Bei der Abtötung von Mikroorganismen durch Hitze ist z.B. die Pasteurisierung von Milch zu nennen. Hier gibt es unterschiedliche Arten der Pasteurisierung, mit Temperaturen zwischen 63 – 138°C und unterschiedlichen Zeiten zwischen 30 Minuten und 0,1 Sekunden (Watts 2016). Eine typische Methode um das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern ist das Senken der Temperatur auf 0 – 5°C bzw. -20 bis -30° C, je nach Lebensmittel (Ray 2004, S. 472-473). Dabei ist anzumerken, dass es einige Mikroorganismen, wie *Listeria monocytogenes*, auch bei Temperaturen von 4°C noch wachsen können (El-Gazzar et al. 1991). Bei Temperaturen von -20°C zeigen Mikroorganismen dagegen kein Wachstum, sondern können durch eine Lagerung bei diesen Temperaturen absterben (Ray 2004, S. 472-473). Aber auch andere Methoden werden für die Konservierung von Lebensmitteln verwendet, wie zum Beispiel Druck. Verwendet wird hier beispielsweise die Hochdruckverarbeitung oder Ultrahochdruck mit einem Druck von 100 – 800 MPa (Institute of Food Technologists & Food and Drug Administration 2001). Auch der Einsatz von Strahlung ist eine beliebte Methode zur Sterilisation von Lebensmitteln. Hier werden Wellenlängen zwischen 190 – 280 nm zur Sterilisation eingesetzt (Capozzi et al. 2009).

**Tabelle 2: Wasseraktivität verschiedener Lebensmittel (Institute of Food Technologists & Food and Drug Administration 2001)**

<b>Produkt</b>	<b><math>a_w</math></b>
Frisches Fleisch, Geflügel, Fisch	0,99 – 1,0
Natürlicher Käse	0,95 – 1,0
Eier	0,97
Geräuchertes Fleisch	0,87 – 0,95
Parmesan	0,68 – 0,76
Getrocknete Vollmilch	0,20
Frisches Obst und Gemüse	0,97 – 1,0
Brot	~0,96
Marmelade	0,75 – 0,80
Ungekochter Reis	0,80 – 0,87
Mehl	0,67 – 0,87
Getrocknete Früchte	0,55 – 0,80
Müsli	0,10 – 0,20
Zucker	0,19
Cracker	0,10

Durch die oben genannten Prozesse zur Abtötung von Mikroorganismen in Lebensmitteln, sowie zur Haltbarmachung von Lebensmitteln, entsteht für Mikroorganismen eine stressige Umgebung (Wesche et al. 2009). In der Arbeit von Wesche et al. wird für den Terminus „Stress“ die Definition eines physikalischen, chemischen oder nährwertbezogenen Zustandes angegeben, der nicht stark genug ist, um Mikroorganismen abzutöten und als Resultat subletal geschädigte Mikroorganismen hervorbringt (Wesche et al. 2009). Nach einem subletalen Stress enthält eine Population von Mikroorganismen tote Zellen die letal oder irreversibel verletzt wurden, unverletzte Zellen und Zellen, welche gestresst, subletal oder reversibel verletzt wurden (Wu 2008). Diese subletal geschädigten Mikroorganismen sind in der Lage den entstandenen Zellschaden zu reparieren und die Fähigkeit zur Bildung von Kolonien wiederzuerlangen (Wu 2008). Zur Bestimmung der Schädigung von Bakterien wird die Unfähigkeit dieser Zellen auf Minimalmedien bzw. Selektivmedien zu wachsen herangezogen (Ray & Speck 1972; Warseck & Speck 1973; Wesche et al. 2009, Wu 2008; Jasson et al. 2007). Es wird hier angenommen,

dass Schäden an der Zellwand und der Membran, zu einer veränderten Permeabilität der Zellen führen, welche die Zellen anfälliger für die selektiven Bestandteile wie z.B. Gallensalze, Tellurit, NaCl, Brilliantgrün oder Antibiotika machen (Wesche et al. 2009; Jasson et al. 2007). Weiterhin wurde eine längere Lag-Phase bei subletal geschädigten Mikroorganismen festgestellt (Jasson et al. 2007). Zur Bestimmung der Schädigungsrate wird das Wachstum auf nicht-selektiven sowie selektiven Nährmedien verglichen und nach der unten stehenden Formel berechnet (Besse et al. 2000; Jasson et al. 2007):

$$\%sublethale\ Schädigung = \frac{(KBE\ auf\ nicht-selektivem\ Medium) - (KBE\ auf\ selektivem\ Medium)}{(KBE\ auf\ nicht-selektivem\ Medium)} \times 100$$

Diese subletal geschädigten Mikroorganismen können ein potenzielles Sicherheitsrisiko für den Lebensmittelkonsumenten darstellen (Jasson et al. 2007; Wesche et al. 2009). Die Detektion von verschiedenen Mikroorganismen in Lebensmitteln erfolgt anhand verschiedener ISO-Referenzmethoden, welche im „Offiziellen Journal der Europäischen Union“ zusammen mit den jeweiligen Grenzwerten für Bakterien in Lebensmitteln angegeben sind (Europäische Gemeinschaft 2005). Einige der verwendeten ISO-Methoden beinhalten selektive Anreicherungen. Hier zu nennen ist unter anderem die ISO 11290-1 zum Nachweis von *Listeria monocytogenes*, welche als primäre Anreicherung für Lebensmittel zur Detektion von *Listeria monocytogenes* die Halb-Fraser-Bouillon nennt (ISO 11290-1:2017). Diese enthält selektive Komponenten, wie Lithiumchlorid, Nalidixinsäure und Acriflavin-Hydrochlorid, zur Hemmung der Begleitflora (Osborne & Bremer 2001). Geschädigte Listerien können diese selektiven Komponenten nicht mehr tolerieren und damit in dem Medium nicht angezogen werden. Dies kann zu einer Unterschätzung der Keimzahl im Lebensmittel führen und zu einem potenziellen Sicherheitsrisiko für den Lebensmittelkonsumenten (Busch & Donnelly 1992). In der Literatur wurde auch bereits ein Zellzustand beschrieben, welcher sich „viable but non culturable“ (VBNC) nennt (Zhao et al. 2017). In diesem Zustand sind die Zellen nicht mehr durch konventionelle Medien und Techniken kultivierbar, weisen allerdings weiterhin metabolische Aktivitäten auf und können unter bestimmten Bedingungen ihr Wachstum und ihre Zellteilung wiederaufnehmen (Kell et al. 1998; Zhao et al. 2017). Änderungen in der morphologischen Zellstruktur dieser Zellen können auftreten. Im Vergleich dazu zeigen ruhende oder schlafende Zellen keine Reaktionen bei der Testung auf Vitalzeichen (Kell et al. 1998; Zhao et al. 2017). Es wurde bereits berichtet,

dass Bakterien während der Verarbeitung von Lebensmitteln in den VBNC-Zustand eintreten und im Lebensmittel verbleiben können. Da VBNC-Zellen durch konventionelle Methoden nicht kultivierbar sein können, stellen sie ein ernstes Risiko für die Sicherheit von Lebensmitteln dar (Zhao et al. 2017).

Verschiedene Untersuchungen wurden bereits durchgeführt, um die Anreicherung und den Nachweis von gestressten Mikroorganismen zu verbessern. So zeigte sich für hitzestressierte *Escherichia coli* eine verbesserte Nachweisrate beim Zusatz von Pyruvat in das Nährmedium (Czechowitz et al. 1996). Dies wurde ebenfalls für hitze- und trockengestresste *Staphylococcus aureus* beim Zusetzen von Natrium-Pyruvat in das Medium, festgestellt (Czechowitz et al. 1996; Baird-Parker 1965). In einer Untersuchung von Murty & Gaur wurde 1987 festgestellt, dass die Zugabe von Tween 80 und Magnesiumchlorid zu VRB-Agar zu einer besseren Detektion gefriereschädigter *Escherichia coli* führt. Auch ein nicht-selektiver Anreicherungsschritt vor der Selektivanreicherung wurde als Möglichkeit angegeben (Clark & Ordal 1969; Busta & Smith 1976). Einige ISO-Normen z.B. zur Anreicherung von *Salmonella* oder *Cronobacter sakazakii* enthalten in ihrem Workflow eine Voranreicherung des jeweiligen Lebensmittels in gepuffertem Peptonwasser vor der Selektivanreicherung (ISO-6579:2002; ISO 22964:2006). Eine weitere Möglichkeit um die Detektion geschädigter Bakterien zu verbessern sind unterschiedliche Methoden des Ausplattierens. Hier sind einige Plattengussverfahren zu nennen, wie z.B. das Überlagerungsverfahren bei dem ein Plattengussverfahren mit CASO oder Platecount Agar durchgeführt wird. Im Folgenden werden die Bakterien im Brutschrank inkubiert, um ihnen Zeit zum Reparieren zu geben, bevor sie mit einem Selektivmedium überschichtet und inkubiert werden (Wu 2008). Bei der Oberflächenüberlagerungsmethode werden die Bakterien auf der Oberfläche eines nicht-selektiven Mediums ausplattiert und für 2 – 4 h inkubiert, bevor sie mit einem selektiven Medium überschichtet werden (Wu 2008). Eine weitere Möglichkeit ist ein Plattengussverfahren, bei dem Bakterien in einem nicht-selektivem Medium auf ein vorher gegossenes Selektivmedium gegeben und inkubiert werden. Dabei handelt es sich um die dünne Agarschichtmethode (Wu 2008).

Bei der Entwicklung dieser Methoden, oder auch von Nährmedien für den Einsatz für lebensmittelmikrobiologische Untersuchungen, ist die Verwendung von geschädigten Mikroorganismen von Vorteil (Jasson et al. 2007). Bei der Entwicklung von

Nährmedien oder Methoden für die lebensmittelmikrobiologischen Untersuchungen, müssen diese vor dem eigentlichen Einsatz validiert werden. Dies bedeutet, dass nachgewiesen werden muss, dass die jeweilige Methode für ihren Einsatzzweck geeignet ist und bestimmte definierte Bedingungen erfüllen kann (ISO 16140-1:2016). Für die Methodvalidierung im Bereich der Mikrobiologie, welche die Lebensmittelkette betrifft, wird die ISO-Norm 16140 eingesetzt (ISO 16140-1:2016; ISO 16140-2:2016; 16140-3:2017). Der Umfang der durchzuführenden Validierungsuntersuchungen wird in diesen ISO-Normen definiert. Hier wird unter anderem festgelegt, welche welche Art von Lebensmittel für die Validierung getestet werden müssen, sowie die Anzahl und der Umfang der Proben und Untersuchungen. Weiterhin werden Angaben zur Art und Menge der bakteriellen Inokulation von Lebensmitteln gemacht (ISO-16140-2:2016). Für die Validierung einer alternativen Methode bzw. eines alternativen Nährmediums wird eine bereits beschriebene und etablierte Referenzmethode benötigt. Die alternative Methode bzw. das alternative Nährmedium muss im Vergleich mit einer bereits etablierten Methode innerhalb gegebener Kriterien gleich gut oder besser abschneiden (ISO-16140-2:2016). Das Vorgehen der Validierung hängt dabei auch vom jeweiligen Mikroorganismus bzw. der jeweiligen Lebensmittelmatrix ab, für die die Methode bzw. das Nährmedium entwickelt werden soll (Europäische Gemeinschaft 2005; ISO-16140-2:2016). Werden beispielsweise ein neues Nährmedium oder eine neue Nachweismethode für *Listeria monocytogenes* validiert, so wird die Referenzmethode laut ISO 11290 und eine Lebensmittelmatrix verwendet, welche typisch für eine Kontamination mit *Listeria monocytogenes* ist (ISO-16140-2:2016; ISO 11290-1:2017). Bei der Auswahl von Lebensmitteln hat die Verwendung von natürlich kontaminierten Proben höchste Priorität (ISO 16140-2:2016). Eine genügende Anzahl an natürlich kontaminierten Proben zu erhalten, kann sich jedoch als schwierig herausstellen (Jasson et al. 2007; Wallace 1996). Deswegen ist es erlaubt, Lebensmittel auch artifiziell für die Untersuchungen zu kontaminieren (Wallace 1996, ISO-16140-2:2016). Da Mikroorganismen im Labor unter optimalen Bedingungen angezogen werden, im Lebensmittel jedoch subletal geschädigt bzw. gestresst vorliegen können, ist es wichtig für die Validierung ebenfalls Mikroorganismen einzusetzen, welche zuvor adäquat gestresst wurden (Jasson et al- 2007; Wu 2008; ISO-11133:2014, ISO-16140-2:2016). Dies wird mittlerweile auch in verschiedenen Normen erwähnt. So werden in der ISO 16140 Methoden angegeben, um Bakterien durch Hitze, Einfrieren, Lagerung

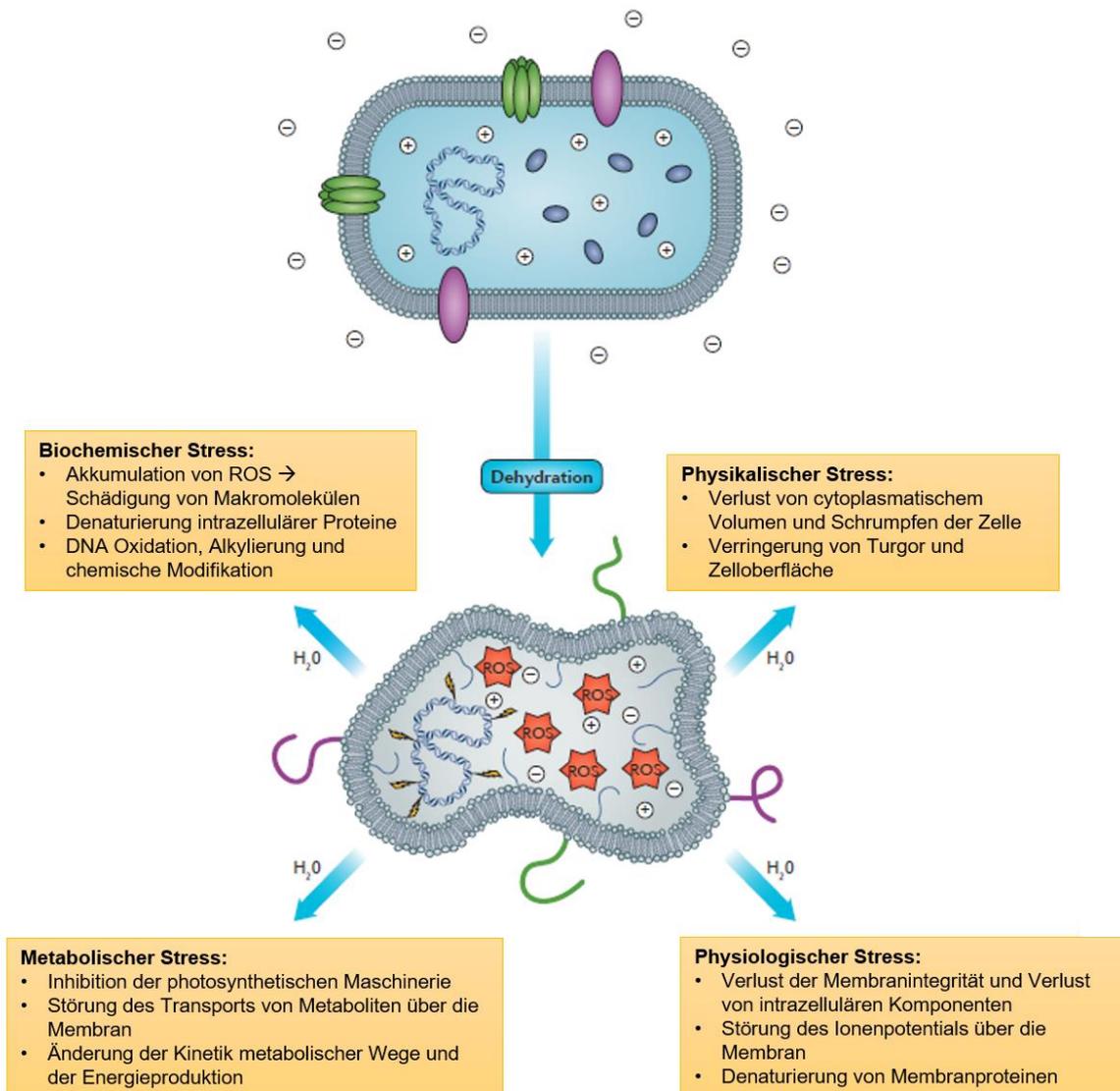
bei 4°C oder chemische Behandlung vor der Validierung zu stressen (ISO 16140-2:2016). In der ISO 11133 wird für die Leistungsprüfung von Nährmedien ebenfalls zur Berücksichtigung von stressgeschädigten Mikroorganismen geraten (ISO 11133:2014). Dies findet sich auch in AOAC Validierungsrichtlinie von 2012 und 2006, sowie einer EPA-Richtlinie für Trinkwasser-Testung von 2010 (AOAC 2006 & 2010; Environmental Protection Agency 2010). In einer Veröffentlichung von Rachon & Gibbs wurden hierzu Bemühungen beschrieben für die Validierung von innerbetrieblichen Bedingungen zur Produktion von Lebensmitteln mit niedriger Wasseraktivität geschädigte Bakterien einzusetzen, um den Einfluss der Pasteurisierung auf einige stellvertretende nicht-pathogene, gestresste Bakterien zu überprüfen (Rachon & Gibbs 2015). Auch in einer Online-Veröffentlichung von Schultz aus dem Jahr 2017 wurde das Vorhandensein kommerzieller Produkte für die Validierung von industriellen Prozessen beschrieben. Dabei handelt es sich um getrocknete, nicht-pathogene Bakterien, welche Lebensmitteln mit niedriger Wasseraktivität zugesetzt werden können, um den Erfolg eines Produktionsprozesses zu validieren (Schultz 2017). Es ist somit wichtig, für die Validierung neuer Methoden, sowie die Feststellung der Eignung verschiedener Nährmedien für die Detektion von Mikroorganismen in Lebensmitteln, auch geschädigte Mikroorganismen zu verwenden.

#### **2.4 Stressantwort von Bakterien bei osmotischem Stress**

Wasser ist ein essenzieller Bestandteil für biologische Prozesse und von immenser Bedeutung für alle lebenden Organismen und spielt unter anderem bei der korrekten Faltung von Proteinen und bei der Aufrechterhaltung von Zellstrukturen eine Rolle (Lebre et al. 2017; Esbelin et al. 2018). In manchen Habitaten kann es zu extremen Umweltbedingungen kommen, welche eine stressige Wirkung auf unterschiedliche Lebewesen haben können (Rebecchi et al. 2007). Hierzu gehört unter anderem auch der Stress durch Trocknung bzw. den Entzug von Wasser (Rebecchi et al. 2007; Esbelin et al. 2018). Dies kann entweder durch den Mangel an Wasser oder durch hohe Konzentrationen an gelösten Substanzen wie Salz oder Zucker verursacht werden (Lebre et al. 2017). Anhydrobiose wird ein Zustand bezeichnet, der es lebenden Organismen ermöglicht bei partieller oder totaler Austrocknung ihre vitalen Funktionen nach der Rehydration wieder aufzunehmen (García 2011). Toleranz gegen Austrocknung beschreibt die Fähigkeit eines Organismus beinahe komplett

auszutrocknen, ohne dabei die Lebensfähigkeit zu verlieren (Esbelin et al. 2018). Die Widerstandsfähigkeit bzw. Toleranz gegen Austrocknung ist dabei nicht nur im Reich der Bakterien, sondern auch bei Pflanzen und Tieren zu finden (Hoekstra et al. 2001; Rebecchi et al. 2007). Getrockneten Organismen wird nachgesagt, dass sie Jahrzehnte oder Jahrhunderte in diesem Zustand verbringen und nach der Rehydratation ihre normalen biologischen Funktionen wieder aufnehmen können (Crowe et al. 1998). Wie bereits in Punkt 2.3 beschrieben, benötigen Mikroorganismen Wasser in verfügbarer Form, um zu wachsen und sich zu vermehren. Die meisten Mikroorganismen können bei Wasseraktivitäten unter 0,91 nicht wachsen und sich vermehren (Lebre et al. 2017). Dieser Fakt wird von der Lebensmittelindustrie zur Verlängerung der Haltbarkeit von Lebensmitteln eingesetzt (Institute of Food Technologists & Food and Drug Administration 2001; Burgess et al. 2016; Esbelin et al. 2018). Viele Mikroorganismen sind in der Lage deutlich niedrigere  $a_w$ -Werte zu tolerieren, auf Lebensmitteln mit niedriger Wasseraktivität zu überleben und sich an die Gegebenheiten zu adaptieren (Lebre et al. 2017; Esbelin et al. 2018). Dies stellt ein potenzielles Risiko für den Lebensmittelkonsumenten dar (Burgess et al. 2016). Die Auswirkungen einer bakteriellen Zelle auf den Verlust von Wasser sind vielfältig und werden in Abbildung 3 graphisch dargestellt. Hierbei kann nicht nur der Verlust des Wassers eine schädliche Wirkung haben, sondern auch oxidative Effekte, welche durch das Austrocknen entstehen, können die Zelle immens schädigen (Lebre et al. 2017). Durch die Austrocknung der Zelle kommt es zu einem Efflux an Wasser durch Osmose, welche das cytoplasmatische Volumen der Zelle reduziert und ein Zusammenschrumpfen der Zelle und einen Verlust des Turgors bewirken kann (Csonka 1989; Lebre et al. 2017). Dies führt ebenfalls zu einem Anstieg der intrazellulären Metabolite in der Zelle (Csonka 1989, Lebre et al. 2017). Es treten auch Veränderungen in der Struktur der Membranlipide durch den Verlust des gebundenen Wassers an den Kopfgruppen der Phospholipid-Doppelschicht ein (Crowe et al. 1985; Leslie et al. 1995). Dadurch kommt es zu einer größeren Nähe zwischen den Kopfgruppen und den Acylketten, was zu van der Waals Interaktionen und zu einer Phasenverschiebung der Lipide von der flüssig-kristallinen in die Gelphase führen kann. Durch diese Phasenverschiebung kann es zu Membranfusionen und Brüchen in der Membran sowie Störungen in der laminaren Struktur kommen (Crowe et al. 1985; Leslie et al. 1995; Lebre et al. 2017). Vor allem bei der Rehydratation der Zellen kann dies zu einer Undichtigkeit der Membran führen (Crowe et al. 1985; Leslie et al. 1995).

Auch die Funktion von Proteinen wird durch den Verlust von Wasser in der Zelle beeinflusst, da dieses normalerweise mit der Oberfläche von Proteinen interagiert und für die richtige Faltung und Stabilität von Proteinstrukturen sorgt (Billi & Potts 2002; Lebre et al. 2017). Durch Dehydration verändert sich die Konformation von Proteinen und führt damit zu einem Verlust der Funktion (García 2011). Es kann ebenfalls zu unerwünschten Reaktionen und Vernetzung von Proteinen z.B. über die Ausbildung von Disulfidbrücken kommen (Billi & Potts 2002). Auch Reaktionen zwischen Proteinen und DNA über die sogenannte Maillard Reaktion sind möglich (Billi & Potts 2002; Lebre et al. 2017). Da es zu einer Inaktivierung vieler Proteine durch den Verlust von Wasser kommen kann, sind auch viele wichtige Stoffwechselwege, Transporter und Reparaturmechanismen außer Kraft gesetzt (Billi & Potts 2002; Lebre et al. 2017). Es kann ebenfalls zu einem Anstieg von oxidativem Stress durch eine Ansammlung von reaktiven Sauerstoffspezies kommen (Lebre et al. 2017). Organismen mit aerober Atmung nutzen Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Beim Vorgang der Atmung kann es zur Produktion solcher reaktiver Sauerstoffspezies wie Superoxid-Anionen, Wasserstoffperoxid oder Hydroxyl-Radikale kommen, welche unter normalen Bedingungen durch ein antioxidatives Abwehrsystem beseitigt werden würden (Franca et al. 2006). Durch den Zusammenbruch der Atmungskette kommt es zu einer Ansammlung dieser reaktiven Sauerstoffspezies in der Zelle (Lebre et al. 2017). In Hefezellen wurde ein 10-facher Anstieg der Oxidation nach Dehydration der Zellen beobachtet (Franca et al. 2006). Es kann ebenfalls zu einer Ansammlung von  $Fe^{2+}$  in der Zelle kommen, als Folge der Fehlfunktion von Transportproteinen (Lebre et al. 2017). Freies Eisen in der Zelle kann zur Produktion von Hydroxyl-Radikalen über Fenton Reaktionen oder über Lipidperoxidation führen (Everse & Hsia 1997). Die Ansammlung von verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies führt letztlich zu einem Dominoeffekt, durch eine Reaktion mit verschiedenen Komponenten in der Zelle (Lebre et al. 2017). Durch die Lipidperoxidation kann es weiterhin zur Bildung von Aldehyden kommen, welche Proteine schädigen können (Lebre et al. 2017). Auch können chemische Modifikationen an der DNA stattfinden, welche zu Entfernung von Basen, Einzelstrangbrüche oder Quervernetzungen führen können (Billi & Potts 2002).



**Abbildung 3: Auswirkungen von Dehydration auf eine bakterielle Zelle (nach Lebre et al. 2017).** Bei Abwesenheit von Wasser wirken verschiedene Arten von Stress auf die Zelle, wie physikalischer, metabolischer, biochemischer und physiologischer Stress. Dies führt unter anderem zum Verlust von Wasser, Verringerung von Turgor, Verlust der Membranintegrität, Störung von Stoffwechselforgängen, Denaturierung von Proteinen oder Bildung von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).

## 2.5 Anpassung von Bakterien an osmotischen Stress

Um Phasen der Austrocknung unbeschadet zu überstehen, haben Bakterien einige Strategien in Form einer Stressantwort entwickelt (Billi & Potts 2002; Franca et al. 2006). Dazu gehören viele molekulare Mechanismen und Veränderungen der Zellstrukturen, welche zur Adaption an die widrigen Umstände führen können (Lebre et al. 2017). Ein wichtiger Schritt in dieser Anpassung ist die Veränderung der Transkriptions- und Translationsschemas (Lebre et al. 2017). Sigmafaktoren können als Antwort auf verschiedene Umweltbedingungen die Transkription von bestimmten Genen veranlassen (Wallen & Perlin 2012). Die Interaktion des Sigmafaktors mit der

DNA erfolgt über die Bindung an eine DNA-abhängige RNA Polymerase (Wallen & Perlin 2012). Bei hyperosmotischem Stress und Dehydration werden zwei Sigmafaktoren RpoS und RpoE aktiviert (Du et al. 2011; Lebre et al. 2017). Obwohl beide Sigmafaktoren bei einigen Arten von Stress gleichermaßen aktiviert werden, reagieren sie auch auf unterschiedliche Stimuli (McMeechan et al. 2007). RpoE ist ein extracytoplasmatischer Sigmafaktor, der primär durch Stress an der Zellhülle aktiviert wird (McMeechan et al. 2007; Lebre et al. 2017). RpoE wird negativ reguliert wenn kein Stress vorliegt, indem der Sigmafaktor an einen Anti-Sigmafaktor RseA gebunden ist (McMeechan et al. 2007). RseA wird bei vorhandenem Hüllstress durch die Proteasen DegS und RseP gespalten und setzt RpoE frei (McMeechan et al. 2007). RpoS wird bei exponentiellem Wachstum negativ reguliert (Battesti et al. 2011). Die Aktivität von RpoS wird bei Hungerstress, hohem pH-Wert, hoher oder niedriger Temperatur, hoher oder niedriger Osmolarität (McMeechan et al. 2007; Dong & Schellhorn 2009; Wallen & Perlin 2012). Die Regulation von RpoS erfolgt auf verschiedenen Ebenen. Die Regulation findet auf der Ebene der Transkription, post-Transkription, Translation und post-Translation statt (Battesti et al. 2011). Eine Vielzahl an Genen wird durch RpoS reguliert (Dong & Schellhorn 2009). Unter anderem auch die Gene für den Glyoxylat-Shunt-Zyklus (*aceAB*), Gene für den Fettsäure-Transport (*fadABEHI*) und Gene für die Trehalose Biosynthese (*otsAB*), sowie für die Aldehyd-Dehydrogenase *aldB* (Vijayakumar et al. 2004; Dong & Schellhorn 2009). RpoE ist für die Expression von Genen verantwortlich die zur Synthese von Lipoproteinen (*yfiO*, *yeaY*, *yraP*), die Modifikation und Synthese von Proteinen der äußeren Membran (*yeaT*, *skp*, *fkpA*, *degP*) sowie einiger anderer Gene die zur Funktion der Zellhülle (*plsB*, *bacA*, *ahpF*, *ygiM*) beitragen (Wallen & Perlin 2012).

Die prinzipiellen Mechanismen, die der Anpassung zugrunde liegen, sind die Akkumulation von Osmoprotektoren in der Zelle zum Schutz von Proteinen, Schutz der DNA, Verhinderung von Wasserverlust und Verminderung des Energieverbrauchs und eine erhöhte Energiekonservierung (Csonka 1989; Spector & Kenyon 2012; Lebre et al. 2017). In den Membranen Gram-negativer Bakterien sind drei Arten von Phospholipiden zu finden, Phosphatidylglycerol (PG), Diphosphatidylglycerol (DPG) und Phosphatidylethanolamin (PE) (Brown et al. 2000). Unter  $a_w$ -Stress kann es zu einer Veränderung der relativen Anteile dieser Phospholipide kommen, um die Doppelschicht der Membran zu erhalten (Brown et al. 2000). Auch eine Veränderung der Zusammensetzung der Fettsäuren in der Membran findet statt (Lebre et al. 2017).

Es werden mehr negativ geladene Phosphatidylglycerole und Diphosphatidylglycerole anstelle von zwitterionischen Phosphatidylethanolaminen in die Membran eingebaut, da diese größere Kopfstrukturen aufweisen und eine stabilere Doppelschicht bilden können (Kocharunchitt et al. 2014; Brown et al. 2000). Auch das Verhältnis von *cis*- und *trans*- Fettsäuren sowie gesättigten und ungesättigten Fettsäuren wird zur Anpassung der Zellen an den Trockenstress verändert (Halverson & Firestone 2000; Scherber et al. 2009). Dies äußert sich in einem höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren, sowie Monoen- und Cyclopropanfettsäuren (Lebre et al. 2017). Dadurch wird unter anderem die Permeabilität der Membran für Protonen vermindert und damit der pH-Wert der Zelle ausbalanciert (Kocharunchitt et al. 2014; Halverson & Firestone 2000; Lebre et al. 2017). Durch die Veränderung des Verhältnisses von *cis*- und *trans*- Fettsäuren sowie gesättigten und ungesättigten Fettsäuren kann einerseits der Abstand zwischen den Phospholipiden vermindert und andererseits die Phasenübergangs-Temperatur beim Übergang zwischen Gel- zu Flüssigkristallphase verändert werden (Halverson & Firestone 2000; Scherber et al. 2009). Dies dient dazu die Membran beweglich zu halten und zu verhindern, dass sich die Membrankomponenten separieren (Halverson & Firestone 2000; Scherber et al. 2009).

Eines der primären Phänomene bei der Anpassungen an Dehydration stellt die Ansammlung kompatibler Solute in der Zelle dar (Sleator & Hill 2001). Es wird angenommen, dass es sich dabei um eine Zwei-Phasen Reaktion der Zelle handelt (Sleator & Hill 2001). Zunächst kommt es zu einem Einströmen von  $K^+$ -Ionen und dem Gegen-Ion Glutamat in die Zelle, was der Wiederherstellung des intrazellulären Wassergehalts und der Aufrechterhaltung des Turgors dient (Riedel & Lehner 2007; Spector & Kenyon 2012). Für den Anstieg der Konzentration von  $K^+$ -Ionen in der Zelle ist eine erhöhte Transkription des *kdpABC* Operons verantwortlich, welches einen hoch-affinen  $K^+$ -Transporter kodiert und durch das Trk-Transportsystem unterstützt wird, welches eine geringere Affinität für  $K^+$ -Ionen aufweist (Spector & Kenyon 2012). Der zweite Schritt ist die Ansammlung von kompatiblen Soluten, welche auch in hohen Konzentrationen eine Vereinbarkeit mit den zellulären Funktionen aufweisen, in der Zelle (Sleator & Hill 2001; Riedel & Lehner 2007). Diese neutral geladenen Solute sorgen für eine langanhaltende Stabilisierung der osmotischen Balance und vermindern eine Entfaltung und Denaturierung von Proteinen (Lebre et al. 2017). Zu diesen kompatiblen Soluten zählen Trehalose, Prolin, Ectoin und Glycin-Betain

(Csonka 1989; Spector & Kenyon 2012). In die Zelle transportiert werden Prolin und Glycin-Betain durch den membranständigen ABC-Transporter ProU und den H<sup>+</sup>-Symporter ProP (Spector & Kenyon 2012). In *Escherichia coli* wird Cholin, eine Vorstufe für die Synthese von Glycin-Betain, durch das Protein BetT über die Membran transportiert (Spector & Kenyon 2012). Auch das Protein OmpC, welches in der äußeren Membran sitzt, wird unter osmotischem Stress hochreguliert und kann einen Kanal für das Eindringen von kompatiblen Soluten wie Glycin-Betain sein (Spector & Kenyon 2012). Trehalose kann dagegen von der Zelle selbst hergestellt werden. Die Reaktion besteht aus der Kondensation von Glukose-6-Phosphat mit Uridin Diphosphat-Glukose zu Trehalose-6-Phosphat und wird von der Trehalose-6-Phosphat Synthetase katalysiert (Csonka 1989). Diese wird durch die Gene *otsA* und *otsB* kodiert (Spector & Kenyon 2012). Die Wirkung von Trehalose auf verschiedene Zellkomponenten ist noch nicht abschließend geklärt (Jain & Roy 2009). Es wird unter anderem angenommen, dass Trehalose als Ersatz für Wasser in der Zelle dient und z.B. die Phasenverschiebung der Zellmembran und damit eine Zerstörung der Membranstruktur verhindert (Leslie et al. 1995). Auch bestehen die Theorien, dass Trehalose eine Art Glasmatrix um ein Protein formt, welche an einen Kokon erinnert und das Protein damit vor Schaden schützt (Jain & Roy 2009). Eine weitere Theorie besagt, dass es keine direkte Interaktion zwischen Trehalose und Biomolekülen gibt und Trehalose stattdessen Wasser bindet und die Kompaktierung und Stabilität des Biomoleküls erhöht (Jain & Roy 2009). Die vierte Theorie sieht Trehalose als Ersatz für Wasser. Über Wasserstoffbrücken bindet Trehalose an das Protein und stabilisierte es dadurch (Jain & Roy 2009).

Durch Veränderungen des Energiebedarfs und der Kinetik von Stoffwechselwegen wird es notwendig Veränderungen im Stoffwechsel der Zelle durchzuführen. Dies kann zur Verlagerung von Anabolismus zu Katabolismus führen (Lebre et al. 2017). Generell werden Gene des Citratzyklus, der Glykolyse und des Glyoxylat-Shunt-Zyklus induziert um den Bedarf an benötigter Energie zu decken (Lebre et al. 2017). Es wird ebenfalls vermutet, dass die Nutzung alternativer Stoffwechselwege zur Minimierung von oxidativem Stress führen sollen (Gruzdev et al. 2012; Franca et al. 2007). Wie bereits oben beschrieben, kann die Zelle zum Schutz vor osmotischem Stress Trehalose aus Glukose bilden (Csonka 1989). Da Glukose für die Produktion für Trehalose verwendet wird, muss die Produktion der nötigen Energie, z.B. für den Import von kompatiblen Soluten in die Zelle, über eine andere Energiequelle produziert werden

(Finn et al. 2013). Bereits in einigen Veröffentlichungen wurde eine erhöhte Expression von Genen für den Fettsäure-Katabolismus beschrieben (Li et al. 2012; Finn et al. 2013a). Im Vergleich zu Glukose kann durch den Abbau von Fettsäuren mehr ATP pro Kohlenstoffatom gewonnen werden (Li et al. 2013). Fettsäuren können zu Acetyl-CoA abgebaut und in den Citratzyklus eingeschleust werden (Li et al. 2012). Auch Gene des Glyoxylat-Shunt-Stoffwechselweges können unter Dehydration höher reguliert werden (Gruzdev et al. 2012; Kocharunchitt et al. 2014). Verwendet werden Fettsäuren und Acetat als Kohlenhydratquellen (Ahn et al. 2016). Es wird vermutet, dass der Glyoxylat-Shunt-Zyklus den Fluss von Metaboliten durch den Citratzyklus vermindern und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies verhindern soll (Gruzdev et al. 2012). Zur Verminderung des Energieverbrauchs werden unnötige Prozesse und Funktionen, wie die Bildung von Flagellen oder Systeme für die Chemotaxis, heruntergefahren (Kocharunchitt et al. 2014; Lebre et al. 2017).

Zum Schutz der Zelle vor reaktiver Sauerstoffspezies, sowie zum Schutz vor Denaturierung von Proteinen und Schädigung der DNA werden von der Zelle ebenfalls verschiedene Maßnahmen ergriffen. Um die fehlerhafte Faltung oder Denaturierung von Proteinen zu verhindern, werden in gestressten Zellen Chaperone synthetisiert (Riedel & Lehner 2007; Kocharunchitt et al. 2014; Lebre et al. 2017). Hierzu gehören beispielsweise die Chaperone DnaK, DnaJ, GroES, GroEL sowie Hitzeschockproteine GroEL und IbpA (Gruzdev et al. 2012; Kocharunchitt et al. 2014; Lebre et al. 2017). Zur Minimierung von oxidativem Stress und zur Umsetzung von reaktiven Sauerstoffspezies können eine Reihe von Enzymen gebildet werden. Hierzu gehören zum Beispiel Peroxidase, Katalasen und Superoxid Dismutasen sowie Antioxidantien wie Glutathion, Vitamin C und E (Franca et al. 2007). Durch die Superoxid Dismutase werden beispielsweise Superoxid-Anionen zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid umgesetzt, welches weiter abgebaut werden kann durch Katalase und Peroxidase (Franca et al. 2007). Glutathion kann Enzyme mit Thiolgruppen beschützen und direkt reaktive Sauerstoffspezies abfangen und dabei zu Glutathion-Disulfid oxidiert werden (Franca et al. 2007). Eine weitere Möglichkeit zum Schutz der Zelle, beispielsweise vor schädigenden Aldehyden, kann die Bildung von Aldehyd-Dehydrogenasen wie AldB sein, welche reaktive Aldehyde in ihre Säureform überführen können (Xu & Johnson 1995; Billi & Potts 2002; Lebre et al. 2017). Auch die DNA ist einer der Hauptangriffspunkte bei Dehydration der Zellen durch Alkylierung, Oxidation, Quervernetzung oder Entfernung von Basen (Billi & Potts 2002). Durch Dehydration

wurden in *Escherichia coli* Einzel- und Doppelstrangbrüche entdeckt (Asada et al. 1979). Es wurde vermutet, dass die Mechanismen zur Reparatur der DNA nur im rehydrierten Zustand aktiv sind und der Schutz der DNA vor reaktiven Sauerstoffspezies kritischer ist, als die Reparatur der DNA (Potts 1994; García 2011). In *E. coli* wurden zwei Gene, *recA* und *uvrA*, identifiziert, welche zum Reparatursystem der DNA gehören und bei Deletion eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber der Trocknung verursachten (Asada et al. 1979). In *Bradyrhizobium japonicum* wurden unter Trockenstress ebenfalls einige Gene induziert, die mit der Modifikation und Reparatur der DNA zusammenhängen können. Unter anderem eine ATP-abhängige RNA Helikase, ein DNA Mismatch-Protein und ein DNA-Rekombinations- und Reparaturprotein (Cytryn et al. 2007). Unter oxidativem Stress kann auch das Protein RecG höher exprimiert werden, welches ein wichtiges Protein zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen bei der Rekombination ist (Mahdi et al. 1997; Rudolph et al. 2010). Es soll sowohl an der Bildung von Holliday-Strukturen während der Rekombination als auch bei der Entwindung von DNA-Strukturen und an der Regulation von Genen beteiligt sein (Rudolph et al. 2010; Yeom & Park 2012). Zum Schutz der DNA wurde das Protein Dps in Bakterien identifiziert. Das Protein soll an die DNA binden können und für die Kondensation des Chromatins verantwortlich sein, welches die DNA abschirmen und vor dem Angriff durch reaktive Sauerstoffspezies schützen soll (Martinez & Kolter 1997; Wolf et al. 1999; Halsey et al. 2004). Des Weiteren soll Dps die Fähigkeit haben Fe(II) zu oxidieren und zu binden und damit die Zelle vor weiterem Schaden durch Fenton Reaktionen zu bewahren (Zhao et al. 2002).

## 2.6 Hitzeschock-Antwort von Bakterien

Für jedes Bakterium gibt es eine minimale und maximale Temperatur, in der Wachstum noch möglich ist (Russel 2003). Die Behandlung von Lebensmitteln durch Hitze ist ein Vorgang, der bereits seit vielen Jahren für die Kontrolle von Mikroorganismen verwendet wird (Li & Gänzle 2016). Dabei können hohe Temperaturen Schaden an verschiedenen Bereichen der Zelle anrichten. Darunter die Zellwand, die äußere Membran, Ribosomen, RNA, DNA, Proteine und Enzyme (Russel 2003). Eine Schädigung der äußeren Membran, durch das Ablösen von Lipopolysacchariden, wurde durch das Austreten von Zellkomponenten in das umgebende Medium, nach einer Behandlung der Zellen mit Hitze, nachgewiesen (Tsuchido et al. 1985). Bei dem

Gram-positiven *Staphylococcus aureus* konnte durch die Einwirkung von Hitze ein Schrumpfen der Zelle, sowie Austritt von intrazellulären Komponenten beobachtet werden (Allwood & Russel 1967). Das Hauptziel von Hitzestress sind allerdings Proteine und Enzyme, deren Struktur und Faltung bis hin zur Koagulation durch Hitze gestört werden kann (Russel 2003; Wallen & Perlin 2012). Die Hitzeschock-Antwort kann bereits bei kleinen Temperaturabweichungen ausgelöst werden. Da der Temperaturbereich in dem die Faltung von Proteinen stabil ist sehr klein sein kann, kann es bereits bei kleinen Schwankungen zu einer Entfaltung von Proteinen kommen (Richter et al. 2010). Zum Schutz der Zelle gibt es einige Mechanismen, welche durch die Sigmafaktoren RpoH und RpoE reguliert werden (Spector & Kenyon 2012). Dabei scheint RpoE für falsch gefaltete Proteine der äußeren Membran und RpoH für die falsch gefalteten Proteine im Cytoplasma zuständig zu sein (Wallen & Perlin 2012). Die mRNA von RpoH weist bei niedrigen Temperaturen (30°C) eine Sekundärstruktur auf, welche die Transkription verhindert. Bei Temperaturen um 40°C lösen sich die Wasserstoffbrücken und die mRNA wird zugänglich für die Transkription (Spector & Kenyon 2012). Die Antwort auf einen Hitzeschock besteht prinzipiell aus der Synthese von Hitzeschock-Proteinen wie Chaperonen und Proteasen (Segal & Ron 1998). RpoH ist für die Transkription von mehr als 30 Hitzeschockproteinen verantwortlich, welche als Chaperone oder Proteasen dienen (Spector & Kenyon 2012). Viele Hitzeschockproteine sind molekulare Chaperone und ATP-abhängige Proteasen. Zu den molekularen Chaperonen, welche für die Reparatur und Faltung von Proteinen verantwortlich sind, gehören GroEL (Hsp60), GroES, DnaK (Hsp70) und DnaJ. Proteasen wie ClpP, Lon oder HslVU sind dagegen für den Abbau von falsch gefalteten und aggregierten Proteinen verantwortlich (Segal & Ron 1998; Rosen & Ron 2002; Li & Gänzle 2016). Auch unter normalen Umweltbedingungen werden Hitzeschockproteine synthetisiert und scheinen damit auch unter normalen zellulären Bedingungen eine Rolle zu spielen (Yura et al. 1993). Eine Induktion von Hitzeschockproteinen kann auch unter anderen stressigen Bedingungen erfolgen, z.B. bei Hungerstress, Phageninfektion, Vorhandensein von entfalteten Proteinen, DNA-schädigenden Substanzen oder Ethanol, sowie in der Anwesenheit von Metallen wie Cadmium (Courgeon et al. 1984; Michel & Starke 1986; Yura et al. 1993). Die Hitzeschock-Proteine sind in vielen verschiedenen biologischen Spezies vorhanden und zeigen eine starke Konservierung (Schlesinger 1994). Infolge von Hitzestress kann es auch zu anderen Anpassungen durch die Zelle kommen. Wie bereits in den

vorherigen Kapiteln beschrieben, kann eine Änderung in der Zusammensetzung von Membranen oder der Zellwand die Zelle vor verschiedenen Arten von Stress schützen (Li & Gänzle 2016, Yoon et al. 2015; Lebre et al. 2017). Die Fluidität der Membran ist ein entscheidender Faktor für die Permeabilität und kann im Falle eines Stresses modifiziert werden, um die Zelle zu schützen (Yoon et al. 2015). Die Größe und Ladung der Phospholipid-Kopfgruppen, sowie die Zusammensetzung der Fettsäuren sind für die Packdichte und Fluidität der Membran verantwortlich (Yoon et al. 2015). In Hitze-gestressten *Escherichia colis* wurde ein erhöhter Anteil an gesättigten Fettsäuren in der Membran beobachtet, welche einen höheren Schmelzpunkt besitzen und die Fluidität der Membran im Ausgleich zur Temperaturerhöhung senkt (Yuk 2003; Ruan et al. 2011). Für *E. coli* wurde ebenfalls ein Einfluss der Absonderung von Exopolyssachariden, zur Bildung einer dicken, schleimigen Matrix auf der Zelloberfläche, mit der Resistenz gegen Hitze und Säure in Verbindung gebracht (Mao et al. 2001). Auch eine erhöhte Bildung von Transportproteinen in der äußeren Membran wurden mit der Resistenz gegen einen Hitzeschock assoziiert (Ruan et al. 2011). Ein möglicher Zusammenhang könnte die Ansammlung kompatibler Solute sein, für die ein Einfluss auf die Integrität von Ribosomen und auf die Lebensfähigkeit der Zellen festgestellt wurde (Pleitner et al. 2012). Durch einen Hitzeschock wurde ebenfalls ein Anstieg des oxidativen Stresses durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies z.B. Superoxidanion festgestellt, welcher zu einer Induktion der Superoxid-Dismutase führte. Es wurde vermutet, dass die Bildung dieses Radikals durch die Störung der Elektronentransportkette entsteht (Privalle & Fridovich 1987). Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und die Assoziation mit der Atmungskette wurde auch für *Saccharomyces cerevisiae* hergestellt, sowie die Sensitivität gegenüber Hitze bei Deletions-Mutanten in Genen zur Bildung von Antioxidantien, Katalase, Superoxid-Dismutase und Cytochrom C-Peroxidase (Davidson et al. 1996; Davidson & Schiestl 2001). Für *Salmonella enterica* ser. Typhimurium wurde eine erhöhte Sensitivität gegen Hitze bei Deletion des OxyR Regulators, welcher eine Reihe von Genen zur Antwort auf oxidativen Stress aktiviert, festgestellt (Christman et al. 1985). Eine weitere Maßnahme der Zelle könnte der Schutz der DNA während eines Hitzeschocks sein, z.B. durch die Bildung des Proteins Dps. Dieses Protein schützt die DNA durch Kompaktierung und Abschirmung, sowie auch durch die Bindung von Metallionen, welche die DNA potenziell schädigen können (Nair & Finkel 2004; Karas et al. 2015).

## 2.7 Ziel der Arbeit

Bei der Entwicklung von Nährmedien oder Nachweissystemen für lebensmittelmikrobiologische Untersuchungen müssen Validierungen durchgeführt werden, um sicherzustellen, dass ein Produkt bestimmte Anforderungen erfüllt (Sohier et al. 2014; ISO 16140-2:2016). Die Vorgaben für die Art und Durchführung dieser Validierungen erfolgt nach den Angaben der Internationalen Organisation für Normung (ISO 16140-2:2016). Für die Validierung werden für das jeweilige Bakterium relevante Lebensmittel eingesetzt. Diese sollten möglichst natürlich kontaminiert sein, es ist jedoch erlaubt artifiziell kontaminierte Lebensmittel zu verwenden (ISO 16140-2:2016). Lebensmittel stellen, aufgrund der industriellen Verarbeitungsprozesse zur Abtötung von Bakterien und Haltbarmachung der Produkte, eine stressige Umgebung dar und können zur Schädigung der bakteriellen Zelle führen (Wesche et al. 2009). Da diese Bakterien oft nicht mehr nachgewiesen werden können, da sie sensitiv auf selektive Stoffe in Nährmedien reagiere, stellen sie eine besondere Herausforderung für lebensmittelmikrobiologische Untersuchungen dar (Wesche et al. 2009; Jasson et al. 2007). Es ist daher wichtig bereits während der Validierung alternativer Methoden, auch geschädigte Mikroorganismen zu berücksichtigen, um die bestmögliche Methode für den bakteriellen Nachweis zu entwickeln (Jasson et al. 2007).

Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung von Schädigungsprotokollen für verschiedene Bakterien mit einer Relevanz für die Lebensmittelmikrobiologie. Die Art der Schädigung sollte den Gegebenheiten im Lebensmittel bzw. während des Verarbeitungsprozesses entsprechen. Ausgewählt wurden die Schädigung durch Trocknung in Pulvern wie Laktose-Monohydrat und Milchpulver sowie Hitzeschädigung durch möglichst hohe Temperaturen. Diese geschädigten Bakterien sollten im Anschluss gelagert werden und dabei eine möglichst stabile Keimzahl und Schädigungsrate aufweisen. So sollte sichergestellt werden, dass auch für länger andauernde Validierungen dasselbe Probenmaterial verwendet werden kann.

Desweiteren sollten Untersuchungen zu den molekularen Prozessen der Schädigung durchgeführt werden. Anhand von Vergleichen des Proteoms von gestressten und ungestressten Bakterien sollte eine Charakterisierung des jeweiligen Stresses erfolgen. Wichtige Proteine, welche relevant für den Schutz der Zelle vor dem jeweiligen Stress sind sollten dadurch ermittelt werden, um ein besseres Verständnis für das Verhalten der Bakterien unter stressigen Bedingungen zu bekommen.

### 3 Material und Methode

#### 3.1 Verwendete Bakterien

Tabelle 3: Verwendete Bakterien

Spezies	ATCC® - Nummer
<i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium	14028
<i>Staphylococcus aureus</i>	25932
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
<i>Cronobacter sakazakii</i>	29004
<i>Listeria monocytogenes</i>	19111
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	700728
<i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium	14028
<i>Salmonella enterica</i> ser. Enteritidis	13076

#### 3.2 Verwendete Geräte

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Ultraschallgerät	Prototyp	Merck KGaA
Isoelektrische Fokussierung	Protean IEF Cell	Bio-Rad
Gelelektrophorese-System	kuroGel Verti 2020	VWR
Gelelektrophorese-System	Novex Xcell II	Life technologies
Spannungsgerät	Power Source 300 V	VWR
Spektrophotometer	Nanodrop 2000/2000c	Thermo Scientific
Autoklav	VX-75	Systec
Mikrowelle	Micromat	AEG
Abdampfwasserbad		GFL
Inkubationsbad		GFL
Autoklav	Vakulab HL	MMM Group
Densitometer	GS-800 Calibrated Densitometer	BioRad
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 16R	Thermo Scientific
Stomacher	Masticator	IUL
Zentrifuge	Centrifuge 5417R	eppendorf
Zentrifuge	Centrifuge 5804R	eppendorf
Zentrifuge	Megafuge 16R	Thermo Scientific
Wippe/Schüttler	Rockomat Typ 270	Tecnomara
Überkopfschüttler	Reax 2	heidolph
Reagenzglasschüttler	4441372	VWR

Waage	PR5002 Delta Range	Mettler Toledo
Feinwaage	AR261 Delta Range	Mettler Toledo
PCR-Kabinet	Captair bio	erlab
Produktschutzbank	Heraguard	Thermo Scientific
Sicherheitswerkbank	Herasafe KS	Thermo Scientific
Gefriertruhe -80°C	Herafreeze	Thermo Scientific
Kühlschrank	Profiline	Liebherr
Magnetrührer	RCT basic	IKA
Magnetrührer	RET basic	IKA
Brutschrank	IF750	Memmert
Brutschrank	B6420	Heraeus Instruments
Mini Zentrifuge	Galaxy MiniStar	VWR
ThermoMixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Real-Time PCR-Cycler	Stratagene MC3005P	Agilent
Gerät zum Zellaufschluss Disruptor	Disruptor Genie	Scientific Industries

### 3.3 Verwendete Nährmedien, Chemikalien und Lebensmittel für die Schädigungs- und Validierungsversuche

**Tabelle 5: Verwendete Nährmedien, Chemikalien und Lebensmittel für die Schädigungs- und Validierungsversuche**

<b>Artikel</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Maximale Wiederbelebungslösung	1125350500	Merck KGaA
Gepuffertes Peptonwasser	1072280500	Merck KGaA
XLD-Agar	1052870500	Merck KGaA
CASO-Agar	1054580500	Merck KGaA
CASO-Bouillon	1054590500	Merck KGaA
CASO-Fertigagarplatten	1464310100	Merck KGaA
Chromocult Enterobacter Sakazakii Agar	1008730500	Merck KGaA
Hirn-Herz-Bouillon	1104930500	Merck KGaA
Baird Parker Agar	1054060500	Merck KGaA
Mannit-Kochsalz-Penolrot Agar	1054040500	Merck KGaA
SMAC-Agar	1092070500	Merck KGaA
PALCAM-Listeria Selektivagar (Basis)	1117550500	Merck KGaA
Columbia Blutagar	1465590100	Merck KGaA

Columbia III Agar mit 5% Schafsblut	254098	BD
RVS-Bouillon	10770	Merck KGaA
MKTTn-Bouillon	105878	Merck KGaA
Rambach-Agar Fertigplatten	HEIP1467190100	Merck KGaA
XLD-Agar Fertigplatten	HEIP14607301209	Merck KGaA
CT-Supplement	1092020010	Merck KGaA
Eigelb-Tellurit Emulsion	1037850001	Merck KGaA
PALCAM-Listeria Selektivsupplement	1121220010	Merck KGaA
Kaliumiodid	105043	Merck KGaA
Iod	104760	Merck KGaA
Kieselgel	107735	Merck KGaA
Glycerin 85%	1040911000	Merck KGaA
Laktose-Monohydrat	1076570500	Merck KGaA
Trehalose	1082160100	Merck KGaA
Singlepath® <i>Salmonella</i>	104140	Merck KGaA
Beba Pro Kindermilch ab dem 12. Monat	4122080612	Nestlé
Bebivita 1 Anfangsmilch	1116-01	Bebivita

### 3.4 Verwendete Chemikalien

Verwendete Chemikalien für die 2D-Gelelektrophorese und die Reverse Transkription mit anschließender Real-Time PCR.

**Tabelle 6: Verwendete Chemikalien für die 2D-Gelelektrophorese**

Artikel	Bestellnummer	Hersteller
ReadyStrip IPG Streifen pH 4-7, 7 cm	1632001	BioRad
ReadyStrip IPG Streifen pH 3-10, 7 cm	1632000	BioRad
ReadyStrip IPG Streifen pH 4-7, 17 cm	1632008	BioRad
ReadyStrip IPG Streifen pH 3-10, 17 cm	1632007	BioRad
Equilibration Buffer I	1632107	BioRad
Equilibration Buffer II	1632108	BioRad
2-D Rehydration/Sample Buffer	1632106	BioRad
2-D Rehydration/Sample Buffer 1	1632083	BioRad
Iodoacetamid	1632109	BioRad
ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit	1632130	BioRad

ReadyPrep™ Overlay Agarose	350003210	BioRad
Mineralöl	BioRad	1632129
10x Tris-Glycine-SDS Puffer	Sigma Aldrich	T7777
Acrylamid Fertiglösung 30%	Merck	1.006.391.000
Ammonium Peroxidsulfat (APS)	AppliChem	A2941,0100
TEMED	Amresco	M146-25ML
2-Propanol	Merck	100.991.000
In-Gel Tryptic Digestion Kit	Thermo Scientific	89871
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	23227
Methanol	Merck	1.060.091.000
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 10 - 250 kDa	Thermo Scientific	26619
PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific	26630
Wasser Mol. Bio grade, DNase-, RNase and Protease-free	Merck KGaA	H20MB0501
Bromphenolblau	Merck KGaA	108122
Tris Base	648310	Calbiochem
10x PBS-Puffer	E703-500ML	VWR
Magnesiumchlorid	8147330100	Merck KGaA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	1137600100	VWR / Merck Chemicals
Glaskugeln 0,1 mm	N029.1	Carl Roth
Coomassie Brilliantblau	A1092,0100	AppliChem
PMSF	A0999,0025	AppliChem
EDTA	1084170100	VWR
Elektroden Wicks	165-4071	BioRad
Ethanol	100983	Merck KGaA
Essigsäure / Eisessig 96%	100062	Merck KGaA
Salzsäure rauchen 37%	1003171000	Merck KGaA
Glycin	103669	Merck KGaA
Agarose	101236	Merck KGaA

**Tabelle 7: Verwendete Chemikalien für die Reverse Transkription und Real-Time PCR**

<b>Artikel</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Water, Mol. Bio grade, DNase-, RNase and Protease-free	2900136	5 Prime GmbH
PCR Nucleotide Mix	14253900	Roche
Deoxynucleosid Triphosphate Set, PCR Grade	11969 064 001	Roche
Nova Taq Hot Start DNA Polymerase	71091-3	Merck KGaA
Eva Green 25 mM in DMSO	31002	Biotium Inc.
RNeasy MiniKit	74104	Qiagen
RNase-free DNase-Set	52900401	5 Prime GmbH
RNase-free DNase-Set	79254	Qiagen
RNAprotect® Bacteria Reagent	76506	Qiagen
Lysozym	1052810010	Merck KGaA
TE-Puffer	93283	Sigma Aldrich
Random Primer Hexamer	A9369,0030	AppliChem
SuperScript™ III Reverse Transcriptase	18080093	Thermo Scientific
Proteinase K aus Tritirachium album	P4850	Sigma Aldrich
Ethidiumbromid	1.116.080.030	Merck

### 3.5 Verwendete Internetseiten

**Tabelle 8: Verwendete Internetseiten**

<b>Internetseite</b>	<b>Internetadresse</b>
NCBI	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
TIB Molbiol	<a href="https://www.tib-molbiol.de/de/">https://www.tib-molbiol.de/de/</a>
Clustal Omega	<a href="https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a>
NCBI – Primer Blast	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>
PubMed	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</a>
UniProt	<a href="https://www.uniprot.org">https://www.uniprot.org</a>

### 3.6 Verwendete Software

Tabelle 9: Verwendete Software

Software	Hersteller
MxPro – Mx3005P, v 4.10, 2007	Agilent Technologies
NanoDrop 2000/2000c, 1.4.1, 2009	Thermo Scientific
Proteome Discoverer 2.1 SP1, Version 2.1.1.21	Thermo Scientific
Quantity One™ Image Analysis Software	BioRad

### 3.7 Anzucht von Bakterien und Keimzahlbestimmung

#### 3.7.1 Erstellung von gebrauchsfertigen Vorkulturen auf Plastikperlen

Alle verwendeten Mikroorganismen stammten aus der Stammsammlung der Firma Merck KGaA und wurden nach der folgenden Anleitung hergestellt. Für die Herstellung wurde eine Kultur des jeweiligen Bakteriums aus der Stammsammlung auf Blutagar ausgestrichen und für 18 bis maximal 24 h bei 36°C im Brutschrank inkubiert. Von der Agarplatte wurden Bakterien mit einer Impföse abgenommen und in Hirn-Herz-Bouillon mit 15% Glycerin gelöst. Es wurde 1 ml dieser Suspension in Röhrchen mit Plastikperlen gegeben und diese 10 Minuten stehen gelassen. Der Überstand wurde abpipettiert, die Perlen einzeln mit einer Pinzette in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C eingefroren.

#### 3.7.2 Anzucht von Bakterien

Die in Punkt 3.7.1 hergestellten Plastikperlen mit Bakterien wurden auf Blutagar ausgestrichen und die Platten bei 36°C für 18-24 h inkubiert. Die Blutagar-Platten wurden im Anschluss bei 4°C für maximal eine Woche gelagert. Flüssigkulturen wurden mit einer kleinen Kolonie oder einem Teil einer großen Kolonie angeimpft. Verwendet wurden CASO-Bouillon für *Listeria*, *Staphylococcus* und *Escherichia coli* sowie gepuffertes Peptonwasser (BPW) für *Cronobacter* und *Salmonella*. Die Flüssigkulturen wurden bei 36°C für 18-24 h im Brutschrank inkubiert. Für Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase wurden 10 ml bzw. 30 ml Medium mit 0,01% einer flüssigen Bakterienkultur angeimpft und bei 36°C für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Für *Staphylococcus aureus* betrug die Dauer der Inkubation 4 Stunden 45 Minuten und für *Staphylococcus epidermidis* 5 Stunden 30 Minuten.

### 3.7.3 Keimzahlbestimmung

Selektivagar- und Nicht-Selektivagarplatten wurden vor der Verwendung unter einer Produktschutzbank bei konstantem Luftstrom für 30-40 Minuten getrocknet. Für die Keimzahlbestimmung wurden jeweils 1 g Laktose oder Milchpulver bzw. 1 ml einer flüssigen Kultur in 9 ml Maximale Wiederbelebungslösung (MRD) gegeben. Es wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe, bis zur Verdünnung  $10^{-8}$ , in MRD angesetzt. Geeignete Verdünnungsstufen wurden á 50 µl auf das jeweilige Selektiv- bzw. Nicht-Selektivmedium aufgetropft. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 4 – 8 x 50 µl einer Verdünnungsstufe für die Keimzahlbestimmung aufgetropft. Die Agarplatten wurden bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis die aufgetropfte Flüssigkeit in den Agar eingezogen war. Danach wurden die Agarplatten nach den Angaben des Herstellers inkubiert. Als Nicht-Selektivagar wurden CASO-Agar und Blutagar verwendet. Als Selektivagar wurden unterschiedliche Agars aus ISO-Normen für das jeweilige Bakterium ausgewählt. Dabei handelte es sich um XLD-Agar für *Salmonella*, CT-SMAC Agar für *Escherichia coli* O157:H7, PALCAM-Agar für *Listeria*, *Enterobacter sakazakii* Selektivagar für *Cronobacter* und Baird Parker-Agar sowie Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar für *Staphylococcus*. Für *Staphylococcus epidermidis* wurde neben Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar ebenfalls Baird Parker-Agar zur Bestimmung der Keimzahl verwendet. Laut Anleitung des Herstellers Merck KGaA wird Baird Parker-Agar nicht für dieses Bakterium empfohlen. Es konnte nach 72 h bei 36°C Wachstum auf Baird Parker-Agar ausgemacht werden, weshalb der Agar trotzdem als zusätzliches Nährmedium für die Keimzahlbestimmung verwendet wurde.

### 3.7.4 Untersuchung zur homogenen Durchmischung von Laktose-Proben

Um die homogene Durchmischung von Laktose-Proben zu überprüfen, wurden zwei Laktose-Proben untersucht. Hierfür wurden sechsmal 1 g Laktose-Proben entnommen, in 9 ml MRD gelöst und die Keimzahl nach Punkt 3.7.3 bestimmt. Alle sechs Proben stammten aus demselben Trocknungsansatz. Untersucht wurde je eine Probe des Stammes *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC® 14028, welche bei Raumtemperatur bzw. bei 4°C auf Kieselgel gelagert wurde. Um den Einfluss unterschiedlicher Chargen von Medien auszuschließen, wurden für diesen Versuch für alle Proben dieselben Medien verwendet. Selbst hergestellte Medien stammten aus einem Ansatz. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind im Anhang zu finden (Kapitel 7.2).

### **3.8 Protokolle zur Schädigung von Bakterien durch Trocknung und Hitze**

In der vorliegenden Arbeit sollten Protokolle entwickelt werden, zur subletalen Schädigung von Mikroorganismen. Im Folgenden wird das Vorgehen zur Schädigung von Bakterien mittels Trocknung in Laktose-Monohydrat und Milchpulver sowie durch Hitze beschrieben. Im Anschluss an die Schädigung wurden Untersuchungen zur Langzeitlagerung der geschädigten Bakterien durchgeführt.

#### **3.8.1 Trocknung in Laktose-Monohydrat (nach Lindhardt 2014)**

Die Versuche zur Trocknung von Bakterien in Laktose basieren auf Untersuchungen, welche von Charlotte Lindhardt für die Firma Merck KGaA durchgeführt wurden (Lindhardt 2014). Für die Trocknung der Bakterien in Laktose wurden 40 g Laktose-Monohydrat in einen Stomacher-Beutel eingewogen und 2 ml einer Bakterienkultur hinzugegeben. Die Bakterien wurden mit dem Stomacher sowie durch Kneten mit der Hand mit der Laktose vermischt und anschließend in einen Plastikbecher mit Schraubdeckel umgefüllt. Zur Trocknung wurden die Plastikbecher mit offenem Deckel in einen Brutschrank bei 41°C für 24 h gestellt. Nach der Trocknung wurden die Plastikbecher herausgenommen und die Laktose in einen Stomacher-Beutel umgefüllt. Mit einem Stomacher wurden die Beutel für etwa 60 Sekunden geknetet, um die Laktose nochmals zu durchmischen und eventuelle Klumpen zu entfernen. Noch vorhandene Klumpen wurden mit der Hand zerdrückt. Zur Lagerung wurde die Laktose wieder zurück in den Plastikbecher gegeben.

#### **3.8.2 Lagerung der in Laktose-Monohydrat getrockneten Bakterien**

Die Proben wurden mit Kieselgel in einem Exsikkator oder einem Anaerobentopf bei Raumtemperatur gelagert. Für die Lagerung bei 4°C wurde die Hälfte der Laktose-Trocknung in einen neuen Plastikbecher gegeben und in einem Anaerobentopf mit Kieselgel im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die andere Hälfte der Laktose-Kultur wurde zum direkten Vergleich bei Raumtemperatur, wie oben beschrieben, gelagert. Zur Lagerung bei -20°C wurde die Hälfte der Kultur abgenommen und á 1 g in 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen. Die 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden in einem Anaerobentopf mit Kieselgel im Gefrierschrank bei -20°C gelagert. Die andere Hälfte der Laktose-Kultur wurde zum direkten Vergleich bei Raumtemperatur, wie oben beschrieben, gelagert.

### **3.8.3 Trocknung in Milchpulver; verändert nach einer Methode von Margot et al. 2015**

Für die Trocknung in Milchpulver wurde Nestlé „Beba Pro Kindermilch ab dem 12. Monat“ verwendet. Es wurden Übernachtkulturen bzw. 4h-Kulturen des jeweiligen Stammes verwendet, wie in Punkt 3.7.2 beschrieben. Das Milchpulver wurde á 40 g in Stomacherbeutel abgewogen und 2 ml einer Bakterienkultur in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Die Kultur wurde bei 10000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Von den 40 g Milchpulver wurde etwas mit einem sterilen Spatel in das Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und das Zellpellet mit dem Milchpulver vermischt. Diese Mischung wurde zu dem restlichen Milchpulver hinzugegeben. Nach dem Einmischen wurden die Milchpulverproben mit dem Stomacher und Kneten mit der Hand durchmischt und in einen Plastikbecher umgefüllt. Dieser wurde mit offenem Deckel in einen Brutschrank gestellt und bei 41°C für 24 h getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Plastikbecher herausgenommen und das Milchpulver in einen Stomacher-Beutel umgefüllt. Mit einem Stomacher wurden die Beutel für etwa 60 Sekunden geknetet, um das Milchpulver nochmals zu durchmischen. Zur Lagerung wurde das Milchpulver wieder zurück in den Plastikbecher gegeben. Die Proben wurden mit Kieselgel in einem Exsikkator oder einem Anaerobentopf bei Raumtemperatur gelagert.

### **3.8.4 Schädigung von Bakterien durch Hitze**

Zur Durchführung des Hitzeschocks wurden entweder stationäre oder exponentielle Kulturen á 30 ml verwendet. Diese wurden entweder für 4 h oder 18-24 h im Brutschrank bei 36°C inkubiert. Ein Wasserbad wurde auf die jeweilige Temperatur vorgeheizt und 10 ml frische CASO-Bouillon oder BPW darin vorgewärmt. Die Bakterienkulturen wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen umgefüllt und bei 10000 rpm für 2 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 500 µl abgenommen und das Zellpellet darin gelöst. Die Bakterienkultur wurde im Folgenden in das vorgewärmte Medium gegeben und für die entsprechende Zeitdauer im Wasserbad inkubiert. Dann wurde die Kultur aus dem Wasserbad genommen und für 5 Minuten auf Eis gestellt, bevor eine Keimzahlbestimmung nach Punkt 3.7.2 durchgeführt wurde.

Einem Hitzeschock wurden die Bakterien *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* und *Cronobacter sakazakii* unterzogen. Für

*Salmonella* und *Cronobacter* wurde der Hitzeschock bei 55°C für 2 Minuten durchgeführt. Für *Listeria monocytogenes* bei 60°C für 5 Minuten und für *Escherichia coli* bei 55°C für 4 Minuten. Zur Eingrenzung der möglichen Zeitdauer und Temperatur für den Hitzeschock wurden Angaben in der Literatur verwendet, welche in Tabelle 10 aufgeführt sind. Die tatsächlich verwendeten Zeiten und Temperaturen wurden experimentell bestimmt. Zur experimentellen Bestimmung der Zeitdauer für den Hitzeschock wurden die Proben im vorgeheizten Wasserbad gelassen und in regelmäßigen Zeitabständen 1 ml Proben für die Keimzahlbestimmung entnommen. Auch verschiedene Temperaturen wurden getestet. In Bezug auf die Schädigungsrate, das Absterben der Zellen und die Zeitdauer des Versuchs wurden die oben genannten Konditionen als am geeignetsten eingestuft.

**Tabelle 10: Übersicht über Veröffentlichungen zum Thema Hitzeschock bei verschiedenen Bakterien.**

<b>Veröffentlichung</b>	<b>Bakterium</b>	<b>Hitzestress</b>
Jasson et al. 2007	<i>Escherichia coli</i>	55°C für 5 Minuten
	<i>Listeria monocytogenes</i>	60°C für 20 Minuten
Suo et al. 2012	<i>Salmonella</i> Typhimurium	55°C für maximal 10 Minuten
Bunning et al. 1990	<i>Salmonella</i> Typhimurium	35, 42, 48 und 52°C
	<i>Listeria monocytogenes</i>	
Sherry et al. 2004	<i>Salmonella</i> Serotypen	55, 57 und 59°C 5-30 Minuten, 3-15 Minuten und 2-10 Minuten
Clark & Ordal 1969	<i>Salmonella</i> Typhimurium	48°C für 30 Minuten
Restaino et al. 2001	<i>Escherichia coli</i>	53°C für 45-50 Minuten
Kang 2012	<i>Escherichia coli</i>	54,8 – 61,2°C; 56,5 – 58°C Maximum von 7 Minuten
Osaili et al. 2005	<i>Escherichia coli</i>	55 – 70°C verschiedene Zeiten
	<i>Salmonella</i> Serotypen	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	
Ghassem et al. 2011	<i>Cronobacter sakazakii</i>	52, 54, 56, 58, 60°C 0-35, 0-35, 0-20, 0-12, 0-10 Minuten
Osaili et al. 2009	<i>Cronobacter sakazakii</i>	52°C, 54°C, 56°C or 58°C 0-135, 0-33, 0-12, 0-3,5 Minuten
Kim & Park 2007	<i>Cronobacter sakazakii</i>	52, 56, 60°C 0-20 Minuten

### 3.8.5 Einfrieren von Hitzeschock-Kulturen

Für das Einfrieren von Hitzeschock-Kulturen wurden Aliquots á 1,5 ml hergestellt. Es wurde eine Mischung aus Nährmedium (CASO-Bouillon oder BPW und 30% Glycerin hergestellt und autoklaviert. Jeweils 750 µl der Hitzeschock-Kultur wurden mit 750 µl

Nährmedium mit Glycerin vermischt. Von diesen Proben wurde ebenfalls eine Keimzahlbestimmung durchgeführt. Die Proben wurden bei -80° C eingefroren.

### **3.8.6 Durchführung der Oberflächentrocknung für die RT-Real-Time PCR**

Es wurden Übernachtskultur und exponentielle Kulturen des Stammes *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC® 14028 in gepuffertem laut Punkt 3.7.2 in BPW angesetzt. Die kompletten Kulturen wurden in je ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 7 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Jedes Pellet wurde in einem anderen Medium gelöst. Verwendet wurden je 200 µl steriles Wasser für die Molekularbiologie und 200 µl 100 mM Trehalose. Von diesen 200 µl wurden je 10 µl auf sterile Deckgläser gegeben, welche in eine sterile Petrischale gelegt wurden. Diese Deckgläser wurden dann offen für 30 bzw. 60 Minuten unter einer Sicherheitswerkbank getrocknet. Nach der Trocknung wurde die Keimzahl bestimmt, indem ein Deckglas in 9 ml MRD gegeben und gevortext wurde. Es wurden 1:10 Verdünnungen in MRD angesetzt und geeignete Verdünnungsstufen wie in Punkt 3.7.3 beschrieben auf CASO- und XLD-Agar ausgetropft. Gleichzeitig wurden 10 µl der ursprünglich angesetzten, nicht-getrockneten Kultur für eine Keimzahlbestimmung verwendet.

## **3.9 Molekularbiologische Untersuchungen**

Um die Auswirkungen des Stresses auf die bakterielle Zelle zu untersuchen wurden verschiedene molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu gehören die Untersuchungen zur Veränderung des gesamten Proteoms durch zweidimensionale Gelelektrophorese sowie TMT-Labeling und Massenspektrometrie. Des Weiteren wurden Versuche unternommen Veränderungen im mRNA Profil gestresster Bakterien durch Reverse Transkription und Analyse mittels Real-Time PCR zu ermitteln.

### **3.9.1 Proteinextraktion**

In der Literatur vielfältig beschrieben werden Methoden zur Extraktion von Proteinen aus Bakterien- bzw. Säugerzellen (siehe Tabelle 11). Zur Extraktion von Proteinen wurden die in der unten stehenden Tabelle aufgeführten Methoden gefunden. Es wurde nach einer Methode gesucht, die mit den im Labor vorhandenen Ressourcen durchführbar war. Von den aufgeführten Methoden wurden drei Methoden ausgewählt. Zu diesen Methoden zählte die Extraktion mittels Ultraschallaufschluss der Zellen

(Abrams et al. 2009), die Verwendung von Glasperlen (Velapatiño et al. 2013) und eine direkte Extraktion im Rehydration-Sample Puffer von BioRad (Stasyk et al. 2001).

**Tabelle 11: Übersicht über Extraktionsmethoden zur Extraktion von Proteinen aus Bakterien- und Säugerzellen.**

Veröffentlichung	Verwendetes Probenmaterial	Durchgeführte Methoden
Abrams et al. 2009	Bakterien aus Abwässern	1) French press 2) Ultraschall
Velapatiño et al. 2013	<i>Burkholderia</i> Spezies	1) Glaskugeln
Stasyk et al. 2001	Brustkarzinom Zellen	1) Direkte Extraktion in Harnstoff-Puffer (Harnstoff, CHAPS, DTT) 2) Extraktion in Lyse-Puffer gefolgt von einer Acetonfällung 3) Extraktion in Lyse-Puffer und Aufreinigung durch ein 2-D Clean-Up Kit 4) Dialyse der gesamten Zellen in SB02 Puffer mittels PlusOne Mini Dialysis Kit
Malafaia et al. 2015	<i>Acidovorax</i> , <i>Pectobacterium</i> , <i>Ralstonia</i>	1) Verwendung von Trizol Reagenz 2) Verwendung von Phenol 3) Verwendung eines Lyse-Puffers (enthält Harnstoff, Thioharnstoff und CHAPS) 4) Extraktion mittels Hitze, Kälte und Assay-Puffer
De May et al. 2007	<i>Escherichia coli</i> MG1655	1) Ultraschall 2) BugBuster® Protein Extraktions-Reagenz 3) Zelllyse mittels EasyLyse™-Kit 4) Zelllyse mittels SDS/Chloroform Behandlung 5) Kochen in KOH 6) Toluol Behandlung
Silva et al. 2004	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	1) Lysozym-Behandlung und Glaskugeln

Mehmeti et al. 2011	<i>Enterococcus faecalis</i> V583, <i>Lactococcus lactis</i> NIZO0900, <i>Pediococcus pentosaceus</i> OZF	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Ultraschall-Methode</li> <li>2) Extraktion mittels Hitze, Kälte und Assay-Puffer</li> <li>3) FastPrep beat-beater Protokoll: alkalische Zellyse mit Glaskugeln</li> </ol>
Bhaduri et al. 1983	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Aceton-SDS-Extraktion</li> <li>2) Ultraschall</li> <li>3) Glaskugeln</li> </ol>
Shrestha et al. 2012	<i>Escherichia coli</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Ultraschall</li> <li>2) Glaskugeln</li> <li>3) Freeze-thaw cycling</li> <li>4) Lysozym</li> </ol>
Benov et al. 2002	<i>Escherichia coli</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Ultraschall</li> <li>2) French press</li> <li>3) Freeze-thaw cycling</li> <li>4) Glaskugeln</li> </ol>

### 3.9.1.1 Vergleich der Methoden nach Abrams et al. 2009, Velapatiño et al. 2013 und Stasyk et al. 2001

Verwendet wurde eine flüssige Reinkultur á 10 ml des Stammes *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC® 14028 welche bei 36°C für 18 - 22 Stunden im Brutschrank angezogen wurde. Jede Methode wurde in einer zweifachen Bestimmung angesetzt.

### 3.9.1.2 Ultraschall-Zellaufschluss nach Abrams et al. 2009

Die Vorkultur wurde bei 5000 rpm für 15 Minuten bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Ein Ultraschall-Extraktionspuffer und Waschpuffer wurde nach den unten aufgeführten Angaben angesetzt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Waschpuffer gelöst, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und abermals bei 5000 rpm für 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Waschschrift nochmals mit 500 µl Waschpuffer wiederholt. Im Anschluss wurde das Pellet in 500 µl Ultraschall-Extraktionspuffer aufgenommen. Die Probe wurde im Folgenden je 30 Sekunden in der Sonotrode bei 2 Volt behandelt und im Anschluss für eine Minute auf Eis gekühlt. Diese Prozedur wurde sechsmal wiederholt bevor die Probe bei 10000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt wurde.

Während der Untersuchungen zeigte sich eine Trübung des Puffers nach Zugabe des Magnesiumchlorids. Da diese die Messung mittels NanoDrop negativ beeinflusste,

wurde die Komponente für die weiteren Versuche aus der Pufferzusammensetzung entfernt.

#### Waschpuffer nach Abrams et al. 2009

10 mM Tris

0,1 mM EDTA

5 mM MgCl<sub>2</sub>

gelöst in MilliQ®-Wasser

#### Extraktionspuffer nach Abrams et al. 2009

10 mM Tris

0,1 mM EDTA

5 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM PMSF in Isopropanol

0,01% SDS

gelöst in MilliQ®-Wasser

#### **3.9.1.3 Proteinextraktion mittels Rehydration Sample Buffer nach Stasyk et al 2001**

Die Vorkultur wurde bei 5000 rpm für 15 Minuten bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 500 µl 2D-Rehydration Sample Buffer von BioRad mit 1 mM PMSF gelöst und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es folgte eine Zentrifugation bei 10000 rpm für 5 Minuten. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

#### ReadyPrep™ 2D-Rehydration Sample Buffer von BioRad

7 M Harnstoff

2 M Thioharnstoff

1% ASB-14

40 mM Tris

0,001% Bromphenolblau

#### **3.9.1.4 Proteinextraktion mit Glasperlen nach Velapatiño et al. 2013**

Die Vorkultur wurde bei 5000 rpm für 15 Minuten bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 1 ml des unten aufgeführten Waschpuffers gelöst, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und abermals bei 5000 rpm für 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der

Waschschritt nochmals wiederholt. Das Zellpellet wurde in 500 µl Waschpuffer gelöst. Es wurden etwa 0,5 ml zuvor autoklavierte Glasperlen zur Probe zugegeben. Die Probe wurde für 30 Sekunden mit einem Disrupter behandelt und danach 1 Minute auf Eis gestellt. Dieses Verfahren wurde fünfmal wiederholt. Es folgte eine Zentrifugation bei 10000 rpm für 5 Minuten. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Waschpuffer nach Velapatiño et al. 2013

1x PBS-Puffer

5 mM EDTA

1 mM PMSF

gelöst in MilliQ®-Wasser

**3.9.1.5 Proteinbestimmung mit dem Nanodrop 2000/2000c**

Im Anschluss an die Extraktion wurden alle Proteinproben mit dem Nanodrop 2000/2000c bei einer Absorption von 280 nm gemessen und die Werte miteinander verglichen. Zur Bewertung der Effektivität der Methode wurde die Menge an gewonnenen Proteinen herangezogen. Die Extraktion mittels Ultraschall zeigte dabei mit 6,5 und 6,7 mg/ml Protein die höchsten Werte. Diese lagen etwa drei- bis viermal höher als die Werte der beiden anderen Methoden. Aufgrund dessen wurde die Extraktion mittels Ultraschall für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

**Tabelle 12: Proteinbestimmung mittels Nanodrop 2000/2000c. Die Konzentration der Proteine wurde bei 280 nm bestimmt.**

<b>Probename</b>	<b>Konzentration mg/ml</b>
Glasperlen Methode 1	1,58
Glasperlen Methode 2	2,02
Ultraschall Methode 1	6,50
Ultraschall Methode 2	6,72
Sample Buffer Methode 1	2,02
Sample Buffer Methode 2	1,44

### **3.9.1.6 Proteinextraktion aus Reinkulturen, Hitzeschock-Kulturen und eingefrorenen Hitzeschock-Kulturen**

Reinkulturen wurden á 10 ml in CASO-Bouillon oder gepuffertes Peptonwasser für 4 h bzw. 24 h angezogen und für eine Proteinextraktion verwendet. Es wurde ebenfalls die verbleibende Hitzeschock-Kultur sowie die eingefrorene Hitzeschock-Kultur für die Protein-Extraktion verwendet. Die Zellen wurden bei 10.000 rpm für 2 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden in 9 ml Waschpuffer gelöst und bei 10.000 rpm für 2 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden in 1 ml Waschpuffer gelöst, die Kultur in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, nochmals abzentrifugiert und der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde je nach Größe in 30 - 150 µl Extraktionspuffer gelöst und im Folgenden sechsmal für 30 Sekunden bei 2 Volt im Ultraschallgerät behandelt. Zwischen jeder Behandlung wurde die Probe gevortext und für 1,5 Minuten auf Eis gestellt um ein Überhitzen der Proben zu verhindern. Nach der Behandlung in der Sonotrode wurde die Probe bei 10.000 rpm für 2 Minuten abzentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Proben bei -80 °C eingefroren.

#### Waschpuffer abgewandelt nach Abrams et al. 2009

10 mM Tris

0,1 mM EDTA

gelöst in MilliQ®-Wasser

#### Extraktionspuffer abgewandelt nach Abrams et al.2009

10 mM Tris

0,1 mM EDTA

1 mM PMSF in Isopropanol

0,01% SDS

gelöst in MilliQ®-Wasser

### **3.9.1.7 Proteinextraktion aus Laktose-Proben**

Für die Proteinextraktion aus Laktose wurden konzentriertere Laktose-Proben angesetzt, um die nötige Menge an Protein zu erhalten. Es wurden 10 ml-Vorkulturen (4 h) angesetzt, wie in Punkt 3.8.1 beschrieben. Diese Kulturen wurden bei 10000 rpm für 2 Minuten abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 2 ml

frischem Nährmedium aufgenommen. In Stomacherbeutel wurden 40 g Laktose-Monohydrat eingewogen und die 2 ml Bakterienkulturen eingemischt. Die beimpfte Laktose wurde anschließend in eine Plastikdose gegeben und bei 41°C im Brutschrank für 24 h getrocknet. Nach 24 h wurden die Proben wieder in einen Stomacherbeutel gefüllt und die Laktose mit einem Stomacher durchmischt. Klumpen wurden nochmals per Hand zerdrückt. Die Laktose wurde wieder in den Plastikbecher umgefüllt und jeweils 32 g Laktose in eine sterile Glasflasche und 1 g der Lactose in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen abgewogen. Zu dem 1 g Laktose wurden 9 ml MRD gemischt und eine Keimzahlbestimmung wie in Punkt 3.7.3 beschrieben durchgeführt. Die 32 g Lactose wurden für eine Proteinextraktion verwendet.

Zu den 32 g Lactose wurden etwa 350 ml MRD gegeben und die Probe gut gemischt um die Laktose zu lösen. Die Probe wurde á 45 ml in 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und es folgte eine Zentrifugation bei 10000 rpm für 2 Minuten. Der Überstand wurde bis auf etwa 5 ml abgenommen und verworfen und das Pellet aller Proben gepoolt. Die Proben wurden nochmals abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 1 ml Waschpuffer nach Punkt 3.9.1.6 gelöst. Die Proben wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, die Probe nochmals abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt. Jedes Pellet wurde je nach Größe in 20 µl – 150 µl Extraktionspuffer gelöst. Es folgte eine Behandlung im Ultraschallgerät bei 2 Volt für je 30 Sekunden. Die Behandlung wurde insgesamt sechsmal durchgeführt. Dazwischen wurden die Proben für 1 - 1,5 Minuten auf Eis gekühlt.

#### **3.9.1.8 Proteinextraktion aus Milchpulverproben**

Für die Extraktion von Proteinen aus Milchpulver wurden konzentrierte Milchpulverproben angesetzt. Hierfür wurde eine 10 ml Übernachtkultur des jeweiligen Stammes in gepuffertem Peptonwasser bzw. CASO-Bouillon angesetzt. Von diesen Kulturen wurde eine Keimzahlbestimmung, wie in Punkt 3.7.3 beschrieben, durchgeführt. Die restliche Bakterienkultur wurde wie in Punkt 3.8.3 mit 10 g Milchpulver vermischt. Die Milchpulverprobe wurde in einen Stomacherbeutel gegeben und mit einem Stomacher sowie durch Kneten mit den Händen durchmischt. Im Anschluss wurde das angeimpfte Milchpulver in einen Plastikbecher gegeben und mit offenem Deckel bei 42°C für etwa 24 h getrocknet. Nach einer erneuten Durchmischung des Milchpulvers wurde eine Keimzahlbestimmung wie in Punkt 3.7.3

beschrieben durchgeführt. Für die Proteinextraktion wurden 4 g Milchpulver mit 36 ml MRD vermischt und bei 12000 rpm für 3 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Dabei konnte festgestellt werden, dass ein Produkt aus dem Milchpulver ausgefallen war und weiße Ablagerungen an der Wand des Gefäßes gebildet hatte, welche das Zellpellet überdeckten. Im Folgenden wurden Waschschriffe mit Waschpuffer durchgeführt (siehe Punkt 3.9.1.6). Zu dem Pellet wurden 15 ml Waschpuffer gegeben und die Probe bei 12000 rpm für 3 Minuten abzentrifugiert. Die zuvor beobachteten Ablagerungen, bei denen es sich wahrscheinlich um Casein handelte, konnten durch das Waschen mit Puffer nicht entfernt werden, sodass keine Aufreinigung der Bakterienzellen und keine Extraktion der Proteine möglich war.

#### **3.9.1.9 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Protein Assay**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit von Life technologies verwendet, welches mit Bicinchoninsäure und einem BSA-Standard arbeitet. Alle Proben wurden mit dem Nanodrop 2000/2000c bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Für die Messung der Proteinkonzentration wird laut Protokoll des Herstellers eine Menge von 100 µl Protein bzw. 25 µl Protein benötigt. Da diese Menge an Protein nicht vorhanden war, wurde das Protokoll des Protein Assay Kits verändert (siehe Tabelle 13). Die Standardreihe wurde nach den unten stehenden Angaben angesetzt. Für die Detektion wurde ein Working Reagent (WR) kurz vor dessen Verwendung angesetzt. Hierfür mussten 50 Teile BCA Reagenz A und 1 Teil BCA Reagenz B miteinander vermischt werden. Die dabei entstandene Mischung war klar und grünlich gefärbt. Im ursprünglichen Protokoll werden 0,1 ml Probe bzw. Standard mit 2 ml WR vermischt. Dies entspricht laut Handbuch des Herstellers einer 1:20 Verdünnung. Zur Reduktion des Volumens wurden 2 µl Probe bzw. Standard mit 40 µl WR vermischt. Da einige Proben nicht so viel Protein enthalten und bei einer Verdünnung von 1:20 kein Protein mehr detektiert werden konnte, wurde zusätzlich eine 1:2 verdünnte Standardreihe angesetzt. Hierfür wurden 2 µl Probe bzw. Standard mit 2 µl WR vermischt. Die Proben wurden im Folgenden für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert und danach bei Raumtemperatur kurz abgekühlt und dann direkt gemessen. Zunächst wurden je zwei Standardreihen angesetzt, einmal anhand des Herstellerprotokolls und einmal mit der Reduktion des Volumens. Die Messungen der Standardreihen wurden mit dem Nanodrop durchgeführt. Für die

Messung verwendet wurde eine Küvette bzw. der Messarm. Für die Messung mit der Küvette wurde ein Volumen von 1 ml eingesetzt, für die Messung mit dem Messarm ein Volumen von 2 µl. Gemessen wurde bei 562 nm. Im Folgenden wurden verschiedene Proben der Standardreihen gemessen, um die Genauigkeit der Messung zu überprüfen. Dabei konnte festgestellt werden, dass bei reduziertem Volumen die Genauigkeit der Standardreihe im Messbereich unter 0,25 mg/ml absinkt. Gemessene Werte in diesem Bereich sind ungenau und wurden nicht zur Bestimmung der Proteinkonzentration herangezogen. Die in dieser Arbeit gemessenen Werte für die Proteinkonzentration lagen bis auf wenige Ausnahmen über 0,5 mg/ml.

**Tabelle 13: Verwendete Standardreihe für die Proteinbestimmung mittels BCA-Assay**

	<b>Konzentration BSA</b>	<b>Standardreihe Original</b>
<b>A</b>	2 mg/ml (Original)	300 µl BSA + 0 µl Verdünnungsmedium
<b>B</b>	1,5 mg/ml	375 µl BSA + 125 µl Verdünnungsmedium
<b>C</b>	1 mg/ml	325 µl BSA + 325 µl Verdünnungsmedium
<b>D</b>	0,75 mg/ml	175 µl B + 175 µl Verdünnungsmedium
<b>E</b>	0,5 mg/ml	325 µl C + 325 µl Verdünnungsmedium
<b>F</b>	0,25 mg/ml	325 µl E + 325 µl Verdünnungsmedium
<b>G</b>	0,125 mg/ml	325 µl F + 325 µl Verdünnungsmedium

### 3.9.1.10 Aufreinigung von Proteinproben mittels 2D-Cleanup Kit

Vor dem Einsatz in der Isoelektrischen Fokussierung wurden die Proteinproben mit dem ReadyPrep™ 2D-Cleanup Kit von BioRad aufgereinigt. Die Menge an verwendetem Protein richtete sich nach den jeweils verwendeten IPG-Streifen, durfte aber eine Menge von 500 µg nicht überschreiten (siehe Tabelle 14). Die Proteinproben wurden auf Eis aufgetaut und die entsprechende Menge in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit ultrareinem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt. Zu der Proteinprobe wurden 30 µl Precipitation Agent 1 hinzugegeben, die Probe durch vortexen gemischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden 300 µl Precipitation Agent 2 hinzugegeben, die Probe durch vortexen

gemischt, bei 12000 x g für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Probe wurde ein weiteres Mal für 30 Sekunden bei 12000 x g abzentrifugiert und der Restüberstand abgenommen und verworfen. Im nächsten Schritt wurden 40 µl Wash Reagent 1 auf das Pellet gegeben. Die Lösung wurde mehrmals aufgenommen und über das Pellet pipettiert um sicherzustellen, dass das Pellet gut gewaschen wurde. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 12000 x g für 5 Minuten wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Für den zweiten Waschschrift wurde das Pellet zunächst in 25 µl ultrareinem Wasser aufgenommen und das Pellet für 20 Sekunden gevortext. Zu dem Pellet wurde 1 ml bei -20°C vorgekühlte Waschlösung 2 und 5 µl Waschzusatz 2 hinzugeben und die Probe für 1 Minute gevortext. Die Probe wurde für insgesamt 30 Minuten bei -20°C inkubiert, wobei die Probe alle 10 Minuten für 30 Sekunden gevortext wurde. Nach der Inkubationszeit wurde die Probe bei 12000 x g für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und der Zentrifugationsschritt nochmals für 30 Sekunden wiederholt um die restliche Flüssigkeit zu entfernen. Das Pellet wurde mit offenem Deckel für maximal 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend in der entsprechenden Menge an 2D-Rehydrationspuffer gelöst und bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren. Die verwendete Menge an Puffer zur Rehydration der Streifen ist in Tabelle 14 aufgeführt.

ReadyPrep™ 2D-Starter Kit Rehydration Sample Buffer von BioRad

8 M Harnstoff

2% CHAPS

50 mM DTT

0,2% Bio-Lyte® 2/10 Ampholyte

0,001% Bromphenolblau

**Tabelle 14: Verwendetes Puffervolumen und Proteinmenge zur Rehydration der IPG-Streifen**

<b>Streifenlänge</b>	<b>Rehydrationsvolumen</b>	<b>Proteinmenge</b>
7 cm	125 µl	50 – 100 µg
17 cm	300 µl	200 – 400 µg

**3.9.2 Durchführung der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-SDS Page)**

Die zweidimensionale Gelelektrophorese dient der Auftrennung der Proteingemische. Dabei werden die Proteine zunächst durch eine isoelektrische Fokussierung anhand

eines pH-Gradienten nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. In der zweiten Dimension erfolgt eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse (O'Farrell 1975). Für die isoelektrische Fokussierung wurden fertige Gelstreifen von BioRad verwendet. Die Fokussierung erfolgte im Gerät IEF Cell von BioRad und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die zweite Dimension wurden selbst hergestellte Acrylamid-Gele in der Größe 20x20 cm verwendet. Die Auftrennung wurde in der Elektrophoresekammer kuroGel Verti 2020 von VWR durchgeführt.

### 3.9.2.1 Ansetzen von Äquilibrations-Puffern für die SDS-Page

2-D-Rehydration Buffer, Equilibration Buffer I und Equilibration Buffer II wurden vor Beginn der Versuche angesetzt und aliquotiert eingefroren. Für Equilibration Buffer I und Equilibration Buffer II wurde, laut Angaben des Herstellers, die entsprechende Menge an autoklavierter 30%iger Glycerin-Lösung in die Puffergefäße gegeben und der Puffer solange gerührt, bis sich die Pufferbestandteile komplett gelöst hatten und der Puffer klar wurde. Der Puffer wurde dann á 1 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Equilibration Buffer II wurde vor dem aliquotieren nicht mit Iodacetamid versetzt, sondern erst kurz vor der eigentlichen Verwendung. Der 2-D-Rehydration Buffer wurde in der vom Hersteller angegebenen Menge ultrareinem Wasser gelöst, á 250 µl in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

### 3.9.2.2 Isoelektrische Fokussierung

Für die Isoelektrische Fokussierung wurden fertige IPG-Gelstreifen mit den pH-Gradienten pH 3-10 bzw. pH 4-7 von BioRad verwendet. Verwendet wurden 7 cm Streifen und 17 cm Streifen. Die Gelstreifen wurden nach Angabe des Herstellers bei -20°C gelagert und vor Benutzung 10 Minuten bei Raumtemperatur auf die Laborbank gelegt. Die in Rehydrationspuffer gelöste Proteinprobe wurde ebenfalls bei Raumtemperatur aufgetaut. Die gesamte Proteinprobe wurde in eine Spur der Rehydrierungsschale pipettiert. Dabei wurde mit der Proteinprobe eine gerade Linie innerhalb der Spur gezogen. Die Plastikabdeckung des IPG-Streifens wurde entfernt und der Streifen mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei in die Proteinprobe gelegt. Der Streifen wurde mit Mineralöl bedeckt, um ein Austrocknen des Streifens zu verhindern. Die Schale wurde mit einem Deckel abgedeckt und bei Raumtemperatur für 12 - 16 Stunden zur Rehydration des Streifens stehen gelassen. Nach der Rehydration wurde der Streifen auf ein Filterpapier gelegt, um das Mineralöl zu

entfernen. In die Fokussierungsschale wurde auf jeden Elektrodendraht ein Elektrodenpapier gelegt und dieses mit 8 µl MilliQ®-Wasser befeuchtet. Der IPG-Streifen wurde mit der Gelseite nach unten auf die Elektrodenpapiere in die Fokussierungsschale gelegt und mit Mineralöl überschichtet. Die Fokussierungsschale wurde in das BioRad Gerät IEF Cell eingelegt und die unten stehenden Programme je nach Länge des Streifens gestartet (siehe Tabelle 15 und 16). Nach Beendigung des Laufs wurde die Fokussierungsschale aus dem Gerät genommen und der Streifen auf ein Filterpapier gelegt, um das Mineralöl zu entfernen. Der Streifen wurde dann mit der Gelseite nach oben in eine Rehydrierungsschale überführt und entweder direkt für die SDS-Page verwendet oder abgedeckt bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### 7 cm IPG-Streifen

**Tabelle 15: Programm zur Durchführung der Isoelektrische Fokussierung von 7 cm IPG-Streifen**

Schritt	Volt	Zeit
1	250	20 Minuten
2	4000	8000 - 10000 Volthours
3	500	unendlich

### 17 cm IPG-Streifen

**Tabelle 16: Programm zur Durchführung der Isoelektrische Fokussierung von 17 cm IPG-Streifen**

Schritt	Volt	Zeit
1	250	20 Minuten
2	10000	40000 - 60000 Volthours
3	500	unendlich

#### 3.9.2.3 Waschen von IPG-Streifen

Die IPG-Streifen wurden aus der Gefriertruhe genommen oder direkt nach Beendigung der Isoelektrischen Fokussierung verwendet. Eingefrorene Gele wurden bei Raumtemperatur mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Es wurde die jeweilige Menge Equilibration Buffer I und II bei Raumtemperatur aufgetaut. Für 7 cm IPG-Streifen wurde je 1 ml des Puffers verwendet, für 17 cm Streifen wurde je 2 ml Puffer verwendet. Es wurden 25 mg Iodacetamid pro Milliliter Equilibration Buffer II in

ein 50 ml Zentrifugenröhrchen bzw. ein Eppendorf-Reaktionsgefäß abgewogen. Nach Auftauen des IPG-Streifens sowie der Puffer wurde die entsprechende Menge Equilibration Buffer I auf den Streifen gegeben und das Rehydrierungsgefäß für 10 Minuten auf eine Wippe gestellt. Equilibration Buffer II wurde kurz vor Verwendung mit der entsprechenden Menge Iodacetamid vermischt. Der Equilibration Buffer I wurde abgossen und der IPG-Streifen mit der entsprechenden Menge Equilibration Buffer II mit Iodacetamid bedeckt und das Rehydrierungsgefäß für 10 Minuten auf eine Wippe gestellt. Der Puffer wurde nach der Inkubationszeit abgossen.

#### **3.9.2.4 Herstellung von Gelen (20x20 cm) für die zweite Dimension der SDS-Page**

Es wurden 20x20 cm SDS-Gele gegossen, welche immer einen Tag vor der Verwendung hergestellt wurden. Verwendet wurden Gele mit einem 12%igen Trenngel und einem 5%igen Sammelgel. Eine Glasplatte und eine Ohrenplatte wurden durch zwei 1 mm dicke Spacer getrennt und in die Gießvorrichtung eingespannt. Um das Auslaufen des Gels zu vermeiden, wurden die Innenseiten mit 0,5%iger Agarose in 1x Lämmli-Puffer abgedichtet. Für Trenngel und Sammelgel wurden Wasser, 1x Puffer und Acrylamid in einem Becherglas vermengt und erst kurz vor dem gießen Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) hinzugegeben. Die Trenngellösung wurde zwischen die Glasplatten bis 1,5 cm unter den Rand der Ohrenplatte gegossen, danach direkt mit Isopropanol überschichtet und auspolymerisieren gelassen. Das Isopropanol wurde mit einem Filterpapier wieder abgenommen, dann die Sammelgellösung bis zum Rand der Ohrenplatte auf das Trenngel gegossen und auspolymerisieren gelassen. Danach wurde das Gel aus der Halterung genommen, in eine Plastiktüte mit feuchten Tüchern gegeben und bis zur Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

##### Trenngel und Sammelgel

X ml 30% Acrylamid

X ml 4x Trenngel- bzw. Sammelgelpuffer

X ml MilliQ®-Wasser

10 µl 10% APS pro ml Gelmischung

1 µl TEMED pro ml Gelmischung

#### 4x Sammelgelpuffer

0,5 M Tris/Cl pH 6,8

0,4% SDS

#### 4x Trenngelpuffer

1,5 M Tris/Cl pH 8,8

0,4% SDS

#### 10x Lämmli-Puffer (Lämmli 1970)

0,25 M Tris/Cl

1,92 M Glycin

1% SDS

#### Overlay-Agarose

0,5% Agarose

1x Tris- SDS- Glycin Puffer (Sigma Aldrich)

0,003% Bromphenolblau-Natriumsalz

Aufgefüllt mit MilliQ®-Wasser auf 50 ml.

### **3.9.2.5 Durchführung der zweiten Dimension mit selbst hergestellten SDS-Gelen**

Das SDS-Gel wurde vor der Verwendung aus dem Kühlschrank genommen und bei Raumtemperatur akklimatisiert. Die IPG-Streifen wurden nach Punkt 3.9.2.3 gewaschen. 10x Tris-Glycin-SDS-Puffer von Sigma-Aldrich wurde mit MilliQ®-Wasser zu einem 1x Puffer verdünnt und der IPG-Streifen mehrere Male in diesem Puffer gewaschen. Die Plastikenden des IPG-Streifens wurden mit einer Schere abgeschnitten. Die Tasche des SDS-Gels wurde mit dem 1x Tris-Glycin-SDS-Puffer ausgespült, der IPG-Streifen mit der Gelseite nach oben auf das Glas des SDS-Gels gelegt und der Streifen an das SDS-Gel geschoben. Overlay-Agarose wurde in der Mikrowelle aufgekocht, bis diese komplett flüssig war und der IPG-Streifen mit der aufgekochten Overlay-Agarose überschichtet. Es musste darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen unter dem IPG-Streifen befunden haben. Vorhandene Luftblasen wurden vor dem Lauf entfernt. Nach dem Festwerden der Overlay-Agarose wurde das SDS-Gel in die Halterung der Elektrophorese-Kammer eingespannt und der

1x Tris-Glycin-SDS-Puffer in die innere und äußere Kammer gefüllt. Der Gellauf wurde nach dem unten stehenden Programm durchgeführt (siehe Tabelle 17). Der zweite Schritt wurde nach Einlaufen des Farbstoffes aus der Overlay-Agarose in das Trenngel gestartet.

10x Tris-Glycin-SDS-Puffer laut Sigma-Aldrich

0,25 M Tris/Cl

1,92 M Glycin

1% SDS

**Tabelle 17: Programm zur Durchführung der zweiten Dimension der Gelelektrophorese**

Schritt	Spannung	Dauer
Schritt 1	90 V	Etwa 2 h
Schritt 2	170 V	Etwa 4 h

Gesamtlaufzeit etwa 6 Stunden.

### 3.9.2.6 Gelfärbung mit Coomassie

Nach Beendigung des Laufs wurden die SDS-Gele aus den Halterungen gelöst, in eine Plastik- oder Metallschale gegeben und mit MilliQ®-Wasser für 5 Minuten auf der Wippe gewaschen. Das Wasser wurde abgegossen und im Folgenden eine Fixierlösung auf das Gel gegeben, mit welcher das Gel 20 Minuten auf der Wippe inkubiert wurde. Die Fixierlösung wurde abgegossen und das Gel für 5 Minuten in MilliQ®-Wasser gewaschen, bevor die Coomassie-Färbelösung auf das SDS-Gel gegeben wurde. Die Gele wurden über Nacht in der Färbelösung auf der Wippe gefärbt. Die Färbelösung wurde wieder zurück in das Aufbewahrungsgefäß gegeben und das SDS-Gel zweimal für 10 Minuten mit Wasser gewaschen. Das Wasser wurde abgegossen und das Gel im Anschluss mit Entfärbelösung überschichtet. Die Entfärbelösung wurde, wenn nötig, während des Entfärbens einmal ausgetauscht. Nach Beendigung des Entfärbeprozesses wurde die Entfärbelösung verworfen und das Gel nochmal in MilliQ®-Wasser aufgenommen. Die Gele wurden mit dem GS800-Calibrated Densitometer von BioRad eingescannt und für weitere Auswertungen verwendet. Nach dem Scannen des Gels wurde das Gel mit 1 M Essigsäure gut verschlossen in einer Plastiktüte bei 4°C gelagert.

### Fixierlösung

450 ml Methanol

100 ml Eisessig

Aufgefüllt mit MilliQ®-Wasser auf 1 l

### Coomassie Färbelösung

1 g Coomassie Brilliant Blue R250

400 ml Ethanol

100 ml Eisessig

Aufgefüllt mit MilliQ®-Wasser auf 1 l

### Entfärbelösung

100 ml Ethanol

75 ml Eisessig

Aufgefüllt mit MilliQ®-Wasser auf 1 l

### 3.9.3 Massenspektrometrie-Analyse

Für die Untersuchung des Proteoms von ungestressten und gestressten Bakterien wurde eine Analyse mittels Massenspektrometrie durchgeführt. Die Proteinproben wurden an ein internes Labor gegeben, welches anhand des Massenspektrometers Orbitrap eine Gesamtproteom-Analyse durchführte. Dabei sollte nicht nur eine Identifizierung durchgeführt werden, sondern auch eine Quantifizierung der einzelnen Proteine in den unterschiedlichen Proben. Durch eine Quantifizierung sollte festgestellt werden, inwieweit eine höhere oder niedrigere Expression einzelner Proteine unter Stressbedingungen vorgelegen hat. Als Vergleich diente dabei immer eine ungestresste Probe. Für die Quantifizierung wurde die Methode des Tandem Mass Tag-Labeling eingesetzt.

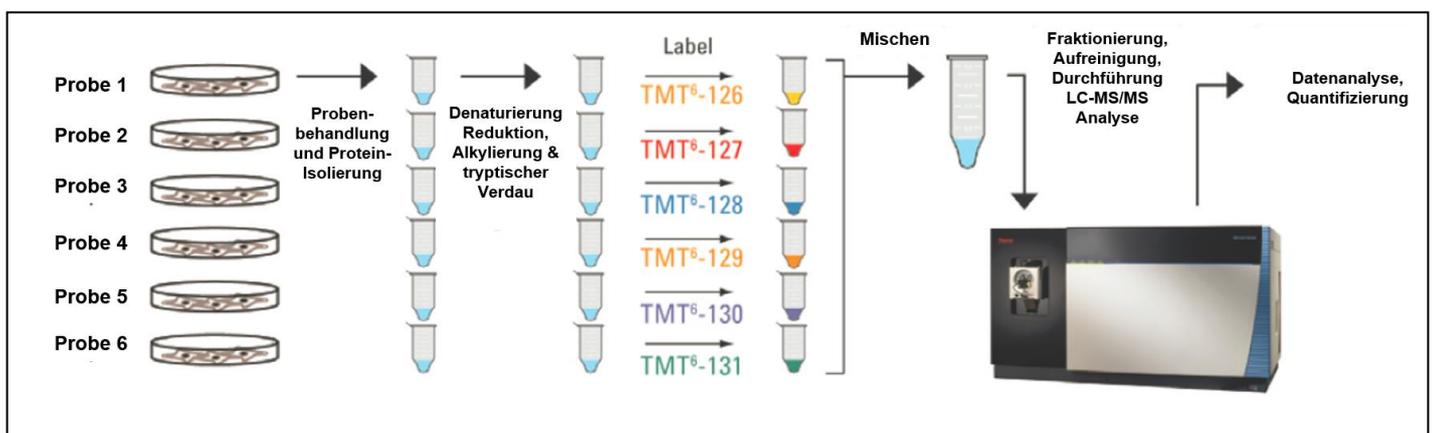
#### 3.9.3.1 Orbitrap Massenspektrometer

Bei Orbitrap Massenspektrometern handelt es sich um Ionenfallen, welche mit einem elektrostatischen Feld arbeiten. In diesem Feld werden die Ionen eingefangen. Durch die Zusammenwirkung der initialen Geschwindigkeit der Ionen, sowie der elektrostatischen Anziehung durch die zentrale Elektrode entsteht eine Zentrifugalkraft. Diese sorgt für eine komplexe, spiralförmige Bewegung der Ionen um die zentrale Elektrode herum. Diese unterschiedlichen Oszillationen von Ionen mit unterschiedlicher Masse können durch einen Fourier Transformator innerhalb des Orbitrap gemessen werden. Gemessen wird das Masse zu Ladungsverhältnis (Scigelova & Makarov 2006).

#### 3.9.3.2 Isobaric Labeling: Tandem Mass Tag (TMT)-Labeling

Eine sehr beliebte Methode zur Quantifizierung von Proteinen in verschiedenen Proben ist die Markierung von Proteinen mit Isotopen, wie z.B. das TMT-Labeling (Thompson et al. 2003). TMT-Labels sind isotopische Labels, welche dieselbe Struktur aufweisen, aber mit unterschiedlichen Isotopen von Kohlenstoff und Stickstoff kombiniert werden (Thermo Fisher Scientific 2016). Dabei weist jedes TMT-Label dieselbe nominale Masse auf sowie dieselbe chemische Struktur. Diese besteht aus einer reaktiven Amin NHS-Estergruppe, einem Spacer-Arm und dem Massenreporter. Die verwendeten Proteinproben werden reduziert, alkyliert und enzymatisch verdaut, bevor jede Probe mit einer anderen isotopen Variante des TMT Reagenz gekoppelt wird. Die verschiedenen Isotope weisen eine sehr geringe Massendifferenz von

maximal 6 mDa auf, welche durch die gute Auflösung des Orbitrap Massenspektrometers detektiert werden kann (Thermo Fisher Scientific 2016). Alle Proben werden gepoolt und simultan im Massenspektrometer analysiert (Thompson et al. 2003). Durch eine UPLC erfolgt vor der Analyse eine Auftrennung und Aufreinigung der Proben. Die Methode des TMT-Labelings erlaubt die Detektion identischer Peptide aus unterschiedlichen Proben durch das Koppeln mit unterschiedlichen TMT-Isotopen. Diese migrieren während der gesamten Prozedur simultan und können gleichzeitig detektiert werden (Thompson et al. 2003). Gemessen wird die relative Häufigkeit der jeweiligen Reporterionen. Der Ablauf der Untersuchung ist nochmals in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ablaufs einer Proteom-Analyse mittels Massenspektrometrie und TMT-Labeling (nach Thermo Scientific 2016).** Die Proteine werden zunächst aus den Bakterien isoliert und aufgereinigt. Es folgt eine Denaturierung, Reduktion, Alkylierung und ein tryptischer Verdau, bevor die verschiedenen Proben mit den isotopen Varianten des TMT-Reagenz gekoppelt werden. Alle markierten Proben werden in ein Gefäß zusammen gegeben und durch eine Chromatographie fraktioniert und aufgereinigt, bevor sie mittels Massenspektrometrie analysiert werden. Im Anschluss an die Analyse erfolgt die Datenauswertung.

### 3.9.3.3 Durchführung Massenspektrometrie-Analyse

Für die Massenspektrometrie-Analyse mittels TMT-Labeling wurden je 10 µl der Proteinproben an das Protein-Labor der Firma Merck KGaA gegeben. Jede Probe sollte in einer dreifachen Bestimmung analysiert werden. Jede dieser Dreifachbestimmungen wurde zum selben Zeitpunkt aufgereinigt, allerdings handelte es sich um separate Proben aus unterschiedlichen Gefäßen. Je drei ungestresste Proben und drei Trockenstress-Proben des Stammes *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC® 14028 wurden vergleichend untersucht. Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden nicht selbst durchgeführt. Die Analysen sowie die Vorbereitung der Proteinproben wurden vom zuständigen Labor durchgeführt. Die

Durchführung der Untersuchungen wurde nach Angaben des zuständigen Labors hier aufgelistet. Die an das Labor abgegebenen Proteine befanden sich im Extraktionspuffer nach Punkt 3.9.1.6 und wurden vor der weiteren Bearbeitung mit ultrareinem Wasser auf 1 mg/ml verdünnt und in 100 mM Triethylammoniumbicarbonat-Puffer umgepuffert. Es folgte eine Acetonfällung nach dem Protokoll von Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific 2009). Im Anschluss wurden die Proteine auf 2 µg/µl verdünnt. Die weiteren Schritte zum Verdau und Labeln der Proben mit TMT erfolgten nach der Anleitung von Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific 2016). Vor der massenspektrometrischen Analyse wurden die Proteine in einer Acquity UPLC M-Class von Waters aufgetrennt und aufgereinigt. Als Trennsäule wurde eine ACQUITY UPLC® M-Class HSS T3 von Waters verwendet. Diese wies einen Porendurchmesser von 1,8 µm auf und eine Länge von 250 mm. Es wurde ein 560 Minuten LC-Gradient mit einer mobilen Phase A (wässrig mit 0,1% Ameisensäure) und einer mobilen Phase B (0,1% Acetonitril) verwendet. Der Gradient endete bei 37% Acetonitril. Es wurden insgesamt 3 µg gelabelte Proteine auf die Säule gegeben. Für die Massenspektrometrie-Analyse wurde der Q-Exactive Orbitrap von Thermo Fisher eingesetzt. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit dem Proteome Discoverer 2.1 SP1 Version 2.1.1.21. Die für den Sequenzvergleich verwendete FASTA-Sequenz für das Bakterium *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC® 14028 wurde am 25.10.2017 von der Internetseite UniProt.org bezogen.

#### **3.9.4 Durchführung von RNA-Untersuchungen mittels Real-Time PCR**

Für die vorliegende Arbeit sollten Untersuchungen zur Charakterisierung des bakteriellen Stresses durchgeführt werden. Als Ansatz hierfür sollte die Untersuchung von transkribierten Stressgenen anhand vorliegender mRNA in der Bakterienzelle eingesetzt werden. Es wurde eine Extraktion der RNA aus den gestressten Bakterien durchgeführt, welche mittels Random Primern und Reverser Transkription in cDNA umgewandelt wurde. Durch eine Literaturrecherche wurden verschiedene Stressgene ausgewählt, welche an der Stressantwort von Bakterien in Bezug auf Trockenstress beteiligt sind. Anhand bekannter Gensequenzen dieser Gene wurden Primer ermittelt, welche dann für eine PCR-Amplifikation der jeweiligen cDNA verwendet wurden. Ziel war es einen Vergleich zwischen ungestressten und gestressten Bakterien zu erhalten

und Unterschiede im Expressionslevel der jeweiligen mRNA festzustellen. Hierfür war es nötig eine Normalisierung durchzuführen, um eventuelle Schwankungen der RNA Menge, Variabilität des Extraktionsprotokolls z.B. durch Inhibitoren, unterschiedliche Effizienz der Reversen Transkription oder PCR auszugleichen (Huggett et al. 2005). Die Normalisierung kann durch unterschiedliche Strategien erfolgen, wie z.B. den Einsatz von stabilen Referenzgenen (Huggett et al. 2005). Die Expression dieser Referenzgene sollte in verschiedenen Geweben oder unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen nicht variieren (Vandesompele et al. 2002). Zur Identifikation solcher stabilen Gene wurde ebenfalls eine Literaturrecherche durchgeführt.

#### 3.9.4.1 Auswahl von geeigneten Genen und Primern

Zur Auswahl der Gene zur Normalisierung wurde eine Literaturrecherche durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Veröffentlichungen verwendet, welche Housekeeping Gene zur Normalisierung einer Real-Time PCR einsetzen. Diese sind in Tabelle 19 aufgeführt. Es wurden einige Veröffentlichungen zurate gezogen, welche sich spezifisch mit dem Nachweis in Salmonellen beschäftigten, aber auch Veröffentlichungen, bei denen andere Bakterien untersucht wurden. Am Ende wurden die Gene *recA*, *gapA* und *rpoD* verwendet. Dabei wurden die beiden Gene *recA* und *rpoD* häufiger in unterschiedlichen Veröffentlichungen als geeignete Housekeeping Gene angeführt. Als Stressgene wurden *proP*, *otsB* und *rpoE* ausgewählt. Dabei wurden vor allem *otsB* und *proP* aufgrund der durchgeführten Trocknungs-Versuche mit Trehalose auf Deckgläsern ausgewählt. So kodiert *otsB* für eine Trehalose-6-Phosphat Phosphatase und spielt damit eine Rolle im Trehalose-Biosynthese-Stoffwechsel von *Salmonella*. Das Protein ProP ist ein Transporter, welcher Osmoprotektoren bei niedrigem  $a_w$ -Stress in die Zelle transportiert (Finn et al. 2013). Zu diesen Osmoprotektoren gehört unter anderem auch Trehalose (Finn et al. 2013). Das Gen *rpoE* kodiert einen Sigmafaktor  $\sigma^E$ . Dieser Sigmafaktor wird in *Salmonella* für die Regulation des optimalen Wachstums unter Stressbedingungen wie hohe Osmolarität oder Nährstoffmangel benötigt (McMeechan et al. 2007).

Zur Auswahl geeigneter Primer wurden auf NCBI Gensequenzen der jeweiligen Gene gesucht. Es wurden Gensequenzen unterschiedlicher *Salmonella*-Stämme verwendet, welche mittels Clustal Omega über ein Multiple Alignment miteinander abgeglichen wurden. Mögliche Primersequenzen wurden mit dem NCBI Primer Blast gesucht. Die

Primersequenzen wurden nochmals mit dem Multiple Alignment abgeglichen, um unpassende Stellen zwischen den Sequenzen und Primern auszuschließen. Alle Primer sind in den Tabellen 20 und 21 aufgelistet und wurden bei TIB Molbiol bestellt.

Tabelle 18: Übersicht der verwendeten Veröffentlichungen zur Auswahl von Housekeeping Genen zur Normalisierung der Real-Time PCR.

Veröffentlichung	Bakterium	Haushaltsgen
Savli et al. 2003	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>ampC, fadD, proC, pbp-2, rpoD, rpoS</i>
McMillan et al. 2014	<i>Azospirillum brasilense</i>	16S rRNA, <i>gapB, glyA, gyrA, proC, pykA, recA, recF, rpoD, tpiA</i>
Bottledoorn et al. 2006	<i>Salmonella enterica</i>	16S rRNA, <i>rpoD, gmk</i>
McQuiston et al. 2008	<i>Salmonella</i> Species	<i>gapA, phoP, mdh, recA</i>
Sheikh et al. 2011	<i>Salmonella enterica</i> Serotype Typhi	<i>glnS, eno</i>
Gal-Mor et al. 2011	<i>Salmonella enterica</i>	<i>rpoD</i>
Joerger et al. 2012	<i>Salmonella enterica</i>	<i>thrA, pepB, aceB, dnaQ</i>
Takle et al. 2007	<i>Pectobacterium atrospecticum</i>	<i>recA, ffh, proC, gyrA</i>
Ritz et al. 2008	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>gyrA, ilvC, rpoA, slyD, thiC, rrs</i>
Chang et al. 2008	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>rpoN, rpoD, dbhA, phaF, 16S rRNA, gst, lexA, atkA</i>
Marco et al. 2007	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>recA</i>
Florindo et al. 2012	<i>Streptococcus agalactiae</i>	16S rRNA, <i>glcK, glnA, groEL, gyrA, recA, rpoB, rpsL, sdhA, tkt</i>

**Tabelle 19: Primersequenzen der Stressgene für die RNA-Analyse.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Schmelzpunkt T<sub>m</sub></b>	<b>Länge Fragment</b>
ProP Forward	TTCCGTTCTTTATCGCCCTG	57,98	189
ProP Reverse	TACATGACAACAGGCTACGC	57,99	
OtsB Forward	GAACCGTTAACCGTATCCCC	58,06	201
OtsB Reverse	AGCATCCAGCTCAGTCATTG	57,96	
RpoE Forward	CAGCATAAAGTGGCGAGTCT	57,98	210
RpoE Reverse	GTCTACATCACTGGAAGGCG	58,07	

**Tabelle 20: Primersequenzen Referenzgene für die Normalisierung der RNA-Analyse.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Schmelzpunkt Tm</b>	<b>Länge Fragment</b>
GapA Forward	GTATCGGTTCGCATTGTTTTCC	57,95	122
GapA Reverse	GCCGTGAGTGGAGTCATATT	57,40	
RpoD Forward	TCAACCAGGTTCAATGCTCC	58,09	121
RpoD Reverse	TCGACAAAGCCGGTGATAAG	58	
RecA Forward	CACTGGGCCAAATTGAAAAGC	58,85	96
RecA Reverse	AGCGAACCGGTGGAGATAG	58,88	

#### 3.9.4.2 RNA-Extraktion mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit

Für die Extraktion der RNA wurde 1 ml einer 4h-Kultur des Stammes *Salmonella enterica* ser. Typhimurium verwendet, sowie 1 ml der getrockneten Zellen welche in MRD gelöst waren (siehe Punkt 3.7.2, 3.8.1 und 3.8.6). Die Extraktion erfolgte mit dem Qiagen RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen 2015). Es wurde 1 mg/ml Lysozym in TE-Puffer vorbereitet. Auf 1 ml Bakterienkultur wurden 2 ml RNAprotect Bacteria Reagent gegeben, das Gefäß für 5 Sekunden gevortext und für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 5000 x g für 5 Minuten. Der Überstand wurde vollständig abgenommen. Es wurde die entsprechende Menge an Lysozym in TE-Puffer zu den Bakterien gegeben und die Probe für 10 Sekunden gevortext bevor eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten durchgeführt wurde. Während der Inkubation wurde die Probe alle 2 Minuten für 10 Sekunden gevortext. Die entsprechende Menge an RLT-Puffer wurde zugegeben und die Probe gevortext. Es wurde die entsprechende Menge an 96%igem Ethanol zugegeben und die Probe durch pipettieren gemischt. Das gesamte Lysat wurde auf die RNeasy Mini spin Säule gegeben, welche in ein 2 ml Auffanggefäß gestellt wurde. Es folgte eine Zentrifugation von 15 Sekunden bei 10.000 x g. Der Durchfluss wurde verworfen, das Auffanggefäß wurde wiederverwendet. Für den DNase-Verdau wurde das RNase-Free DNase Set von Qiagen verwendet, welches nach den Angaben des Herstellers in RNase-freiem Wasser angesetzt wurde. Die DNase wurde aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Es wurden 350 µl RW1-Puffer auf die RNeasy spin-Säule gegeben und diese bei 8000 x g für 15 Sekunden abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. 10 µl der DNase Vorratslösung wurde auf die Säule pipettiert sowie 70 µl RDD-Puffer. Das Gefäß wurde vorsichtig invertiert und kurz abzentrifugiert um Restflüssigkeit von der Gefäßwand zu entfernen. Es wurden 80 µl DNase I Inkubationsmix direkt auf die Säule gegeben und die Probe für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und die Säule bei 8000 x g für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss und das Auffanggefäß wurden verworfen. Es folgten zwei Waschschrte mit je 500 µl RPE-Puffer. Die erste Zentrifugation wurde bei 8000 x g für 15 Sekunden durchgeführt, die zweite Zentrifugation bei 8000 x g für 2 Minuten. Der Durchfluss wurde verworfen. Auf die Säule wurden 30 µl RNase-freies Wasser zum eluieren gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 8000 x g für 1 Minute. Die RNA-Konzentration wurde mit dem Nanodrop 2000/2000c bei 260 nm gemessen. Eine

Verdünnung der RNA wurde mit RNase-freiem Wasser durchgeführt. Die RNA wurde bei -80°C eingefroren.

### 3.9.4.3 Reverse Transkription mit der SuperScript III Reverse Transkriptase von Invitrogen

Für die Reverse Transkription wurden 2 µl der isolierten RNA (etwa 20 ng) eingesetzt, sowie 100 ng Random Hexamer Primer von Applichem. Insgesamt wurde ein Reaktionsvolumen von 20 µl verwendet. Random Hexamer Primer, dNTP Mix und RNA wurden zusammen in ein Nuklease-freies Mikrozentrifugationsgefäß gegeben und mit RNase und DNase-freiem Wasser auf 14 µl Gesamtvolumen aufgefüllt (siehe Tabelle 24). Die Probe wurde bei 65°C für 5 Minuten in einem Thermomixer erhitzt und danach für 1 Minute auf Eis inkubiert. Durch eine kurze Zentrifugation wurde der Inhalt des Gefäßes gesammelt und im Folgenden First-Strand Buffer, DTT und die Superscript III zugegeben. Das Gefäß wurde bei 25°C für 5 Minuten und danach bei 50°C für 45 Minuten inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte in einem Thermomixer durch Erhitzen auf 70°C für 15 Minuten. Die cDNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

**Tabelle 21: Verwendete Menge und Konzentration der Reagenzien für die Reverse Transkription**

Komponente	Konzentration	Menge [µl]
Random Hexamer Primer	100 ng	4
dNTP Mix (10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	10 mM	1
RNA	~20 ng	2
RNase und DNase-freies Wasser		7
First-Strand-Buffer	5x	4
DTT	0,1 M	1
SuperScript III RT	200 units/µl	1
Gesamtvolumen		20

### 3.9.4.4 Durchführung der Real-Time PCR zur Überprüfung der Primer

Die bei TIB Molbiol bestellten Primer wurden in DNase und RNase-freiem Wasser gelöst und wiesen eine Endkonzentration von 5 µM auf. Die Primer wurden bei -20°C

gelagert. Für die PCR wurde der Farbstoff EvaGreen verwendet, welcher mit 1x TE-Puffer auf eine endgültige Verdünnung von 1:10000 verdünnt wurde. Hiervon wurden 1,25 µl in die PCR eingesetzt. Dies entspricht einer Endkonzentration von 1:20000. Die PCR wurde nach dem untenstehenden Schema pipettiert (siehe Tabelle 22). In die PCR wurde 1 µl der zuvor gewonnenen cDNA aus der Reversen Transkription eingesetzt. Der Real-Time PCR Lauf wurde anhand des Programms in Tabelle 23 durchgeführt.

**Tabelle 22: Verwendete Menge und Konzentration der PCR-Reagenzien für die Real-Time PCR**

<b>Komponente</b>	<b>Menge pro Ansatz [µl]</b>
10x PCR Puffer NovaTaq (Endkonzentration: 1x)	2,5
25 mM MgCl <sub>2</sub> (Endkonzentration: 1,5 mM)	1,5
10 mM dNTPs (each) (Endkonzentration: 0,2 mM)	0,5
5 µM Forward Primer (Endkonzentration: 0,2 µM)	1
5 µM Reverse Primer (Endkonzentration: 0,2 µM)	1
Farbstoff Eva Green	1,25
5 U/µl Novagen Taq Polymerase (Endkonzentration: 1,25 U)	0,25
PCR-Wasser	12
Gesamtvolumen	20

**Tabelle 23: Programm zur Durchführung der Real-Time PCR**

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Cycles</b>
Initiale Denaturierung	95°C	7 Minuten	1
Annealing	94°C	30 Sekunden	45
	55°C	1 Minute	45

### **3.10 Einsatz der Laktose-Proben für Lebensmittel- bzw. Validierungsversuche**

Für den durchgeführten Lebensmittel- bzw. Validierungsversuch wurde Bebevita Anfangsmilch verwendet, welches in der Drogerie Rossmann gekauft wurde. Ziel der Untersuchung war zu klären, ob die in Laktose getrockneten Bakterien für einen Lebensmittelversuch und damit zukünftig für die Validierungen von Nährmedien, Nachweissystemen und Methoden eingesetzt werden können.

#### **3.10.1 Durchführung eines Lebensmittel- bzw. Validierungsversuchs nach ISO 16140-3 und ISO 6579**

Das verwendete Lebensmittel wurde artifiziell mit den in Laktose getrockneten Bakterien kontaminiert. Als Vergleich wurde eine frisch in BPW angesetzte Kultur des Stammes *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC® 14028 eingesetzt. Laut der neu überarbeiteten ISO 16140-3, welche dem Komitee zur Abstimmung vorliegt, werden jeweils drei relevante Inokulationsstufen bestimmt (ISO 16140-3:2017). Dabei handelt es sich um eine niedrige Inokulationsstufe, eine mittlere Inokulationsstufe und eine hohe Inokulationsstufe. Die niedrige Inokulationsstufe wird als Detektionslimit pro zu testender Einheit festgesetzt, die mittlere Inokulationsstufe soll etwa 5 mal dem Detektionslimit pro zu testender Einheit entsprechen und die hohe Inokulationsstufe etwa 10 mal dem Detektionslimit pro zu testender Einheit. Für diesen Versuch wurde das Detektionslimit auf 0,7 KBE pro zu testender Einheit festgelegt. Mittels dieses Detektionslimits sollen laut Poisson-Verteilung 50% aller Proben positiv getestet werden (ISO 16140-3:2017). Damit ergeben sich, bei einer Multiplikation mit dem Faktor 5 bzw. 10, für die mittlere Detektionsstufe 3,5 KBE und für die hohe Detektionsstufe 7 KBE. Ebenfalls mitgeführt werden soll eine nicht artifiziell kontaminierte Negativkontrolle (ISO 16140-3:2017). Da die Menge an zugegebenen Keimen laut ISO unbekannt ist, sollen ebenfalls Beutel mit weiteren Verdünnungen angesetzt werden, um eine zu niedrige oder zu hohe Keimzahl abzudecken. Hierfür wurden für diesen Versuch 1,4 KBE, 14 und 28 KBE verwendet. Nach erfolgter Keimzahlbestimmung sollen nur noch die Beutel weiter bearbeitet werden, in die die gewünschte Anzahl an Bakterien eingimpft wurde. Laut ISO kann das niedrige Limit bei 1 - 3 KBE pro zu testender Einheit, die mittlere Stufe bei 5 - 15 KBE pro zu testender Einheit und die hohe Stufe bis zu 30 KBE pro zu testender Einheit gesetzt werden (ISO 16140-3:2017). Mit den verwendeten Detektionsstufen werden alle in der ISO-Norm angegebenen Bereiche ebenfalls abgedeckt (siehe Tabelle 24). Da es sich bei dem zu

testenden Bakterium um einen *Salmonella*-Stamm handelte, wurde für die Testung der Anfangsmilch anhand der ISO-Norm 6579 vorgegangen (siehe Abbildung 29; ISO 6579:2002).

### 3.10.2 Vorversuche zum Validierungsversuchs

Durch Vorversuche wurde untersucht, ob für eine Flüssigkultur des Stammes *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC® 14028 eine Stabilität der Keimzahl erreicht werden kann. Dabei wurden die Keimzahlen mehrerer flüssiger Vorkulturen miteinander verglichen. Diese Vorkulturen wurden immer gleich angesetzt und inkubiert. Dies sollte das Animpfen der Lebensmittelproben ohne vorherige Keimzahlbestimmung ermöglichen. Für das Animpfen der Lebensmittelproben wurde die Keimzahl anhand der im Vorversuch generierten Daten abgeschätzt. Des Weiteren sollte für die Laktose-Proben eine Möglichkeit für die akkurate artifizielle Kontamination der Lebensmittelproben untersucht werden.

#### 3.10.2.1 Keimzahlbestimmung einer Flüssigkultur

Es wurden mehrere Flüssigkulturen des Stammes *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC® 14028 in 10 ml gepuffertem Peptonwasser angesetzt. Verwendet wurde eine zuvor aus der Stammsammlung ausgestrichene Blutagarplatte des Stammes *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC® 14028. Von dieser Platte wurde eine einzelne Kolonie in 10 ml gepuffertem Peptonwasser gegeben und für genau 20 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde eine Verdünnungsreihe in 9 ml MRD angesetzt und die Verdünnungsstufen  $10^{-6}$  –  $10^{-8}$  á 50 µl auf CASO-Fertigplatten aufgetropft. Für jede Verdünnungsstufe wurden je achtmal 50 µl aufgetropft. Anhand der erhaltenen Werte wurde die Keimzahl bestimmt. Es wurden an zwei unterschiedlichen Tagen je drei Vorkulturen angesetzt, um die Konstanz der Keimzahl zu bestimmen.

#### 3.10.2.2 Keimzahlbestimmung der Laktose-Probe

Um eine Laktose-Probe mit stabiler und angemessener Keimzahl zu erhalten, wurden 3 g einer bereits zuvor getrockneten Laktose-Probe mit 27 g frischem Laktose-Monohydrat vermischt. Diese angesetzte Verdünnung wurde auf Kieselgel bei Raumtemperatur bis zur Verwendung gelagert. Die Keimzahl dieser Probe wurde bestimmt, indem 1 g Laktose in 9 ml MRD gegeben wurde. Es wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt, bis zu einer Verdünnung von  $10^{-2}$ , und von jeder

Verdünnungsstufe je achtmal 50 µl auf CASO-Fertigplatten ausgetropft und für eine Keimzahlbestimmung verwendet. Es wurden insgesamt 3 – 4 Laktose-Proben á 1 g auf diese Art untersucht. Des Weiteren wurde entschieden, dass die Lebensmittelproben nicht mit der pulverförmigen Laktose angeimpft werden sollen. Die Laktose soll in MRD vorgelöst und flüssig zum Lebensmittel zugegeben werden.

### **3.10.2.3 Einstellen und Überprüfen der Keimzahl zur Animpfung des Lebensmittels**

Um die Lebensmittelproben mit einer definierten Keimzahl animpfen zu können, wurden Vorversuche hierzu durchgeführt. Für die Flüssigkultur wurde aus den Vorversuchen zur konstanten Keimzahl heraus ein Mittelwert der bestimmten Keimzahlen für die weitere Berechnung verwendet. Dabei wurde von einer Keimzahl von etwa  $1,49 \times 10^9$  KBE pro Milliliter Vorkultur ausgegangen. Es wurde eine Verdünnungsreihe in 9 ml MRD bis zu einer Verdünnungsstufe von  $10^{-7}$  angesetzt, welche für die weitere Einstellung der Keimzahl verwendet wurde. Für die Laktose-Probe wurde 1 g Laktose in 9 ml MRD gelöst. Diese Probe wurde nochmals 1:10 verdünnt. Der Berechnung für die weitere Verdünnung der Laktose-Probe ging stets eine Keimzahlbestimmung am Vortag voraus. Aus diesen Verdünnungsstufen der Flüssigkultur sowie der Laktose-Proben wurde die entsprechende Menge an Kultur mit Maximaler Wiederbelebungslösung vermischt, um am Ende eine Vorverdünnung zu erhalten, welche 28 KBE pro Milliliter enthalten sollte. Mittels dieser angefertigten Verdünnungen wurden alle weiteren Inokulationsstufen angeimpft. Dabei ist von den Werten in Tabelle 18 auszugehen. Zur Überprüfung der jeweiligen Keimzahlen wurden die Volumina 1 ml, 500 µl, 250 µl und 125 µl auf CASO-Fertigplatten pipettiert und mit einem Glasspatel verteilt. Für die Volumina 50 µl und 25 µl wurden die Platten geviertelt und pro Viertel einer Platte die entsprechende Menge aufgetropft ohne das Volumen mit einem Spatel zu verteilen. Pro Inokulationsstufe wurden jeweils 3 Platten zur Überprüfung der Keimzahl angeimpft. Es wurde gewartet, bis das entsprechende Volumen in die Platte eingezogen war, dann wurden die Platten bei 37°C für etwa 18 – 24 h im Brutschrank inkubiert. Da die Bakterien der Laktose-Probe relativ kleine Kolonien aufwiesen, wurde die Inkubationszeit hier nochmals um 24 h verlängert, um ein genaueres Ergebnis zu erhalten.

**Tabelle 24: Angestrebte Vorverdünnung für den Lebensmittelversuch.** Angegeben werden die KBE welche sich in einem bestimmten Volumen befinden sollen.

KBE	Menge [ $\mu$ l]
28	1000
14	500
7	250
3,5	125
1,4	50
0.7	25

### 3.10.3 Durchführung des Lebensmittel- bzw. Validierungsversuchs

Für die Flüssigkultur wurde eine Vorkultur, wie oben in Punkt 3.10.2.1 bereits beschrieben angesetzt, sowie für die Laktose-Probe eine Keimzahlbestimmung wie in Punkt 3.7.3 beschrieben durchgeführt. Je 25 g Beba Anfangsmilch wurden in einen Stomacherbeutel gegeben. Pro Inokulationsstufe wurden zwei Beutel mit Anfangsmilch eingesetzt. Am Folgetag wurde die Keimzahlbestimmung der Laktose-Probe ausgewertet und anhand dessen die Verdünnung für das Animpfen der Anfangsmilch berechnet. Die Berechnung für die Flüssigkultur stützte sich wie bereits erwähnt auf die vorher durchgeführten Versuche. Die jeweiligen Verdünnungen wurden wie in Punkt 3.10.2.3 beschrieben angesetzt und in die vorbereiteten Beutel gegeben. Im Anschluss wurde 225 ml steriles gepuffertes Peptonwasser, welches zuvor angesetzt und auf Raumtemperatur temperiert wurde, zu jedem Beutel hinzugegeben und die Beutel in einem Stomacher für 60 Sekunden gemischt. Die Beutel wurden in ein Rack gestellt und für 19 Stunden bei 36°C im Brutschrank inkubiert. Zur Bestimmung der tatsächlich eingepfunden Keimzahl wurde wie in Punkt 3.10.2.3 beschrieben vorgegangen. Die Platten wurden bei 37°C in den Brutschrank gestellt und die Keimzahl wie oben beschrieben nach 24 bzw. 48 h ausgewertet. Nach der Inkubation des Milchpulvers wurden die Beutel aus dem Brutschrank entnommen. Direkt vor Verwendung der á 10 ml aliquotierten MKTTn-Bouillon wurde das Iod-Kaliumiodid Supplement frisch zu jedem Röhrchen hinzugegeben. Das Supplement wurde in der Woche zuvor nach Anleitung aus der ISO-Norm 6579 angesetzt (ISO 6579:2002). Aus den Stomacherbeuteln wurden je 100  $\mu$ l der Voranreicherung entnommen und in 10 ml RVS-Bouillon gegeben. In die supplementierte MKTTn wurde 1 ml der Voranreicherung aus den Beuteln zugegeben. Die angeimpfte RVS-Bouillon

wurde bei 41,5°C für 24 h, die angeimpfte MKTTn-Bouillon bei 37°C für 24 h inkubiert. Zum Nachweis von *Salmonella* in den einzelnen Proben wurde nach der Selektivanreicherung ein Singlepath *Salmonella* der RVS-Proben durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen immunchromatographischen Test mit Goldmarkierten Antikörpern, welche spezifische *Salmonella* Antigene binden. Nach der Inkubation der Proben wurde aus der RVS-Bouillon je 1 ml entnommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Diese Proben wurden bei 95°C auf einem Heizblock für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden je 160 µl jeder Probe auf den Singlepath-Test gegeben und der Test für 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor das Ergebnis abgelesen wurde. Sowohl aus der RVS- als auch aus der MKTTn-Bouillon wurden mit einer 10 µl Impföse Material entnommen und Vereinzelungsausstriche auf XLD-Agar und Rambach-Agar angelegt. Die Platten wurden bei 37°C für 24 h in den Brutschrank gestellt. Die Selektivplatten wurden dann ausgewertet und mit den Ergebnissen des Singlepath-Tests abgeglichen. Aufgrund der Ähnlichkeit der Kolonien auf den Selektivplatten wurde eine Bestätigung von je einer Kolonie des XLD- und Rambach-Agars durchgeführt. Hierfür wurde ein Ausstrich einer Kolonie auf CASO-Fertigplatten angelegt und für 24 h bei 36°C im Brutschrank inkubiert. Die Proben wurden im Folgenden mittels MicroSEQ®-System anhand der Sequenzierung der 16S-rDNA identifiziert. Die Identifizierung wurde nicht selbst durchgeführt, die Probe wurde für die Sequenzierung an ein Merck-internes Labor weitergegeben.

#### **3.10.4 Statistische Auswertungen**

Statistische Auswertungen wurden mit Hilfe von Excel 2016 und Minitab 17 durchgeführt. Als statistische Auswertemethoden wurden der t-test sowie die ANOVA einfaktorielle Varianzanalyse verwendet. Für die oben genannten Tests ist die Normalverteilung der Werte Voraussetzung. Im Bereich der Biologie werden häufig Daten gewonnen, welche keiner Normalverteilung folgen (Leyer & Wesche 2008, S. 37). Zur statistischen Auswertung dieser Daten können entweder nichtparametrische Verfahren verwendet werden, oder die Daten können transformiert werden, um sie einer Normalverteilung ähnlicher zu machen (Leyer & Wesche 2008, S. 38). Für die vorliegende Arbeit wurde eine logarithmische Transformation der Daten angewendet. Die Überprüfung auf eine Normalverteilung der Daten erfolgte über

Excel. Die Daten wurden anhand einer Dichtefunktion der Normalverteilung dargestellt, sowie eines Quantil-Quantil Plots (QQ-Plot). Weiterhin wurden Modelle zur Kategorisierung der Absterbe-Parameter für getrocknete Salmonellen mit Excel 2016 erstellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Proteom-Untersuchungen mittels TMT-Labeling und Massenspektrometrie

Das Bakterium *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC® 14028 wurde in den zuvor beschriebenen Untersuchungen in Laktose-Monohydrat getrocknet. Zur Charakterisierung der Auswirkungen des Trockenstresses auf das Bakterium wurden Untersuchungen auf molekularer Ebene angewandt. Hierfür wurden Proteine aus den getrockneten Salmonellen extrahiert, welche mit TMT-Labels versehen und einer Auftrennung und Analyse mittels Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie unterzogen wurden (siehe Punkt 3.9.3.2). Verglichen wurde die durch Laktose-Trocknung gestresste Probe mit einer ungestressten Probe desselben Stammes. Mit dieser Methode konnten insgesamt 1820 Proteine identifiziert werden. Durch das TMT-Labeling war es möglich Unterschiede in der Expression verschiedener Proteine in gestressten und ungestressten Salmonellen festzustellen. Von den ermittelten 1820 Proteinen wurden 592 Proteine hochreguliert und 762 Proteine herunterreguliert. Zur weiteren Auswertung wurden alle Proteine untersucht, welche eine mindestens doppelt so hohe oder höhere bzw. doppelt so niedrige oder niedrigere Expression aufwiesen als es in der ungestressten Probe der Fall war. Es wurden 27 Proteine identifiziert, welche in der Laktose-getrockneten *Salmonella*-Probe eine deutlich höhere Expression aufwiesen als in der ungestressten Vergleichsprobe (fold-change  $\geq 2$ ). Zusätzlich konnten 18 Proteine identifiziert werden, die in der gestressten *Salmonella*-Probe eine niedrigere Expression aufwiesen als in der ungestressten Vergleichsprobe (fold-change  $\geq 2$ ). Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 und Tabelle 26 gezeigt.

#### 4.1.1 Proteom-Analyse von *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC® 14028 nach Trocknung in Laktose-Monohydrat

Die identifizierten hochregulierten Proteine wurden in die Kategorien Transport, Kohlenhydrat- und Energiestoffwechsel, Stressantwort, Signaltransduktion, Transkriptionsregulation und DNA-Reparatur und unbekannte bzw. hypothetische Funktion eingeteilt. Die Aufteilung der herunterregulierten Proteine erfolgte in die Kategorien Transport, Mobilität, Nukleotid-Biosynthese, Elektronentransfer, Stressantwort, Schutzfunktion und unbekannte bzw. hypothetische Funktion.

Bei den hochregulierten Proteinen wurden zwei Glycin-Betain Transporter (*proW* und *proV*) mit einer Expressionsänderung um den Faktor 2,2 und 2,4 identifiziert, sowie

eine Adenylat-Cyclase (*cyaA*), welche für die Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielt. In Bezug auf den Kohlenhydrat- und Energiestoffwechsel der Zelle wurden hochregulierte Proteine wie die Citrat-Synthase (*prpC*), eine Aldehyd-Dehydrogenase B (*aldB*), eine 2-Methylisocitrat Lyase (*prpB*), eine Malat-Synthase (*aceB*), eine Oxidoreduktase (*yghA*) und eine Transaldolase (*talA*) ermittelt. Die Änderungen der Expression unterscheiden sich von denen der ungestressten Zellen um einen Faktor 2 – 2,8. Auch wurde ein Protein, welches für die Regulation der Stressantwort zuständig ist, um eine Faktor 2 hochreguliert. Dabei handelt es sich um das DNA-Schutzprotein bei Hungerstress (*dps*). Im Bereich der Transkription und DNA-Reparatur wurden der Sigmafaktor RpoS (*rpoS*), sowie eine ATP-abhängige DNA Helikase RecG (*recG*) um den Faktor 2 bzw. 3,6 hochreguliert. Insgesamt 14 Proteine mit unbekannter oder hypothetischer Funktion wurden ebenfalls um Faktoren zwischen 2 und 3,5 hochreguliert.

**Tabelle 25: Hochregulierte Proteine in Laktose getrockneten Bakterien.** Gezeigt sind Proteine die in den getrockneten Bakterien mindestens um einen Faktor 2 höher exprimiert wurden als in den ungestressten Bakterien (fold-change  $\geq 2$ )

Gen	Zugangsnummer uniprot.org	Genprodukt	fold-change ( $\geq 2$ )
<b>Transport</b>			
<i>proW</i>	A0A0F6B5L7	Glycin-Betain Transporter, Membran Protein	2,4
<i>proV</i>	A0A0F6B5L6	Glycin-Betain Transporter ATP-bindende Untereinheit	2,2
<b>Kohlenhydrat- und Energiestoffwechsel</b>			
<i>prpC</i>	A0A0F6AXI0	Citrat-Synthase	2,8
<i>aldB</i>	A0A0F6B8H4	Aldehyde-Dehydrogenase B	2,7
<i>prpB</i>	A0A0F6AXH9	2-Methylisocitrat Lyase	2,1
<i>aceB</i>	A0A0F6BA18	Malat-Synthase	2,1
<i>yghA</i>	A0A0F6B6S9	Oxidoreduktase	2,1
<i>talA</i>	A0A0F6B4M4	Transaldolase	2,0

<b>Stressantwort</b>			
<i>dps</i>	A0A0F6AYY9	DNA-Schutzprotein bei Hungerstress	2,0
<b>Transkriptionsregulation und DNA-Reparatur</b>			
<i>recG</i>	A0A0F6B8P5	ATP-abhängige DNA Helikase RecG	3,6
<i>rpoS</i>	D0ZVL4	RNA-Polymerase Sigmafaktor RpoS	2,0
<b>Signaltransduktion</b>			
<i>cyaA</i>	A0A0F6B9A1	Adenylat-Cyclase	2,1
<b>Unbekannte oder hypothetische Funktion</b>			
<i>yciF</i>	A0A0F6B221	Mögliches cytoplasmatisches Protein	3,5
<i>ygaU</i>	A0A0F6B5J6	Uncharakterisiertes Protein	3,2
<i>ygaM</i>	A0A0F6B5K8	Uncharakterisiertes Protein	2,8
STM14_1521	A0A0F6B0H4	Mögliches cytoplasmatisches Protein	2,6
<i>sitB</i>	A0A0F6B5S9	Mögliches ATP-bindendes Protein	2,6
<i>ybaY</i>	A0A0F6AXU5	Uncharakterisiertes Protein	2,5
<i>elaB</i>	A0A0F6B448	Uncharakterisiertes Protein	2,5
STM14_1509	A0A0F6B0G2	Mögliches molekulares Chaperon	2,3
<i>ygdI</i>	A0A0F6B661	Mögliches Lipoprotein	2,2
<i>yciE</i>	A0A0F6B222	Mögliches cytoplasmatisches Protein	2,2
STM14_0095	A0A0F6AWL1	Mögliches Lipoprotein der äußeren Membran	2,1
<i>yfaZ</i>	A0A0F6B430	Mögliches Protein der inneren Membran	2,1

<i>yqjD</i>	A0A0F6B716	Mögliches Protein der inneren Membran	2,1
<i>ybdR</i>	A0A0F6AYA6	Mögliche Dehydrogenase	2,0
<i>yeaG</i>	A0A0F6B0L0	Mögliche Serin-Proteinkinase	2,0

Bei den herunterregulierten Proteinen wurden nur zwei Proteine mit unbekannter oder hypothetischer Funktion identifiziert, welche um einen Faktor 2,2 bzw. 2,3 in den gestressten Bakterien herunterreguliert wurden. Auch unter den herunterregulierten Proteinen finden sich einige Transportproteine. Hierzu gehören zwei Proteine des Arginin Transportsystems (*artI* und *artJ*), ein Molybdän Transporter (*modA*) und ein Putrescin-bindendes periplasmatisches Protein (*potD*). Die aufgeführten Proteine zeigten eine Expressionsabnahme um den Faktor 2 – 2,2. In Bezug auf die Stressantwort konnten drei Kältestressproteine CspE, CspC und CspD ermittelt werden, welche in der gestressten Zelle deutlich geringer exprimiert wurden. Auch wurde ein Sekretions-Chaperon (*sicA*) und das Säurestress Chaperon HdeB in der gestressten Zelle weniger stark exprimiert. Die Expressionsunterschiede liegen zwischen den Faktoren 2,1 und 3. Ebenfalls mit einer geringeren Expression in der gestressten Zelle nachgewiesen werden konnte das Flagellin-Protein FlicC sowie ein Lysozym-Inhibitor PliC. Beide zeigten eine um den Faktor 2,1 bzw. 2,2 geringere Expression in der gestressten Zelle. Im Bereich der Nukleotid-Biosynthese wurden die beiden Proteine dITP/XTP Pyrophosphatase (*yggV*) und Nukleosid-Diphosphat Kinase (*ndk*) in den gestressten Bakterien um einen Faktor 2 bzw. 2,5 niedriger exprimiert als in den ungestressten Bakterien. Die letzte Kategorie beinhaltet zwei Proteine, welche beim Elektronentransfer eine Rolle spielen. Dabei handelt es sich um Cytochrom b562 (*cybC*) und Glutaredoxin (*grxA*). Beide Proteine wurden in den gestressten Bakterien um den Faktor 2 bzw. 3,2 herunterreguliert.

**Tabelle 26: Herunterregulierte Proteine in Laktose getrockneten Bakterien.** Gezeigt sind Proteine die in den getrockneten Bakterien mindestens um einen Faktor 2 geringer exprimiert wurden als in den ungestressten Bakterien (fold-change  $\geq 2$ )

Gen	Zugangsnummer uniprot.org	Genprodukt	fold-change ( $\geq 2$ )
<b>Transport</b>			
<i>artI</i>	A0A0F6AZ63	Arginin Transportsystem	2,2
<i>artJ</i>	A0A0F6AZ60	Arginin Transportsystem	2,1
<i>modA</i>	A0A0F6AYT2	Molybdän Transporter, periplasmatisches Protein	2,1
<i>potD</i>	A0A0F6B060	Putrescin-bindendes periplasmatisches Protein	2,0
<b>Mobilität</b>			
<i>fliC</i>	A0A0F6B2U2	Flagellin	2,2
<b>Nukleotid-Biosynthese</b>			
<i>yggV</i>	A0A0F6B6K6	dITP/XTP Pyrophosphatase	2,5
<i>ndk</i>	A0A0F6B4T8	Nukleosid-Diphosphat Kinase	2,0
<b>Elektronentransfer</b>			
<i>cybC</i>	A0A0F6BAW2	Cytochrom b562	3,3
<i>grxA</i>	A0A0F6AZ44	Glutaredoxin	2,0
<b>Stressantwort</b>			
<i>cspE</i>	A0A0F6AYC2	Kälteschockprotein CspE	3
<i>cspC</i>	A0A0F6B2E5	Kälteschock-ähnliches Proteon CspC	2,6
<i>cspD</i>	A0A0F6AZ83	Kälteschock-ähnliches Proteon CspD	2,4
<i>sicA</i>	A0A0F6B5V3	Sekretions-Chaperon	2,1
<i>hdeB</i>	A0A0F6B1H4	Säurestress Chaperon HdeB	2,1

<b>Schutzfunktion</b>			
<i>pliC</i>	A0A0F6B0F8	Lysozym Inhibitor	2,1
<b>Unbekannte oder hypothetische Funktion</b>			
STM14_1155	A0A0F6AZH5	Uncharakterisiertes Protein	2,3
<i>yeaC</i>	A0A0F6B0M0	Mögliches cytoplasmatisches Protein	2,2

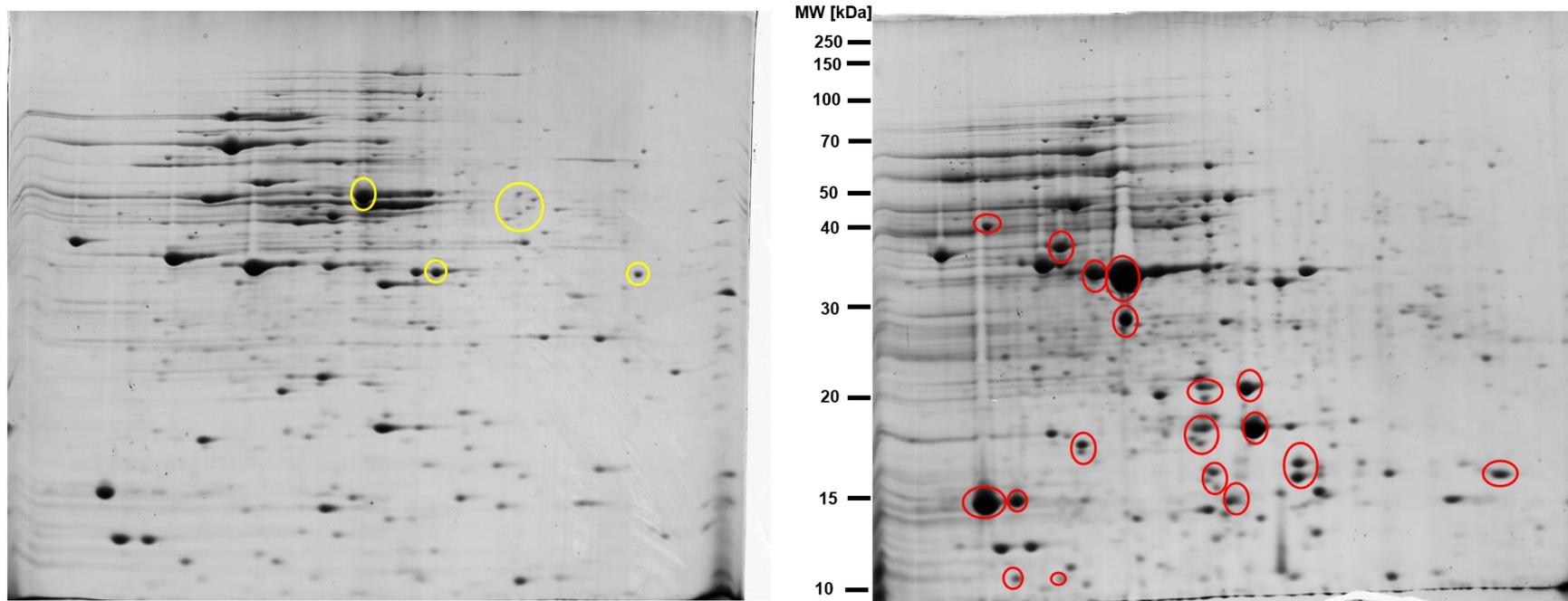
#### 4.1.2 Untersuchung der Proteinextrakte von gestressten und ungestressten Bakterien mittels 2D-SDS-Page

Zur Untersuchung der durch Trocknung und Hitze gestressten Bakterien auf molekularer Ebene, wurden Untersuchungen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese durchgeführt. Das Ziel der Versuche war Unterschiede im Proteom der gestressten Bakterien im Vergleich zu einer ungestressten Probe zu ermitteln. Im Anschluss an die zweidimensionale Auftrennung sollten geeignete Proteine aus dem SDS-Gel ausgestochen und mittels Massenspektrometrie untersucht werden. Die Massenspektrometrie-Untersuchungen wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt, da stattdessen die Gesamtproteomuntersuchung mittels TMT-Labeling und Massenspektrometrie weiterverfolgt wurde. Die in dieser Arbeit erhaltenen zweidimensionalen Gele sind in Abbildung 1 bis 4 zu sehen. Die Auftrennung in der ersten Dimension erfolgte in einem pH-Bereich zwischen 4 – 7. Im Anschluss wurden die Proteine mit einem 4%igen Sammelgel und einem 12%igen Trenngel der Masse nach aufgetrennt. Es wurde jeweils ein Gel mit einer gestressten Proteinprobe und ein Gel mit einer ungestressten Probe zusammen in einer Gelelektrophorese-Kammer laufen gelassen, um die Vergleichbarkeit der Gele zu gewährleisten. Aufgetrennt wurden drei gestresste Proben für den Stamm *Salmonella* Typhimurium und eine gestresste Probe von *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004. Bei *Cronobacter* wurde eine in Laktose getrocknete Probe verwendet, für *Salmonella* eine in Laktose getrocknete Probe, eine Hitzeschock-Probe und eine Hitzeschock-Probe welche bei -80°C eingefroren wurde. Verglichen wurden alle gestressten Proben mit einer ungestressten Vorkultur. Innerhalb der einzelnen Gelbilder wurden per Hand Proteine markiert, welche höher exprimiert wurden, als es bei der Vergleichsprobe der Fall war. Alle Gelbilder ungestresster Proben wurden mit gelb markiert, alle Gelbilder gestresster Proben mit rot.

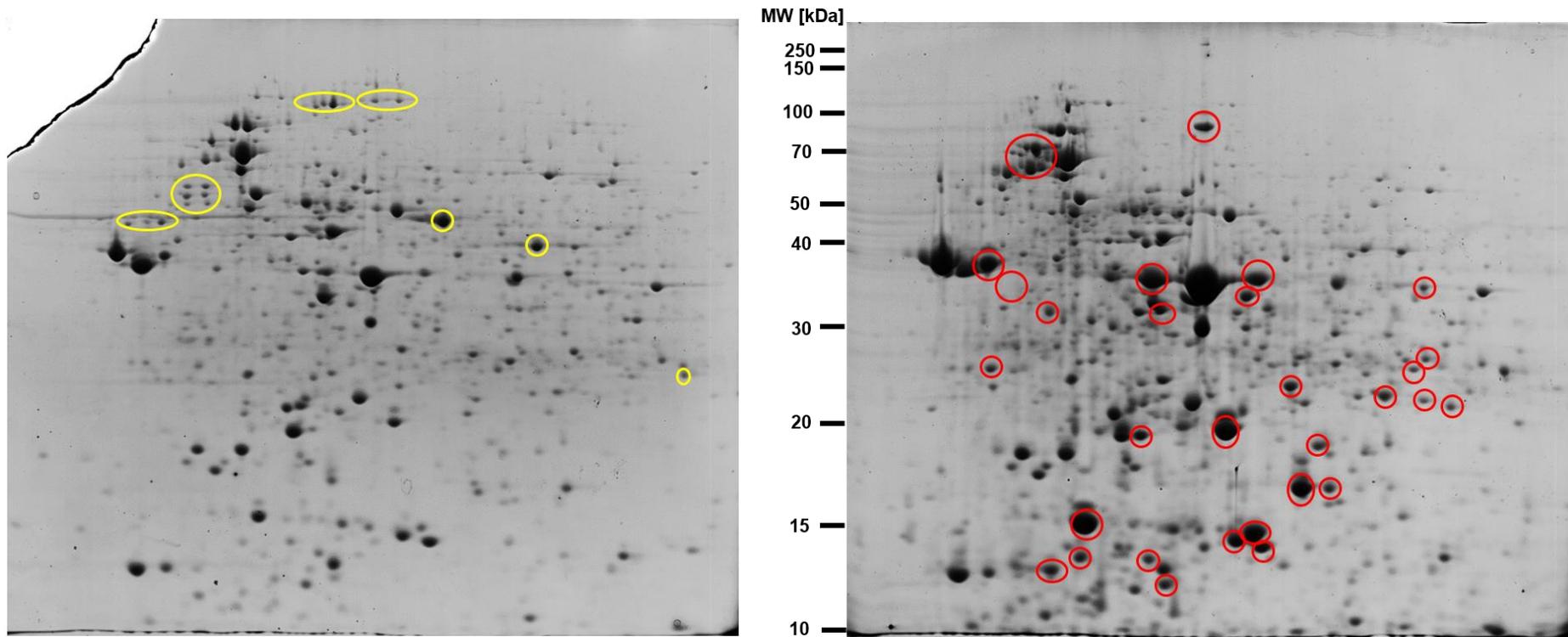
Die in Abbildung 5 gezeigten Gele von *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004 weisen einen horizontalen Schmier auf, der auf beiden Bildern auftritt. Dadurch werden einige Proteine stark über das Gel verzerrt. Dies führt dazu, dass einige Proteine nicht mehr sehr deutlich identifiziert werden können. Insgesamt konnten für die gestresste Probe mehr Proteine erfasst werden, als für die ungestresste Probe. Auch erscheinen die Proteine der ungestressten Proben auf dem Gel schwächer und weniger deutlich. Möglicherweise wurde durch eine ungenaue Protein-Messmethode weniger Protein auf das Gel aufgetragen. Auf dem Gel mit gestressten Proben, können viele Proteine identifiziert werden, die auf dem Gel mit der ungestresster Probe nicht oder nur schwach auftreten. Diese Proteine wurden in der Abbildung farbig markiert.

In Abbildung 6 sind die Gelbilder für *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 gezeigt. Aufgetragen wurden eine ungestresste Probe, sowie eine durch Trocknung in Laktose gestresste Probe. Auch hier können auf dem Gel mit der gestressten Probe mehr Proteine detektiert werden als auf dem Gel mit der ungestressten Probe. Viele Proteinspots, welche auf beiden Gelen deutlich zu erkennen sind, scheinen auf dem Gel mit der gestressten Probe deutlich mehr Protein aufzuweisen. Auch hier ist denkbar, dass durch eine ungenaue Protein-Messmethode mehr Gesamtprotein auf das Gel der gestressten Probe aufgetragen wurde. Für die Gele in Abbildung 7 und 8 ist dies nicht der Fall. Die hier gezeigten Gele, welche Hitzeschock-Proben bzw. Hitzeschock-Proben welche bei -80°C eingefroren wurden, mit ungestressten Proben vergleichen, gleichen sich von der Stärke der Expression charakteristischer Proteine. Es ist anzunehmen, dass etwa dieselbe Menge an Protein aufgetragen wurde.

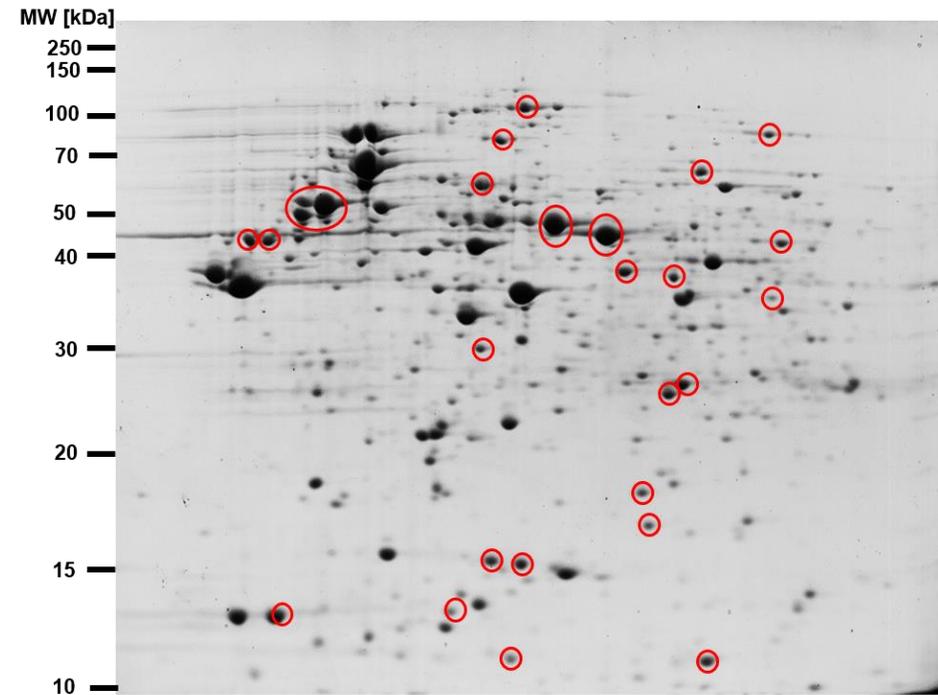
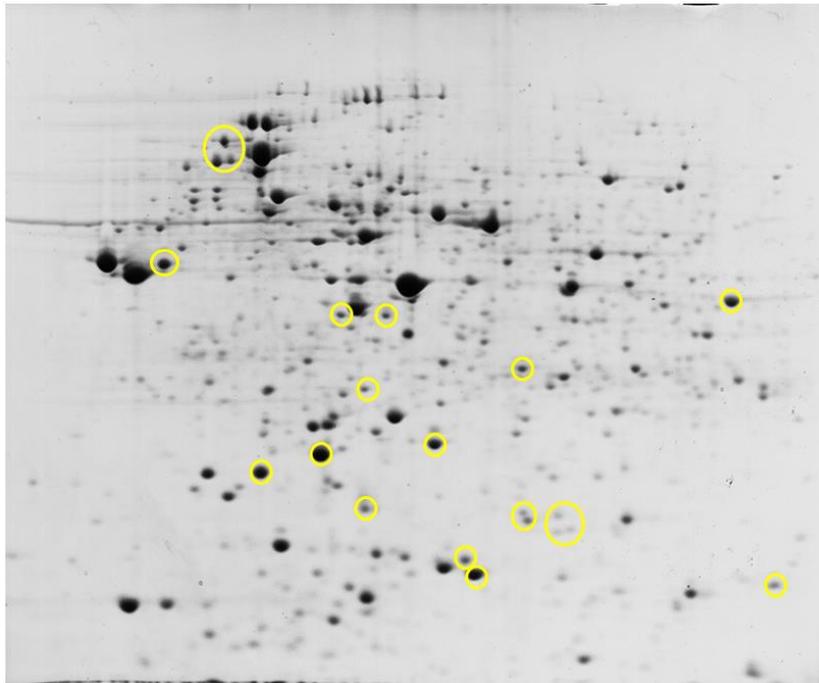
Für alle gezeigten zweidimensionalen Gele konnten deutliche Unterschiede zwischen den Gelen mit gestressten und ungestressten Proben festgestellt werden. Viele Proteine wurden höher oder niedriger exprimiert. Vergleicht man für *Salmonella* die unterschiedlichen Gele der gestressten Proben miteinander, so stellt man fest, dass sich bei den Proteinmustern große Unterschiede zeigen. Auch können bei den hochregulierten Proteinen kaum Übereinstimmungen zwischen den verschiedenen Stressarten gefunden werden.



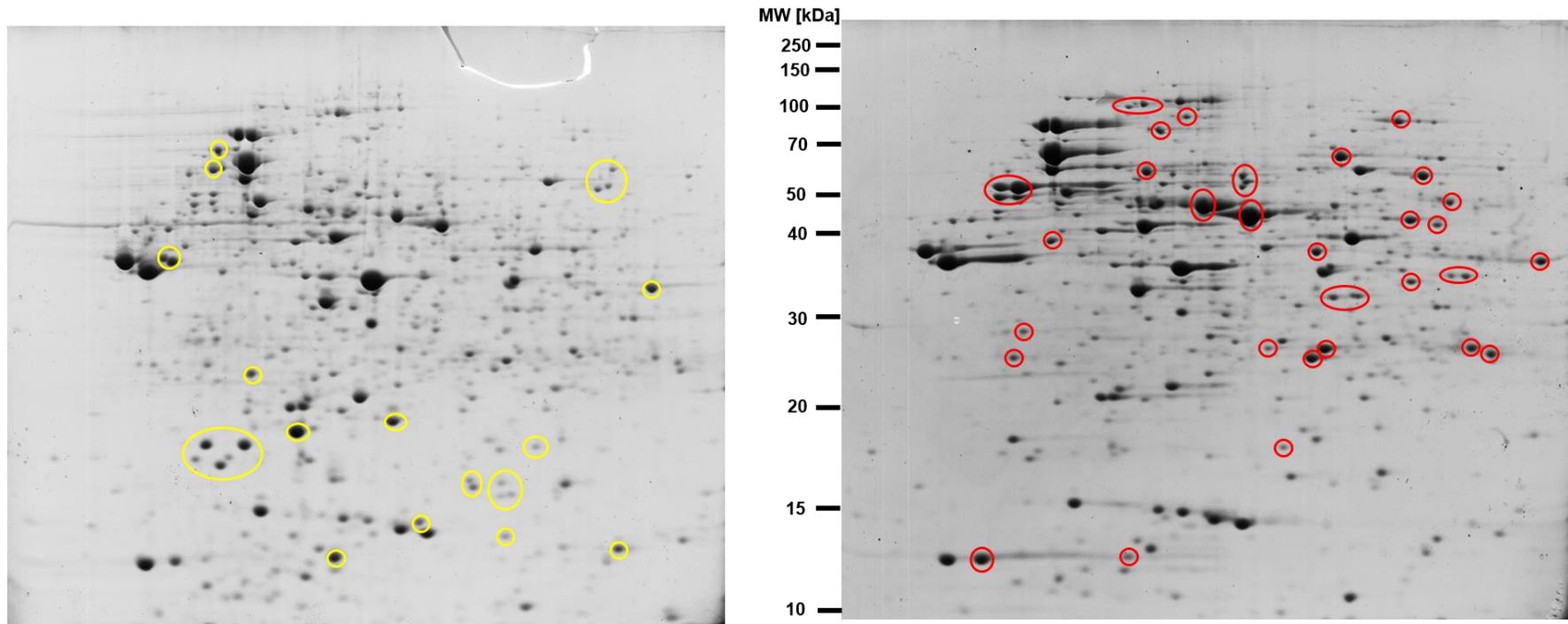
**Abbildung 5: Proteom von *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004 ungestresst (links) und nach Trocknung in Laktose-Monohydrat (rechts).** Proteinextrakt wurde zweidimensional aufgetrennt. Es wurden je 250 µg Gesamtproteinextrakt für die Auftrennung verwendet. Für die erste Dimension wurde eine Auftrennung im pH-Bereich von 4-7 durchgeführt. Die Auftrennung in der zweiten Dimension nach dem Molekulargewicht erfolgte mit einem 4%igen Salmmelgel und einem 12%igen Trenngel der Maße 20x20 cm. Markiert wurden auf beiden Gele Proteine, welche auf dem jeweiligen Gel eine höhere Expression aufwiesen als auf dem anderen (rote und gelbe Markierungen). Auch markiert wurden Proteine die auf einem Gel vorhanden und auf dem anderen Gel nicht vorhanden waren.



**Abbildung 6: Proteom von *Salmonella ser. Typhimurium ATCC® 14028* ungestresst (links) und nach Trocknung in Laktose-Monohydrat (rechts).** Proteinextrakt wurde zweidimensional aufgetrennt. Es wurden je 250 µg Gesamtproteinextrakt für die Auftrennung verwendet. Für die erste Dimension wurde eine Auftrennung im pH-Bereich von 4-7 durchgeführt. Die Auftrennung in der zweiten Dimension nach dem Molekulargewicht erfolgte mit einem 4%igen Salmmelgel und einem 12%igen Trenngel der Maße 20x20 cm. Markiert wurden auf beiden Gele Proteine, welche auf dem jeweiligen Gel eine höhere Expression aufwiesen als auf dem anderen (rote und gelbe Markierungen). Auch markiert wurden Proteine die auf einem Gel vorhanden und auf dem anderen Gel nicht vorhanden waren.



**Abbildung 7: Proteom von *Salmonella* ser. Typhimurium ATCC® 14028 ungestresst (links) und nach Hitzeschock bei 55°C für 2 Minuten (rechts).** Proteinextrakt wurde zweidimensional aufgetrennt. Es wurden je 250 µg Gesamtproteinextrakt für die Auftrennung verwendet. Für die erste Dimension wurde eine Auftrennung im pH-Bereich von 4-7 durchgeführt. Die Auftrennung in der zweiten Dimension nach dem Molekulargewicht erfolgte mit einem 4%igen Salmmelgel und einem 12%igen Trenngel der Maße 20x20 cm. Markiert wurden auf beiden Gele Proteine, welche auf dem jeweiligen Gel eine höhere Expression aufwiesen als auf dem anderen (rote und gelbe Markierungen). Auch markiert wurden Proteine die auf einem Gel vorhanden und auf dem anderen Gel nicht vorhanden waren.



**Abbildung 8: Proteom von *Salmonella* ser. Typhimurium ATCC® 14028 ungestresst (links) und nach Hitzeschock bei 55°C für 2 Minuten und Lagerung bei -80°C (rechts).** Proteinextrakt wurde zweidimensional aufgetrennt. Es wurden je 250 µg Gesamtproteinextrakt für die Auftrennung verwendet. Für die erste Dimension wurde eine Auftrennung im pH-Bereich von 4-7 durchgeführt. Die Auftrennung in der zweiten Dimension nach dem Molekulargewicht erfolgte mit einem 4%igen Salmmelgel und einem 12%igen Trenngel der Maße 20x20 cm. Markiert wurden auf beiden Gele Proteine, welche auf dem jeweiligen Gel eine höhere Expression aufwiesen als auf dem anderen (rote und gelbe Markierungen). Auch markiert wurden Proteine die auf einem Gel vorhanden und auf dem anderen Gel nicht vorhanden waren.

## 4.2 Ergebnisse der Versuche zur Trocknung von Bakterien in Laktose-Monohydrat und Milchpulver

Verschiedene Bakterien wurden in Laktose-Monohydrat und Milchpulver getrocknet und bis zu einem Maximum von 500 Tagen bei Raumtemperatur mit Kieselgel im Exsikkator gelagert. Um eine Alternative zur Trocknung in Laktose-Monohydrat zu untersuchen, wurde zusätzlich eine Trocknung in Milchpulver eingesetzt. Dabei sollten auch Unterschiede zwischen den beiden Trocknungen im Hinblick auf das Überleben der Bakterien im jeweiligen Medium untersucht werden. Die Bakterien *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25932, *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228 und *Cronobacter sakazakii* ATCC®29004 wurden in Laktose-Monohydrat und ebenfalls in Milchpulver getrocknet. Die Bakterien *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111 *Escherichia coli* ATCC® 700728 und *Salmonella* Enteritidis ATCC® 13076 wurden nur in Milchpulver getrocknet. Das Ziel der Untersuchungen war die Entwicklung von Protokollen zur Schädigung verschiedener Bakterien durch Trocknung. Diese getrockneten Bakterien sollten zusätzlich über einen längeren Zeitraum gelagert werden können. Dabei sollte sowohl die Keimzahl als auch die Schädigungsrate möglichst stabil bleiben. Die Schädigungsprotokolle sollen in Zukunft zur Generierung gestresster Bakterien eingesetzt werden, um derart gestresste Bakterien für Validierungsversuche bei der Nährmedienentwicklung und der Entwicklung von Schnellnachweissystemen einsetzen zu können. Durch die stabile Lagerung der Proben über einen längeren Zeitraum soll dasselbe Probenmaterial für mehrere Versuche oder eventuelle Wiederholungen verwendet werden können. Aufgrund dessen ist eine Langzeitlagerung der getrockneten Bakterien von Vorteil in dessen Verlauf sich die Proben möglichst wenig verändern. Dadurch sollen die Keimzahlen immer bekannt sein und damit die artifizielle Kontamination der Lebensmittelproben vereinfachen. Dadurch könnten die zusätzlich anzuimpfenden Proben laut ISO 16140-3, welche zur Absicherung für das Erreichen des richtigen Inokulums bei der artifiziellen Kontamination dienen, unnötig werden (siehe Kapitel 3.10.1; ISO 16140-3:2017). In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der Trocknungsversuche dargestellt.

### 4.2.1 Ergebnisse Laktose-Trocknung

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Trocknung von *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25932, *Staphylococcus epidermidis*

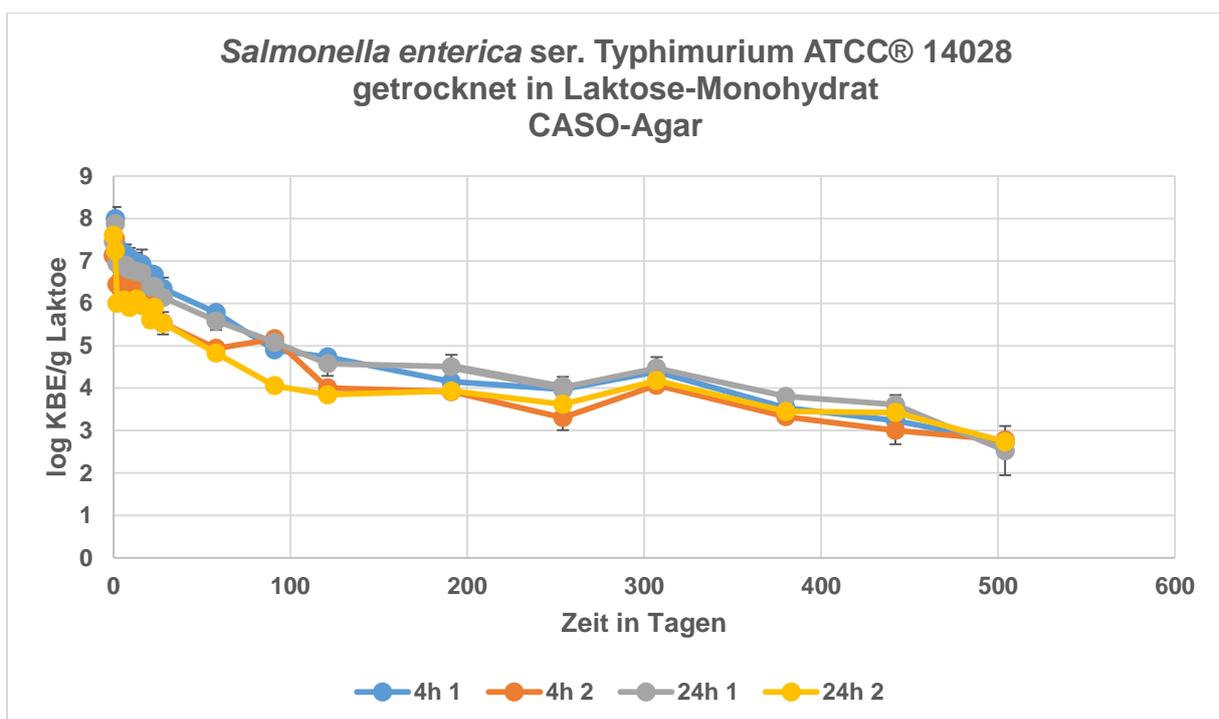
ATCC® 12228 und *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004 in Laktose-Monohydrat dargestellt. Zur Bestimmung der jeweiligen Schädigungsrate wurden die Bakterien auf einem nicht-selektiven Agar und einem für das jeweilige Bakterium passenden Selektivagar aufgetragen. Dabei konnten für einige Bakterien Unterschiede im Wachstum auf den beiden Agars festgestellt werden. Aus diesem Unterschied wurde die Schädigungsrate anhand der unter Punkt 2.3 angegebenen Formel bestimmt. Um die Abnahme der Keimzahl über die Zeit zu bestimmen, wurden die Keimzahlen nach der Trocknung mit der Keimzahl vor der Trocknung verglichen.

Für alle oben genannten Stämme wurden Daten zur Lagerung der getrockneten Proben bei Raumtemperatur auf Kieselgel generiert. Die Proben wurden dabei auf der Laborbank bei der jeweiligen Umgebungstemperatur gelagert. Es wurden in regelmäßigen Abständen 1 g Proben auf die Keimzahl sowie die Schädigungsrate untersucht. Aus den generierten Daten wurden die folgenden Graphen erstellt. Für alle getesteten Bakterien wurden mehrere Ansätze untersucht, welche zu unterschiedlichen Zeiten angesetzt und getrocknet wurden. Dabei wurde untersucht, inwieweit sich die Trocknung, sowie der Verlauf der Keimzahl nach der Trocknung und Lagerung der Bakterien repetieren lassen. In den folgenden Kapiteln werden einzelne Graphen repräsentativ für das jeweilige Bakterium gezeigt. Für das Bakterium *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 wurden zusätzlich Untersuchungen zur Lagerung bei 4°C und -20°C durchgeführt. Für dieses Bakterium wurden in der vorliegenden Arbeit die meisten Daten generiert.

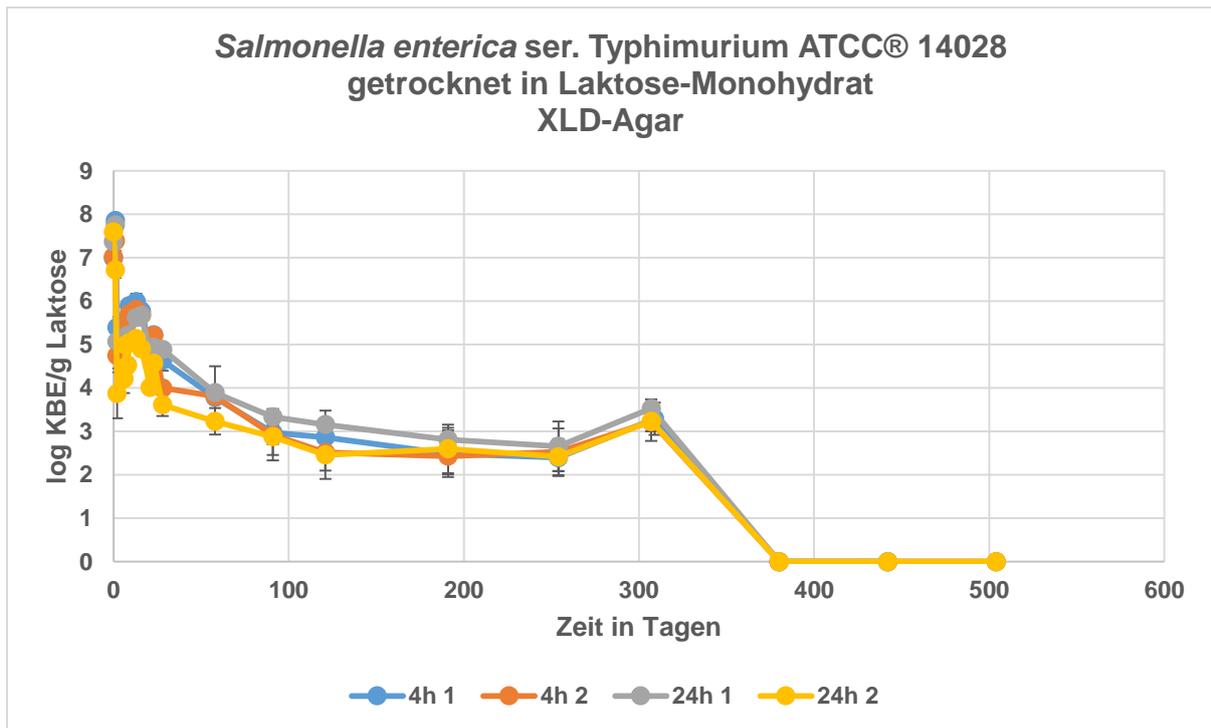
#### **4.2.1.1 *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 getrocknet in Laktose-Monohydrat**

In Abbildung 9 und 10 sind die Graphen für das Bakterium *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 zu sehen. Abgebildet sind sowohl die Keimzahl des Stammes vor dem Animpfen von Laktose-Monohydrat, sowie die Keimzahl nach der Trocknung und der Verlauf der Keimzahl nach der Lagerung bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von insgesamt 504 Tagen. Die bestimmten Keimzahlen auf CASO-Agar und XLD-Agar wurden in getrennte Graphen aufgetragen. Zu sehen sind jeweils vier parallel angesetzte Proben, welche in unterschiedlichen Gefäßen getrocknet und gelagert wurden. Ein weiterer Unterschied besteht in der Verwendung verschiedener Vorkulturen für das Animpfen der Proben. Es wurden zweimal Vorkulturen verwendet, welche vier Stunden im Brutschrank inkubiert wurden, um Zellen in der exponentiellen

Phase zu erhalten. Im Vergleich hierzu wurden zweimal Vorkulturen verwendet, welche über Nacht für etwa 24 h im Brutschrank inkubiert wurden, um Zellen in der stationären Phase zu erhalten. Untersucht werden sollte damit, ob, bei Verwendung von Vorkulturen in unterschiedlichen Wachstumsphasen, ein Unterschied für den Trocknungsvorgang und die nachfolgende Lagerung besteht. Betrachtet man sich die Kurven in Abbildung 9 und Abbildung 10, so lässt sich zwischen den einzelnen Ansätzen kein wesentlicher Unterschied im Verlauf der jeweiligen Kurven feststellen. Somit kann durch die durchgeführte Untersuchung festgestellt werden, dass für die Trocknung sowie die nachfolgende Lagerung kein Einfluss durch die Verwendung verschiedener Wachstumsstadien vorliegt. Für *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 kann bei der Trocknung ein typischer Kurvenverlauf auf CASO-Agar festgestellt werden, der sich auch bei Ansätzen, welche an unterschiedlichen Tagen erzeugt wurden, abzeichnet.



**Abbildung 9: *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 getrocknet in Laktose-Monohydrat für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel.** Verglichen werden je zwei 4 h Vorkulturen und zwei 24 h Vorkulturen, welche zur Animpfung von Laktose-Monohydrat verwendet wurden. Es wurde über einen Zeitraum von insgesamt 500 Tagen Proben á ein Gramm der getrockneten Bakterien untersucht und eine Keimzahlbestimmung auf CASO-Agar durchgeführt. Aufgetragen wurden die log KBE/g Laktose gegen die vergangene Zeitdauer in Tagen. Dargestellt werden die Mittelwerte, sowie die doppelte Standardabweichung für jeden Wert (n=8).



**Abbildung 10: *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 getrocknet in Laktose-Monohydrat für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel.** Verglichen werden je zwei 4 h Vorkulturen und zwei 24 h Vorkulturen, welche zur Animpfung von Laktose-Monohydrat verwendet wurden. Es wurde über einen Zeitraum von insgesamt 500 Tagen Proben á ein Gramm der getrockneten Bakterien untersucht und eine Keimzahlbestimmung auf XLD-Agar durchgeführt. Aufgetragen wurden die log KBE/g Laktose gegen die vergangene Zeitdauer in Tagen. Dargestellt werden die Mittelwerte, sowie die doppelte Standardabweichung für jeden Wert (n=8).

In Tabelle 27 wird die Abnahme der Keimzahl über den gesamten Zeitraum verdeutlicht. Dabei wurde die Abnahme der Keimzahl in zwei größere Phasen eingeteilt, welche auf den jeweiligen Graphen zu erkennen sind (siehe Abbildung 9 und 10). Nach der Trocknung kommt es innerhalb der ersten 90 bis 120 Tage zu einem signifikant stärkeren Abfall der Keimzahl von 2 – 4 log Stufen ( $p < 0,05$ , siehe Tabelle 27). Im Vergleich hierzu folgt nach etwa 90 bis 100 Tagen eine Stabilisierung der Keimzahl, in dessen Verlauf eine langsamere, aber signifikante Abnahme der Keimzahl im Zeitraum von 120 bis 500 Tagen erfolgt ( $p < 0,05$ ). In diesen insgesamt 383 Tagen verringert sich die Keimzahl um 1 – 2 log Stufen (siehe Tabelle 27). Auch für die Werte auf XLD-Agar zeigt sich ein ähnliches Bild mit einer stärkeren, signifikanten Abnahme der Keimzahl über einen Zeitraum von 91 Tagen von 4 – 5 log Stufen und einer nachfolgenden Stabilisierung mit einer langsameren Reduktion der Keimzahl im Zeitraum von 91 - 380 Tagen ( $p < 0,05$ ). Die Abnahme der Keimzahl in diesen 289 Tagen beträgt etwa 3 log Stufen (siehe Tabelle 27). Für alle getesteten

Proben wurden auf XLD-Agar nach der Trocknung weniger Bakterien nachgewiesen als auf CASO-Agar. Auch konnte bereits nach 380 Tagen mit den hier angewandten Methoden auf XLD-Agar kein Nachweis der Keime mehr erfolgen, während diese mit CASO-Agar noch etwa 120 Tage länger nachweisbar waren. Tabelle 28 zeigt die durch die Trocknung erreichte Schädigungsrate für den Stamm *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028. Angegeben sind die Mittelwerte der Schädigungsraten aller Einzelmessungen über den gesamten Zeitraum von 504 Tagen (ausgenommen die Vorkultur). Die Schädigungsraten liegen dabei zwischen 91 – 97%.

**Tabelle 27: Veränderung der Keimzahl für die in Laktose getrockneten Proben von *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028.** Angegeben ist die Abnahme der Keimzahl in bestimmten Zeitintervallen für CASO- und XLD-Agar in log KBE/g Laktose.

<b>CASO-Agar</b>			
<b>Probe</b>	<b>Keimzahl Vorkultur in log KBE/g Laktose</b>	<b>Tage</b>	<b>Abnahme Keimzahl in log KBE</b>
<b>4h 1</b>	7,1	0-121	2,4
		121-504	2,2
<b>4h 2</b>	7,1	0-121	3,1
		121-504	1,20
<b>24 h 1</b>	7,5	0-121	2,9
		121-442	1
<b>24h 2</b>	7,6	0-91	3,6
		91-504	1,3
<b>XLD-Agar</b>			
<b>Probe</b>	<b>Keimzahl Vorkultur in log KBE/g Laktose</b>	<b>Tage</b>	<b>Abnahme Keimzahl in log KBE</b>
<b>4h 1</b>	7	0-91	4
		91-380	3
<b>4h 2</b>	7	0-91	4,1
		91-380	2,90
<b>24 h 1</b>	7,3	0-91	4
		91-380	3,3
<b>24h 2</b>	7,6	0-91	4,7
		91-380	2,9

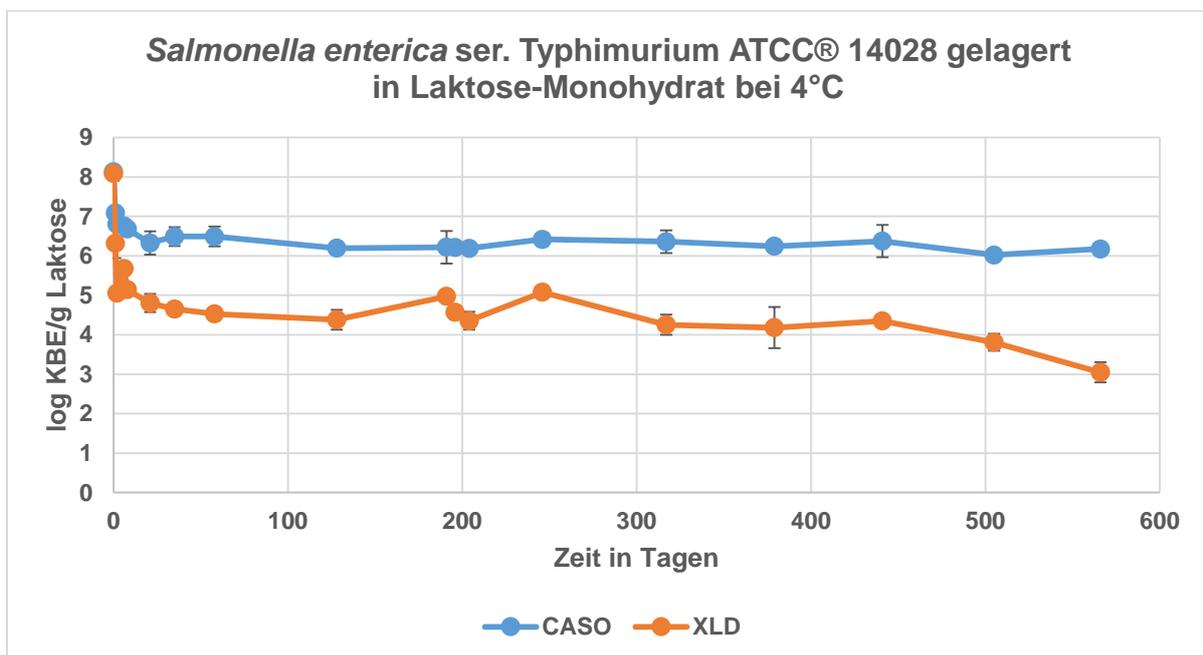
**Tabelle 28: Schädigungsrate für *Salmonella Typhimurium* ATCC® 14028 getrocknet in Laktose-Monohydrat für 24 h bei 41°C.** Die Berechnung erfolgte anhand der Formel in Punkt 2.3.

<b>Probe</b>	<b>Mittelwert der Schädigungsrate in % (n=19)</b>	<b>Standardabweichung in %</b>
4h 1	94,7	8,7
4h 2	91,4	8,8
24 h 1	97,9	3,0
24 h 2	94,9	5,0

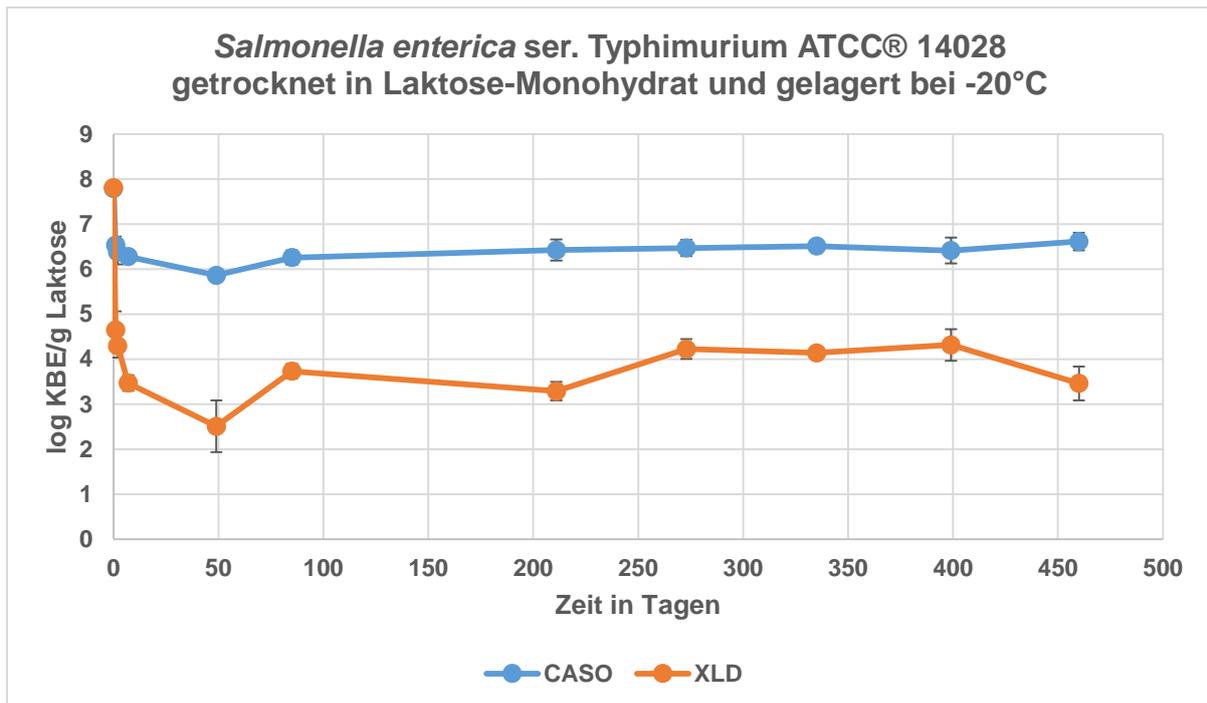
#### 4.2.1.2 Lagerung getrockneter Laktose-Proben von *Salmonella Typhimurium* ATCC® 14028 bei 4°C und -20°C

Für das Bakterium *Salmonella Typhimurium* ATCC® 14028 wurden zusätzlich Versuche zur Lagerung bei 4°C und -20°C durchgeführt. Hierfür wurden die getrockneten Proben direkt nach der Trocknung in geschlossenen Gefäßen mit Kieselgel bei 4°C bzw. -20°C gelagert. In gewissen Zeitabständen wurden ein Gramm Proben auf die Veränderung der Keimzahl hin untersucht. Aus den Werten der untersuchten Proben wurden die Graphen in Abbildung 11 und 12 generiert. Im Vergleich zu den zuvor beschriebenen getrockneten Laktoseproben von *Salmonella Typhimurium* ATCC® 14028, welche bei Raumtemperatur gelagert wurden, lässt sich ein deutlicher Unterschied im Verlauf der Kurve erkennen. Sowohl für die Kühlschrankprobe (4°C) als auch für die Gefrierschrankprobe (-20°C) zeigt sich eine deutlich stabilere Keimzahl für die Dauer von 566 bzw. 460 Tagen Lagerung. In den ersten 7 – 21 Tagen kann für die Kühlschrankprobe eine stärkere Verringerung der Keimzahl auf CASO-Agar beobachtet werden (siehe Tabelle 29). In den ersten 21 Tagen sinkt die Keimzahl der Kühlschrankprobe signifikant um 1,5 für ab ( $p < 0,05$ ). Für die Gefrierschrankprobe kann auf CASO-Agar in den ersten 7 Tagen ein signifikanter Abfall der Keimzahl um 1,5 log Stufen beobachtet werden ( $p < 0,05$ ). Auf XLD-Agar kommt es bei der Kühlschrankprobe in den ersten 35 Tagen zu einer signifikanten Abnahme der Keimzahl um 3,4 log Stufen ( $p < 0,05$ ). Bei der Gefrierschrankprobe beträgt die signifikante Abnahme der Keimzahl auf XLD-Agar in den ersten 7 Tagen 4,3 log Stufen ( $p < 0,05$ ). Danach kommt es zu einer Stabilisierung der Keimzahlen auf beiden Agar-Medien in deren Verlauf die Keimzahlen stabil zu sein scheinen (siehe Tabelle 30). Allerdings weisen die Keimzahlen, welche an den unterschiedlichen Messtagen beobachtet wurden, Schwankungen auf (siehe Tabelle

29 und 30). Diese konnten insgesamt für alle Trocknungsversuche festgestellt werden. Aufgrund der Schwankungen der Keimzahlen an den verschiedenen Tagen handelt es sich hierbei laut ANOVA-Varianzanalyse um einen signifikanten Unterschied der jeweiligen Keimzahlen an den verschiedenen Messtagen untereinander ( $p < 0,05$ ). Da die Werte Schwankungen durch Pipettierfehler, verwendeten Medien-Chargen und auch Homogenität der Proben unterworfen sind, kann es hierbei auch zu Abweichungen bei der Bestimmung der Keimzahlen an unterschiedlichen Messtagen kommen (Jennison & Wadsworth 1940; Nagel & Kunz 1973). Die hierzu durchgeführte Untersuchung ist in Punkt 7.2 aufgeführt. Insgesamt lässt sich jedoch die Aussage treffen, dass die Keimzahl getrockneter Proben des Stammes *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028, welche bei 4°C bzw. -20°C gelagert wurden, deutlich stabiler als bei Raumtemperatur gelagerte Proben desselben Stammes sind. Die Schädigungsrate der Kühlschrankprobe liegt gemittelt für alle bestimmten Schädigungsraten ab Tag 2 bei 96,7 %. Für die Gefrierschrankprobe liegt die Schädigungsrate im Mittel bei 99,5%.



**Abbildung 11: *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 getrocknet in Laktose-Monohydrat für 24 h bei 41°C und gelagert bei 4°C mit Kieselgel.** Es wurde über einen Zeitraum von insgesamt 566 Tagen Proben á ein Gramm der getrockneten Bakterien untersucht und eine Keimzahlbestimmung auf CASO- und XLD-Agar durchgeführt. Aufgetragen wurden die log KBE/g Laktose gegen die vergangene Zeitdauer in Tagen. Dargestellt werden die Mittelwerte, sowie die doppelte Standardabweichung für jeden Wert (n=8).



**Abbildung 12: *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 getrocknet in Laktose-Monohydrat für 24 h bei 41°C und gelagert bei -20°C mit Kieselgel.** Es wurde über einen Zeitraum von insgesamt 460 Tagen Proben á ein Gramm der getrockneten Bakterien untersucht und eine Keimzahlbestimmung auf CASO- und XLD-Agar durchgeführt. Aufgetragen wurden die log KBE/g Laktose gegen die vergangene Zeitdauer in Tagen. Dargestellt werden die Mittelwerte, sowie die doppelte Standardabweichung für jeden Wert (n=8).

**Tabelle 29: Keimzahlen der Kühlschranksprobe von *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 getrocknet in Laktose-Monohydrat und gelagert bei 4°C über einen Zeitraum von 460 Tagen.** Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte der Keimzahlen zusammen mit der Standardabweichung (n=8) für die Nährmedien CASO- und XLD-Agar.

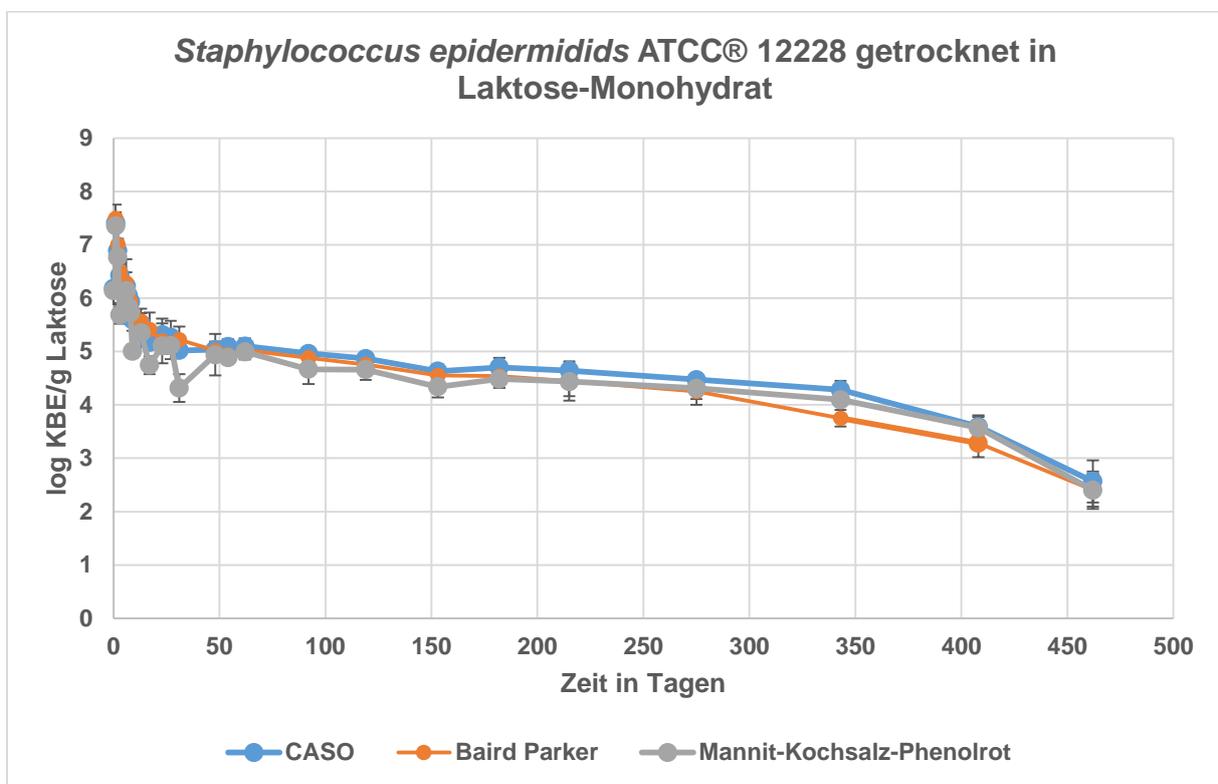
<b>Tage</b>	<b>CASO [log KBE/g Laktose]</b>	<b>XLD [log KBE/g Laktose]</b>
<b>0</b>	8,1 ± 0,08	8,1 ± 0,10
<b>1</b>	7,1 ± 0,05	6,3 ± 0,19
<b>2</b>	6,8 ± 0,08	5,1 ± 0,06
<b>6</b>	6,8 ± 0,04	5,7 ± 0,08
<b>8</b>	6,7 ± 0,07	5,1 ± 0,05
<b>21</b>	6,3 ± 0,15	4,8 ± 0,12
<b>35</b>	6,5 ± 0,12	4,7 ± 0,07
<b>58</b>	6,5 ± 0,13	4,5 ± 0,08
<b>128</b>	6,2 ± 0,04	4,4 ± 0,13
<b>191</b>	6,2 ± 0,20	4,9 ± 0,05
<b>196</b>	6,2 ± 0,04	4,6 ± 0,09
<b>204</b>	6,2 ± 0,03	4,4 ± 0,11
<b>246</b>	6,4 ± 0,08	5,1 ± 0,04
<b>317</b>	6,4 ± 0,14	4,3 ± 0,13
<b>379</b>	6,2 ± 0,08	4,2 ± 0,26
<b>441</b>	6,4 ± 0,21	4,3 ± 0,07
<b>505</b>	6 ± 0,02	3,8 ± 0,11
<b>566</b>	6,2 ± 0,05	3 ± 0,13

**Tabelle 30: Keimzahlen der Gefrierschranksprobe von *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 getrocknet in Laktose-Monohydrat und gelagert bei -20°C über einen Zeitraum von 460 Tagen.** Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte der Keimzahlen zusammen mit der Standardabweichung (n=8) für die Nährmedien CASO- und XLD-Agar.

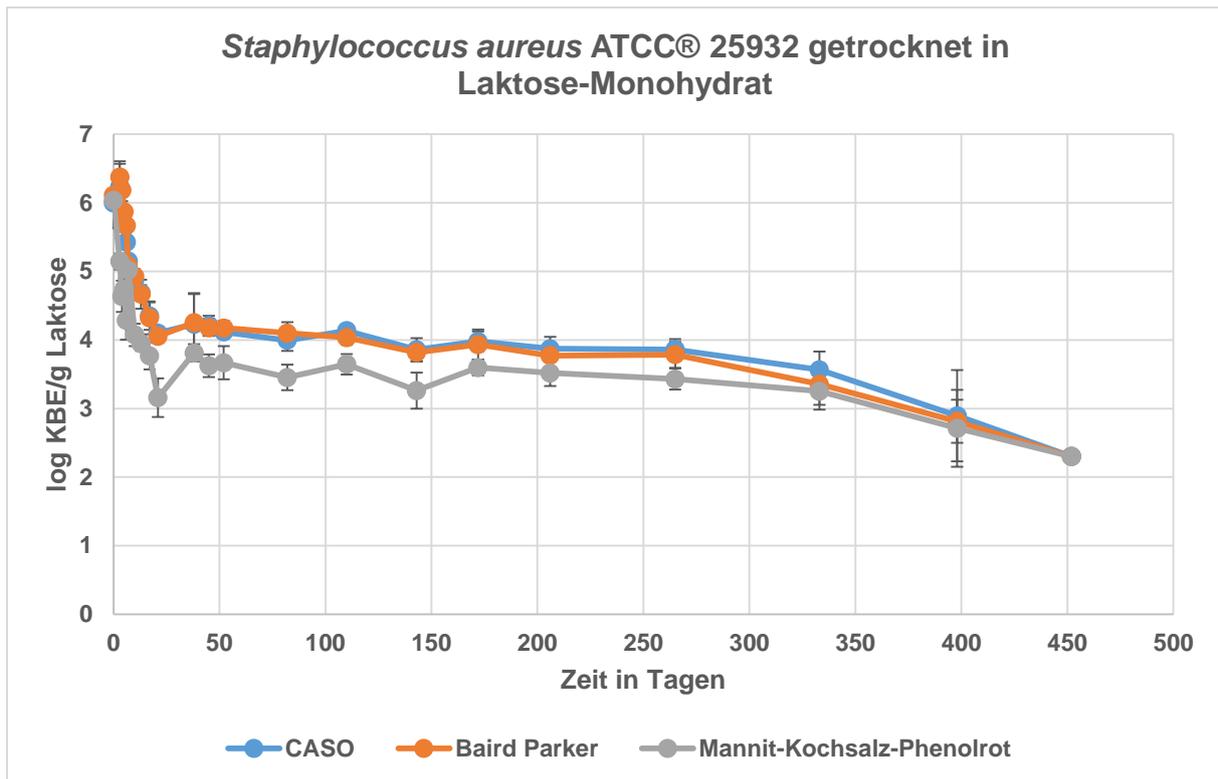
<b>Tage</b>	<b>CASO [log KBE/g Laktose]</b>	<b>XLD [log KBE/g Laktose]</b>
<b>0</b>	7,8 ± 0,04	7,8 ± 0,05
<b>1</b>	6,5 ± 0,09	4,6 ± 0,2
<b>2</b>	6,4 ± 0,14	4,3 ± 0,13
<b>7</b>	6,3 ± 0,07	3,5 ± 0,09
<b>49</b>	5,9 ± 0,05	2,5 ± 0,29
<b>85</b>	6,3 ± 0,08	3,7 ± 0,08
<b>211</b>	6,4 ± 0,11	3,3 ± 0,10
<b>273</b>	6,5 ± 0,09	4,2 ± 0,10
<b>335</b>	6,5 ± 0,07	4,1 ± 0,05
<b>399</b>	6,4 ± 0,14	4,3 ± 0,18
<b>460</b>	6,6 ± 0,09	3,5 ± 0,19

#### 4.2.1.3 *Staphylococcus aureus* ATCC® 25932 und *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228 getrocknet in Laktose-Monohydrat

Die beiden Stämme *Staphylococcus aureus* ATCC® 25932 und *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228 wurden ebenfalls in Laktose-Monohydrat getrocknet und über einen Zeitraum von 462 bzw. 452 Tage bei Raumtemperatur gelagert. In Abbildung 13 ist die Keimzahlentwicklung des Stammes *Staphylococcus aureus* ATCC® 25932 gezeigt, in Abbildung 14 die Keimzahlentwicklung des Stammes *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228. Die Keimzahlen beider Stämme wurden auf CASO-Agars als nicht-selektives Nährmedium, sowie auf den beiden Selektiv-Nährmedien Baird-Parker-Agar und Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar untersucht.



**Abbildung 13: *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228 getrocknet in Laktose-Monohydrat für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel.** Es wurde über einen Zeitraum von insgesamt 462 Tagen Proben á ein Gramm der getrockneten Bakterien untersucht und eine Keimzahlbestimmung auf CASO-Agar, Baird-Parker-Agar und Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar durchgeführt. Aufgetragen wurden die log KBE/g Laktose gegen die vergangene Zeitdauer in Tagen. Dargestellt werden die Mittelwerte, sowie die doppelte Standardabweichung für jeden Wert (n=8).



**Abbildung 14: *Staphylococcus aureus* ATCC® 25932 getrocknet in Laktose-Monohydrat für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel.** Es wurde über einen Zeitraum von insgesamt 452 Tagen Proben á ein Gramm der getrockneten Bakterien untersucht und eine Keimzahlbestimmung auf CASO-Agar, Baird-Parker-Agar und Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar durchgeführt. Aufgetragen wurden die log KBE/g Laktose gegen die vergangene Zeitdauer in Tagen. Dargestellt werden die Mittelwerte, sowie die doppelte Standardabweichung für jeden Wert (n=8).

Sowohl für *Staphylococcus aureus* als auch für *Staphylococcus epidermidis* zeigt sich ein ähnlicher Kurvenverlauf in den beiden Graphen der Abbildungen 13 und 14. So kommt es für beide Stämme nach der Trocknung zunächst zu einer stärkeren Abnahme der Keimzahl für etwa 31 bzw. 38 Tage. In dieser initialen Phase verringert sich die Keimzahl signifikant um 1 bis 2 log Stufen ( $p < 0,05$ , siehe Tabelle 31). Nach dieser initialen Phase stabilisiert sich die Keimzahl für etwa 300 bis 312 Tage. In dieser Periode sinkt die Keimzahl langsam weiter signifikant ab, zwischen 0,6 und 1,5 log Stufen ( $p < 0,05$ ). Nach insgesamt 330 bis 340 Tagen kommt es über einen Zeitraum von etwa 120 Tagen zu einer signifikanten Abnahme der Keimzahl zwischen 1 bis 1,7 log Stufen ( $p < 0,05$ ). Innerhalb des Graphen macht sich dieser Abfall der Keimzahl durch einen deutlichen Abwärtstrend der Kurve bemerkbar. Im Vergleich zum Stamm *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 kann die Schädigungsrate weniger leicht ermittelt werden. Beide *Staphylococcus*-Stämme zeigen auch auf den Selektiv-Nährmedien eine sehr hohe Keimzahl, welche in manchen Fällen über der ermittelten

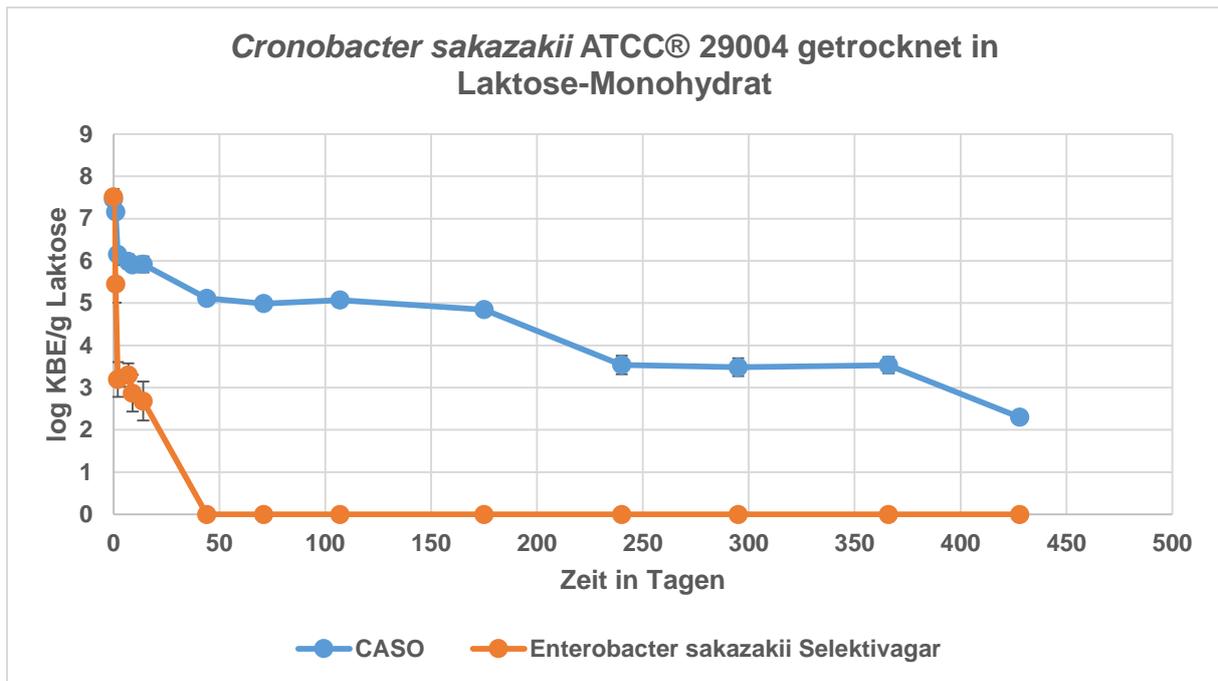
Keimzahl auf CASO-Agar liegt. Aufgrund der hohen Schwankungen über die Zeit kann kein zuverlässiger Mittelwert für die Schädigungsrate über den gesamten Zeitraum gebildet werden. Vor allem auf Baird Parker-Agar scheint das Wachstum der getrockneten Bakterien an manchen Versuchstagen besser zu sein, als auf CASO-Agar. Dies kann auf das Vorhandensein von Pyruvat im Medium zurückgeführt werden, welches nachweislich einen positiven Einfluss auf die Nachweisrate von gestressten Bakterien hat (Baird-Parker 1965; Czechowitz et al. 1996). Für den Stamm *Staphylococcus epidermidis* lassen sich auf Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar über den gesamten Untersuchungszeitraum Schädigungsraten zwischen 20 – 80% feststellen. Im Vergleich hierzu liegen die Schädigungsraten für *Staphylococcus aureus* auf Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar zwischen 36 – 92%.

Tabelle 31: Veränderung der Keimzahl für die in Laktose getrockneten Proben von *Staphylococcus aureus* ATCC® 25932 und *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228, gelagert bei Raumtemperatur. Angegeben ist die Abnahme der Keimzahl in bestimmten Zeitintervallen für CASO-Agar, Baird-Parker-Agar und Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar in log KBE/g Laktose.

<b>CASO-Agar</b>			
<b>Probe</b>	<b>Keimzahl Vorkultur in log KBE/g Laktose</b>	<b>Tage</b>	<b>Abnahme Keimzahl in log KBE</b>
<b><i>S. aureus</i></b>	6	0 - 38	1,8
		38 - 333	0,7
		333 -452	1,3
<b><i>S. epidermidis</i></b>	6,2	0 - 31	1,2
		31 - 343	0,7
		343 - 462	1,70
<b>Baird Parker-Agar</b>			
<b>Probe</b>	<b>Keimzahl Vorkultur in log KBE/g Laktose</b>	<b>Tage</b>	<b>Abnahme Keimzahl in log KBE</b>
<b><i>S. aureus</i></b>	6,1	0 - 38	1,9
		38 - 333	0,9
		333 -452	1
<b><i>S. epidermidis</i></b>	6,1	0 - 31	0,9
		31 - 343	1,5
		343 - 462	1,30
<b>Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar</b>			
<b>Probe</b>	<b>Keimzahl Vorkultur in log KBE/g Laktose</b>	<b>Tage</b>	<b>Abnahme Keimzahl in log KBE</b>
<b><i>S. aureus</i></b>	6	0 - 38	2,2
		38 - 333	0,6
		333 -452	1
<b><i>S. epidermidis</i></b>	6,1	0 - 48	1,2
		48 - 343	0,8
		343 - 462	1,70

#### 4.2.1.4 *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004 getrocknet in Laktose-Monohydrat

Der letzte in Laktose-Monohydrat getrocknete Stamm ist *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004. In Abbildung 15 ist die Entwicklung der Keimzahl des Stammes, ermittelt auf zwei unterschiedlichen Agars, über einen Zeitraum von insgesamt 428 Tagen zu sehen. Auffallend ist, dass für diesen Stamm die Keimzahl auf Enterobacter sakazakii Selektivagar (ESSA) bereits nach 44 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur mit den in dieser Arbeit angewandten Methoden nicht mehr nachweisbar ist. Auf CASO-Agar kann der Nachweis dagegen für insgesamt 428 Tage erfolgen. Dabei zeichnet sich der Stamm dadurch aus, dass es mehrere Phasen gibt, in denen die Keimzahl stärker absinkt und sich im Anschluss über eine längere Zeitdauer stabilisiert und konstant bleibt. So nimmt die Keimzahl in den ersten 44 Tagen signifikant um 2,4 log Stufen ab und bleibt dann zwischen Tag 44 und Tag 175 annähernd konstant mit einer signifikanten Abnahme von etwa 0,3 log Stufen ( $p < 0,05$ ). Nach 175 Tagen kommt es zu einer weiteren stärkeren, signifikanten Abnahme der Keimzahl um 1,3 log Stufen und einer anschließenden Stabilisierung nach 240 Tagen ( $p < 0,05$ ). Im Zeitraum zwischen 240 und 366 Tagen nimmt die Keimzahl nicht signifikant ab ( $p > 0,05$ ), bevor sie ab Tag 366 nochmal signifikant um 1,2 log Stufen abfällt ( $p < 0,05$ ). Die Phasen der Keimzahlstabilität dauern insgesamt immer etwa 130 Tage an bevor es zu einem deutlicheren Abfall der Keimzahl kommt (siehe Tabelle 32). Die Schädigungsrate liegt für den Stamm *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004 bereits direkt nach der Trocknung bei 100%.



**Abbildung 15: *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004 getrocknet in Laktose-Monohydrat für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel.** Es wurde über einen Zeitraum von insgesamt 428 Tagen Proben á ein Gramm der getrockneten Bakterien untersucht und eine Keimzahlbestimmung auf CASO-Agar und Enterobacter sakazakii Selektivagar (ESSA) durchgeführt. Aufgetragen wurden die log KBE/g Laktose gegen die vergangene Zeitdauer in Tagen. Dargestellt werden die Mittelwerte, sowie die doppelte Standardabweichung für jeden Wert (n=8).

**Tabelle 32: Veränderung der Keimzahl für die in Laktose getrockneten Proben von *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004, gelagert bei Raumtemperatur.** Angegeben ist die Abnahme der Keimzahl in bestimmten Zeitintervallen für CASO-Agar in log KBE.

CASO-Agar			
Probe	Keimzahl Vorkultur in log KBE/g Laktose	Tage	Abnahme Keimzahl in log KBE
<i>C. sakazakii</i>	7,5	0 - 44	2,4
		44 - 175	0,3
		175 - 240	1,3
		240 - 366	0,01
		366 - 428	1,2

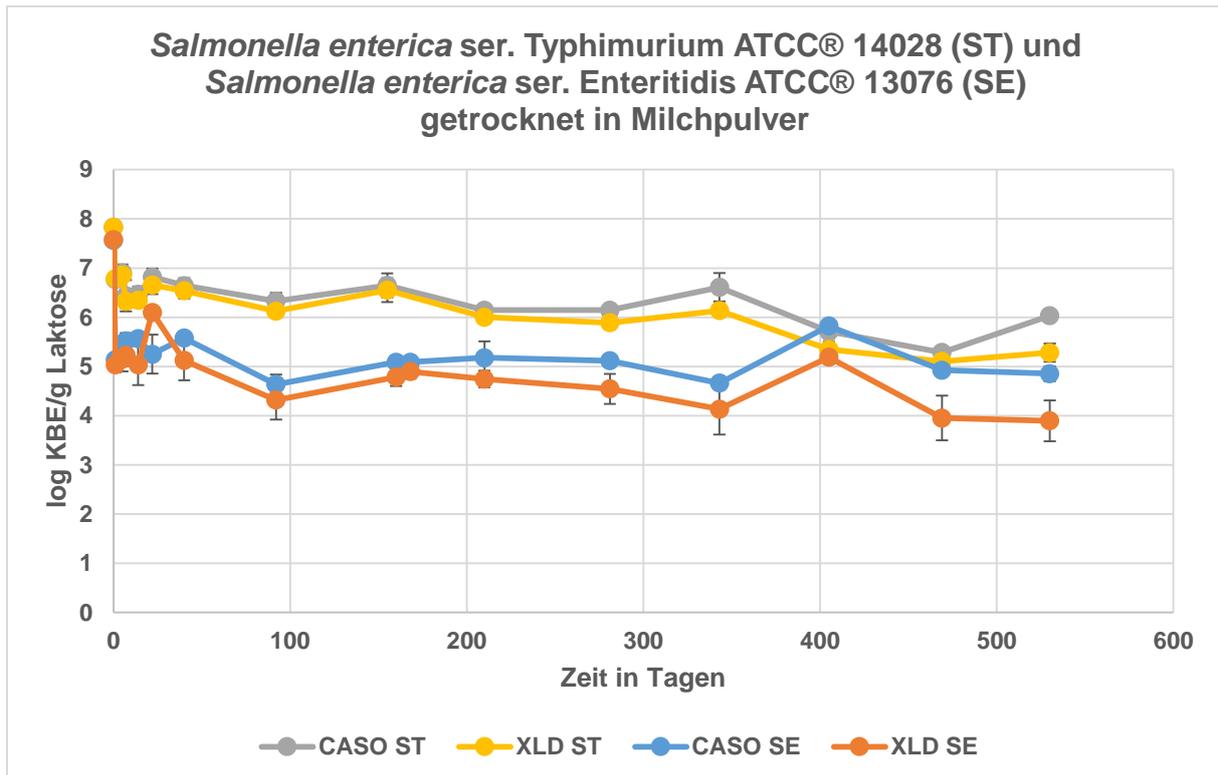
## 4.2.2 Trocknung in Milchpulver

Für die Trocknung verschiedener Bakterien in Milchpulver wurde „Nestlé Beba Pro Kindermilch ab dem 12. Monat“ verwendet. Die Trocknung in Milchpulver wurde durchgeführt, da einige untersuchte Bakterien nicht in Laktose-Monohydrat getrocknet werden konnten. Hierzu gehören die Stämme *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111, *Escherichia coli* ATCC® 700728 und *Salmonella* Enteritidis ATCC® 13076. Diese Bakterien konnten direkt nach der Trocknung in Laktose-Monohydrat mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden weder auf Selektiv- noch auf Nicht-Selektivagar nachgewiesen werden. Um ein alternatives Medium für die Trocknung zu haben, wurde für weitere Versuche Milchpulver eingesetzt. Milchpulver wurde verwendet, da es sich hierbei um ein trockenes Lebensmittel handelt, welches ebenfalls auf bestimmte Bakterien hin getestet werden muss. Getestet wird dabei unter anderem auf *Enterobacteriaceae*, Staphylokokken, Salmonellen, *Listeria monocytogenes* und auch *Cronobacter sakazakii* (Europäische Gemeinschaft 2005). In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse für die Trocknung in Milchpulver dargestellt.

### 4.2.2.1 Milchpulver-Trocknung *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 und *Salmonella* Enteritidis ATCC® 13076

Bei dem Stamm *Salmonella* Enteritidis ATCC® 13076 handelt es sich um einen der untersuchten Stämme, welche bei Trocknung in Laktose-Monohydrat direkt nach der Trocknung nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Aus diesem Grund wurde dieser Stamm stattdessen in Milchpulver getrocknet. Vergleichend hierzu wurde auch der Stamm *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 untersucht. In Abbildung 16 werden die Graphen beider Stämme in einem Diagramm gezeigt. Dabei fällt auf, dass für beide Stämme kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Graphen zu erkennen ist. Nach einem initialen Absinken der Keimzahl nach der Trocknung kommt es sehr schnell zu einer Stabilisierung, sodass die Keimzahl für die restliche Dauer der Lagerung relativ konstant bleibt (siehe Tabelle 33). Die Keimzahl von *Salmonella* Enteritidis fällt initial um etwa 2,4 log Stufen signifikant ab, bei *Salmonella* Typhimurium um etwa 1 log Stufe ( $p < 0,05$ ). Über den restlichen Zeitraum von etwa 530 Tagen ist die Keimzahl von *Salmonella* Enteritidis auf CASO-Agar signifikant um 0,3 log Stufen geringer als an Tag 1 und auf XLD-Agar um 1,1 log Stufen ( $p < 0,05$ ). Für *Salmonella* Typhimurium kann ein signifikante Abfall der Keimzahl auf CASO-Agar innerhalb von

530 Tagen von 0,7 log Stufen und auf XLD-Agar von 1,5 log Stufen beobachtet werden ( $p < 0,05$ ). Für beide Stämme zeigen sich für die gesamte Zeitdauer einige Messwerte, welche deutlich höher oder niedriger liegen, als der zuvor ermittelte Wert für die Keimzahl. In Bezug auf die Schädigungsrate kann für beide Stämme keine klare Aussage getroffen werden. Die Schädigungsrate für *Salmonella* Typhimurium bewegt sich je nach Messtag zwischen 11 – 81% und für *Salmonella* Enteritidis zwischen 20 – 100%.



**Abbildung 16:** *Salmonella* Enteritidis ATCC® 13076 (SE) und *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 (ST) getrocknet in Nestlé Beba Kindermilch für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel. Es wurde über einen Zeitraum von insgesamt 530 Tagen Proben á ein Gramm der getrockneten Bakterien untersucht und eine Keimzahlbestimmung auf CASO- und XLD-Agar durchgeführt. Aufgetragen wurden die log KBE/g Milchpulver gegen die vergangene Zeitdauer in Tagen. Dargestellt werden die Mittelwerte, sowie die doppelte Standardabweichung für jeden Wert (n=8).

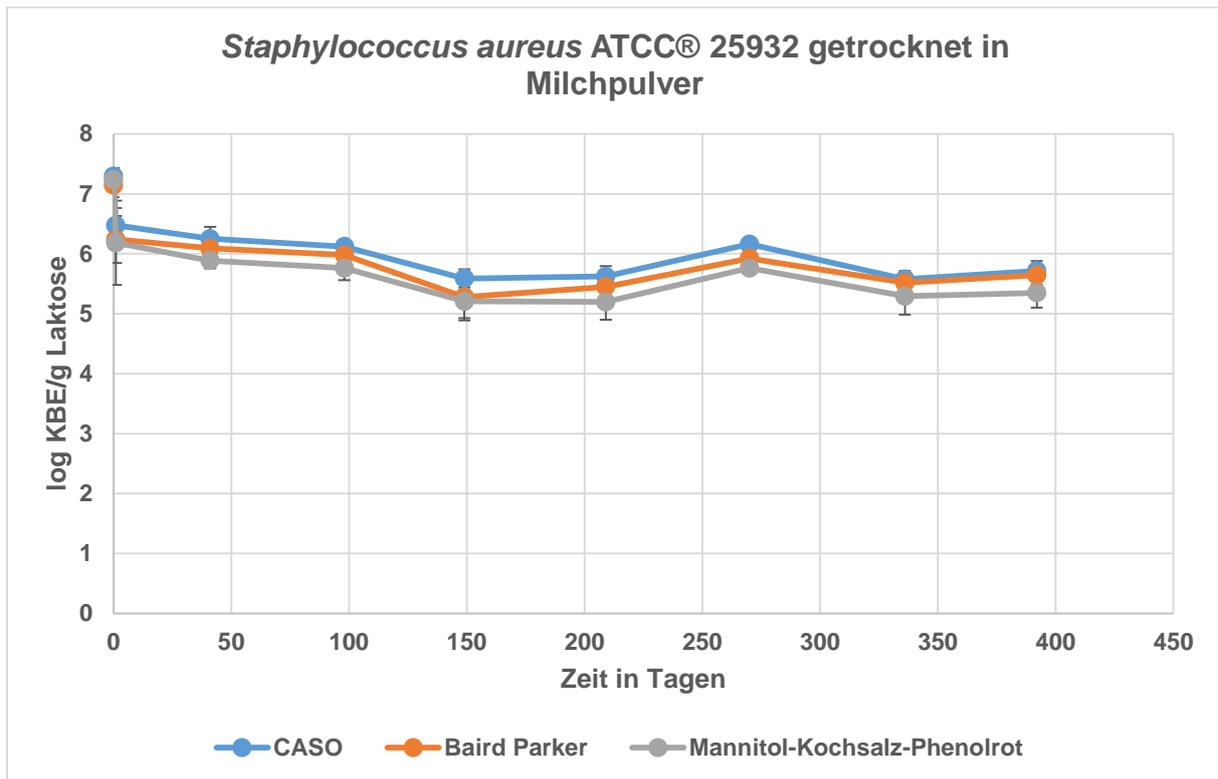
**Tabelle 33: Veränderung der Keimzahl für die in Nestlé Beba Kindermilch getrockneten Proben von *Salmonella* Enteritidis ATCC® 13076 und *Salmonella* Typhimurium ATCC®14028, gelagert bei Raumtemperatur.** Angegeben ist die Abnahme der Keimzahl in bestimmten Zeitintervallen für CASO und XLD-Agar in log KBE.

<b>CASO-Agar</b>			
<b>Probe</b>	<b>Keimzahl Vorkultur in log KBE/g Milchpulver</b>	<b>Tage</b>	<b>Abnahme Keimzahl in log KBE</b>
<b>S. Enteritidis</b>	7,6	0 - 1	2,4
		1 - 530	0,3
<b>S. Typhimurium</b>	7,8	0 - 1	1
		1 - 530	0,7
<b>XLD-Agar</b>			
<b>Probe</b>	<b>Keimzahl Vorkultur in log KBE/g Milchpulver</b>	<b>Tage</b>	<b>Abnahme Keimzahl in log KBE</b>
<b>S. Enteritidis</b>	7,6	0 - 1	2,5
		1 - 530	1,1
<b>S. Typhimurium</b>	7,8	0 - 1	1
		1 - 530	1,5

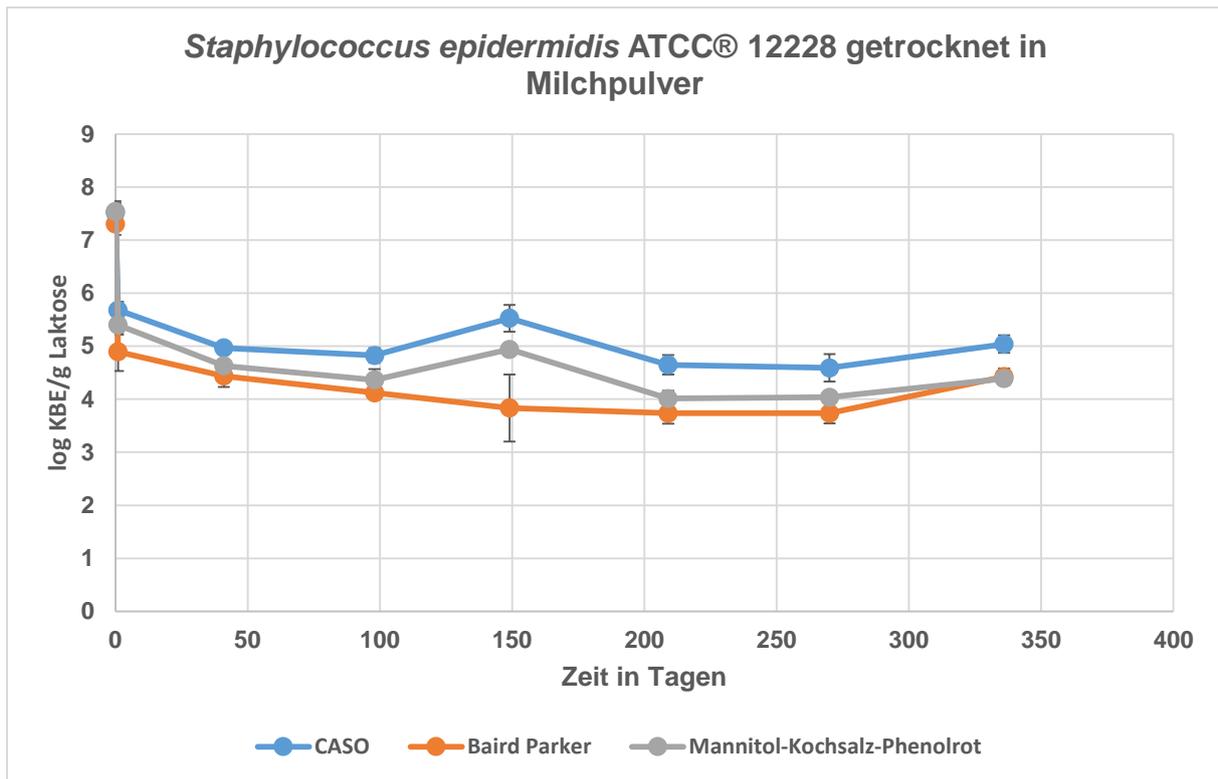
#### 4.2.2.2 Milchpulver-Trocknung *Staphylococcus aureus* ATCC® 25932 und *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228

Auch die beiden Bakterien *Staphylococcus aureus* ATCC® 25932 und *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228 wurden vergleichend zur Trocknung in Laktose-Monohydrat in Milchpulver getrocknet. Die jeweiligen Graphen sind in den Abbildungen 17 und 18 zu finden. Wie auch für die *Salmonella*-Proben in 4.2.1 kann nach einer initialen Absterbephase eine Stabilisierung der Keimzahl beobachtet werden. Die signifikante Reduktion der Keimzahl direkt nach der Trocknung liegt je nach Nährmedium bei 0,8 – 0,9 log Stufen für *Staphylococcus aureus* und zwischen 1,8 – 2,4 log Stufen für *Staphylococcus epidermidis* ( $p < 0,05$ , siehe Tabelle 35). Zwischen Tag 1 und Tag 336 bzw. 392 kann ein signifikanter Abfall der Keimzahl von 0,6 bis 1 log Stufe beobachtet werden ( $p < 0,05$ ). Für das Bakterium *Staphylococcus aureus* ATCC® 25932 zeigt sich in Abbildung 1, dass die auf Baird-Parker bestimmten Keimzahlen deutlich über den Keimzahlen liegen, welche auf CASO-Agar ermittelt wurden. Die Schädigungsraten liegen für *Staphylococcus aureus* auf Baird Parker-Agar zwischen 15 – 50% und auf Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar zwischen 23 – 60%.

Für *Staphylococcus epidermidis* liegen die Schädigungsraten auf Baird Parker-Agar zwischen 70 – 98% und auf Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar zwischen 53 – 77%. Auch für diese beiden Stämme zeigen die Graphen Abweichungen der Keimzahlen zwischen den unterschiedlichen Messpunkten. Einige Messpunkte liegen deutlich über oder unter dem Messpunkt der am vorherigen oder nachfolgenden Messtag ermittelten Werte (siehe Punkt 7.2.).



**Abbildung 17: *Staphylococcus aureus* ATCC® 25932 getrocknet in Nestlé Beba Kindermilch für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel.** Es wurde über einen Zeitraum von insgesamt 392 Tagen Proben á ein Gramm der getrockneten Bakterien untersucht und eine Keimzahlbestimmung auf CASO-Agar, Baird-Parker-Agar und Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar durchgeführt. Aufgetragen wurden die log KBE/g Milchpulver gegen die vergangene Zeitdauer in Tagen. Dargestellt werden die Mittelwerte, sowie die doppelte Standardabweichung für jeden Wert (n=8).



**Abbildung 18: *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228 getrocknet in Nestlé Beba Kindermilch für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel.** Es wurde über einen Zeitraum von insgesamt 336 Tagen Proben á ein Gramm der getrockneten Bakterien untersucht und eine Keimzahlbestimmung auf CASO-Agar, Baird-Parker-Agar und Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar durchgeführt. Aufgetragen wurden die log KBE/g Milchpulver gegen die vergangene Zeitdauer in Tagen. Dargestellt werden die Mittelwerte, sowie die doppelte Standardabweichung für jeden Wert (n=8).

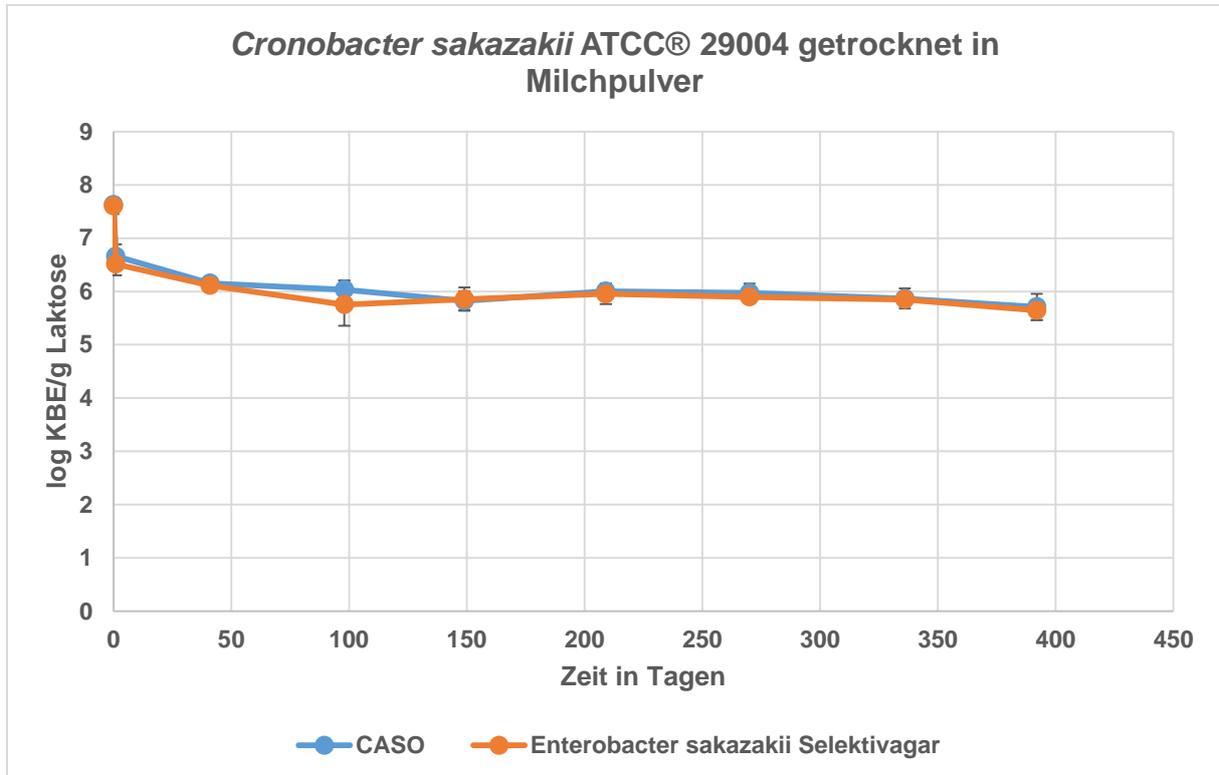
**Tabelle 34: Veränderung der Keimzahl für die in Nestlé Beba Kindermilch getrockneten Proben von *Staphylococcus aureus* ATCC® 25932 und *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228, gelagert bei Raumtemperatur.** Angegeben ist die Abnahme der Keimzahl in bestimmten Zeitintervallen für CASO-Agar, Baird Parker-Agar und Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar in log KBE.

<b>CASO-Agar</b>			
<b>Probe</b>	<b>Keimzahl Vorkultur in log KBE/g Milchpulver</b>	<b>Tage</b>	<b>Abnahme Keimzahl in log KBE</b>
<b><i>S. aureus</i></b>	7,2	0 - 1	0,8
		1 - 392	0,8
<b><i>S. epidermidis</i></b>	7,5	0 - 1	1,8
		1 - 336	0,6
<b>Baird Parker-Agar</b>			
<b>Probe</b>	<b>Keimzahl Vorkultur in log KBE/g Milchpulver</b>	<b>Tage</b>	<b>Abnahme Keimzahl in log KBE</b>
<b><i>S. aureus</i></b>	7,1	0 - 1	0,9
		1 - 392	0,6
<b><i>S. epidermidis</i></b>	7,3	0 - 1	2,4
		1 - 336	0,5
<b>Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar</b>			
<b>Probe</b>	<b>Keimzahl Vorkultur in log KBE/g Milchpulver</b>	<b>Tage</b>	<b>Abnahme Keimzahl in log KBE</b>
<b><i>S. aureus</i></b>	7,2	0 - 1	1
		1 - 392	0,8
<b><i>S. epidermidis</i></b>	7,5	0 - 1	2,1
		1 - 336	1

#### 4.2.2.3 Milchpulver-Trocknung *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004

Die Ergebnisse für die Trocknung in Milchpulver für das Bakterium *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004 sind in Abbildung 19 und Tabelle 35 gezeigt. Dabei wird auch für dieses Bakterium deutlich, dass nach einer signifikanten initialen Abnahme der Keimzahl von 1 log Stufe, eine Stabilisierung der Keimzahl eintritt ( $p < 0,05$ ). Anhand des Graphen entsteht der Eindruck, dass die Keimzahl für insgesamt 392 Tage der Lagerung konstant bleibt. Tatsächlich nimmt die Keimzahl in diesem Zeitraum um 0,9 bzw. 1 log Stufe signifikant ab ( $p < 0,05$ , siehe Tabelle 36). Auch ist in der Abbildung zu erkennen, dass die Keimzahlen auf beiden verwendeten Agars sehr dicht beieinander liegen. Es konnte an Tag 98 eine maximale Schädigungsrate von 44%

ermittelt werden. An den restlichen Test-Tagen liegt die Schädigungsrate zwischen 9 – 28%.



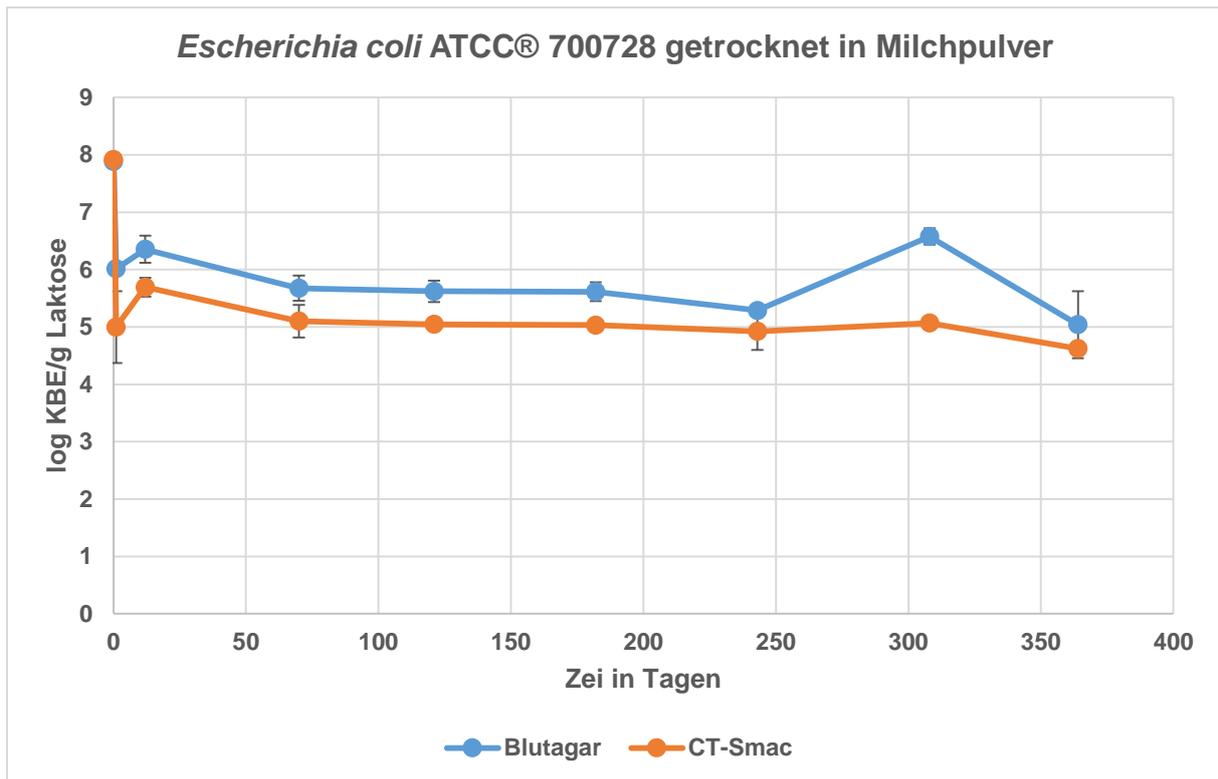
**Abbildung 19: Cronobacter sakazakii ATCC® 29004 getrocknet in Nestlé Beba Kindermilch für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel.** Es wurde über einen Zeitraum von insgesamt 392 Tagen Proben á ein Gramm der getrockneten Bakterien untersucht und eine Keimzahlbestimmung auf CASO-Agar und *Enterobacter sakazakii* Selektivagar (ESSA) durchgeführt. Aufgetragen wurden die log KBE/g Milchpulver gegen die vergangene Zeitdauer in Tagen. Dargestellt werden die Mittelwerte, sowie die doppelte Standardabweichung für jeden Wert (n=8).

**Tabelle 35: Veränderung der Keimzahl für die in Nestlé Beba Kindermilch getrockneten Proben von *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004, gelagert bei Raumtemperatur.** Angegeben ist die Abnahme der Keimzahl in bestimmten Zeitintervallen für CASO-Agar und Enterobacter sakazakii Selektivagar in log KBE.

<b>CASO-Agar</b>			
<b>Probe</b>	<b>Keimzahl Vorkultur in log KBE/g Milchpulver</b>	<b>Tage</b>	<b>Abnahme Keimzahl in log KBE</b>
<b><i>C. sakazakii</i></b>	7,6	0 - 1	1
		1 - 392	1
<b>ESSA</b>			
<b>Probe</b>	<b>Keimzahl Vorkultur in log KBE/g Milchpulver</b>	<b>Tage</b>	<b>Abnahme Keimzahl in log KBE</b>
<b><i>C. sakazakii</i></b>	7,6	0 - 1	1
		1 - 392	0,9

#### 4.2.2.4 Milchpulver-Trocknung *Escherichia coli* ATCC® 700728

Bei *Escherichia coli* ATCC® 700728 handelt es sich um ein Bakterium welches nicht in Laktose-Monohydrat getrocknet werden konnte. Direkt nach der Trocknung konnte der Stamm mit den hier verwendeten Methoden nicht mehr nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu konnte dasselbe Bakterium in Milchpulver erfolgreich getrocknet werden. In Abbildung 20 ist der Graph der Milchpulvertrocknung des Bakteriums gezeigt. Wie für die anderen in Milchpulver getrockneten Stämme zeigt sich auch für *Escherichia coli* ein anfänglicher signifikanter Abfall der Keimzahl direkt nach der Trocknung um 1,9 log Stufen auf Blutagar und 3 log Stufen auf CT-SMAC-Agar ( $p < 0,05$ , siehe Tabelle 37). Danach stabilisiert sich die Keimzahl und bleibt, bis auf einen erhöhten Wert an Tag 308 auf Blutagar, weitgehend konstant. Insgesamt sinkt die Keimzahl auf Blutagar innerhalb der übrigen 363 Tage um 1 log Stufe signifikant ab ( $p < 0,05$ ). Im Vergleich hierzu fällt die Keimzahl auf CT-SMAC-Agar nur noch um 0,4 log Stufen in derselben Zeit signifikant ab ( $p < 0,05$ ). Die Schädigungsraten liegen zwischen 66 – 88% mit einem Maximalwert an Tag 308 von 97%.



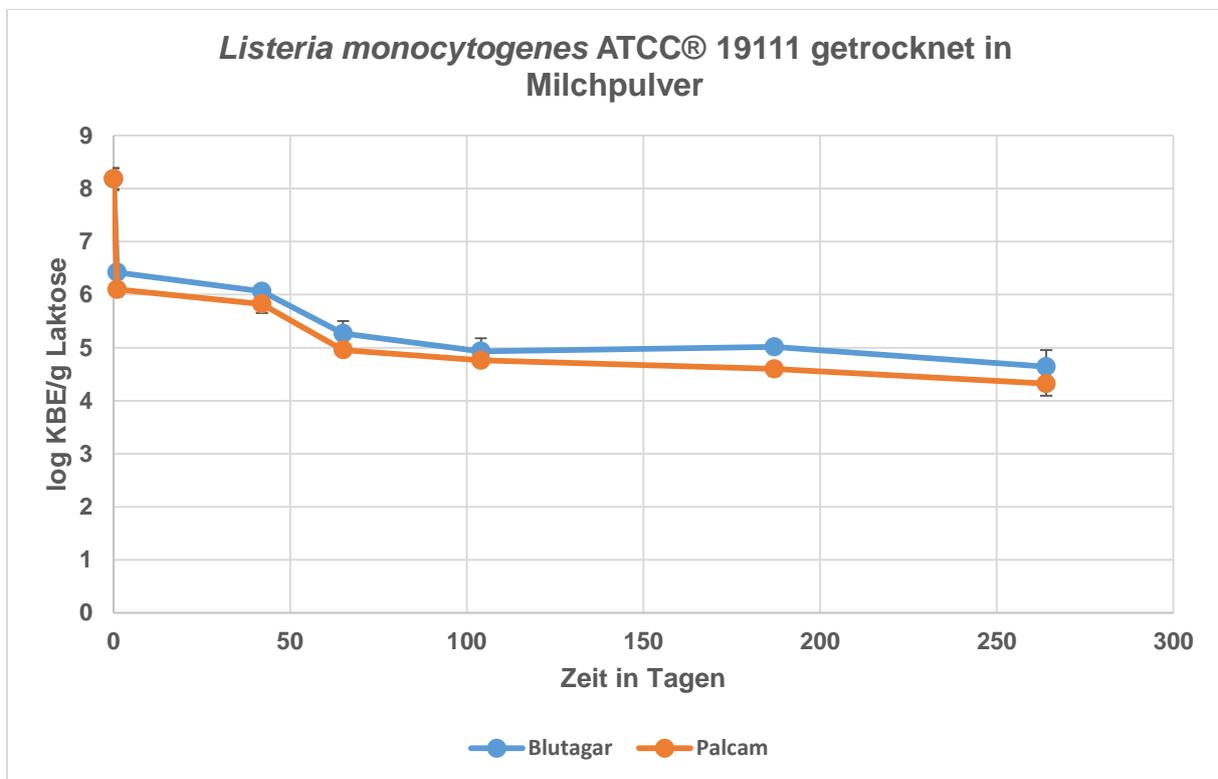
**Abbildung 20: *Escherichia coli* ATCC® 700728 getrocknet in Nestlé Beba Kindermilch für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel.** Es wurde über einen Zeitraum von insgesamt 364 Tagen Proben á ein Gramm der getrockneten Bakterien untersucht und eine Keimzahlbestimmung auf Blutagar und CT-SMAC-Agar durchgeführt. Aufgetragen wurden die log KBE/g Milchpulver gegen die vergangene Zeitdauer in Tagen. Dargestellt werden die Mittelwerte, sowie die doppelte Standardabweichung für jeden Wert (n=8).

**Tabelle 36: Veränderung der Keimzahl für die in Nestlé Beba Kindermilch getrockneten Proben von *Escherichia coli* ATCC® 700728, gelagert bei Raumtemperatur.** Angegeben ist die Abnahme der Keimzahl in bestimmten Zeitintervallen für Blutagar und CT-SMAC-Agar in log KBE.

<b>Blutagar</b>			
Probe	Keimzahl Vorkultur in log KBE/g Milchpulver	Tage	Abnahme Keimzahl in log KBE
<i>E. coli</i>	7,9	0 - 1	1,9
		1 - 364	1
<b>CT-SMAC-Agar</b>			
Probe	Keimzahl Vorkultur in log KBE/g Milchpulver	Tage	Abnahme Keimzahl in log KBE
<i>E. coli</i>	7,9	0 - 1	3
		1 - 364	0,4

#### 4.2.2.5 Milchpulver-Trocknung *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111

Auch bei *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111 handelt es sich um einen Stamm, der nach Trocknung in Laktose-Monohydrat nicht mehr nachweisbar ist. In Milchpulver dagegen kann der Stamm getrocknet werden (siehe Abbildung 21). Die Keimzahl des Stammes fällt nach der Trocknung auf Blutagar und PALCAM-Agar signifikant um 1,8 bzw. 2,1 log Stufen ab ( $p < 0,05$ , siehe Tabelle 38). Ein weiterer größerer Abfall der Keimzahl ist nach 65 Tagen zu erkennen. Zwischen 1 und 65 Tagen sinkt die Keimzahl signifikant um weitere 1,1 bzw. 1,2 log Stufen ab um sich im Folgenden zu stabilisieren und bis Tag 264 um 0,6 log Stufen signifikant abzusinken ( $p < 0,05$ ). Die Schädigungsrate über den gesamten Zeitraum liegt zwischen 34 und 61%.



**Abbildung 21:** *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111 getrocknet in Nestlé Beba Kindermilch für 24 h bei 41°C und gelagert bei Raumtemperatur mit Kieselgel. Es wurde über einen Zeitraum von insgesamt 264 Tagen Proben á ein Gramm der getrockneten Bakterien untersucht und eine Keimzahlbestimmung auf Blutagar und PALCAM-Agar durchgeführt. Aufgetragen wurden die log KBE/g Milchpulver gegen die vergangene Zeitdauer in Tagen. Dargestellt werden die Mittelwerte, sowie die doppelte Standardabweichung für jeden Wert (n=8).

**Tabelle 37: Veränderung der Keimzahl für die in Nestlé Beba Kindermilch getrockneten Proben von *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111, gelagert bei Raumtemperatur.** Angegeben ist die Abnahme der Keimzahl in bestimmten Zeitintervallen für Blutagar und PALCAM-Agar in log KBE.

<b>Blutagar</b>			
<b>Probe</b>	<b>Keimzahl Vorkultur in log KBE/g Milchpulver</b>	<b>Tage</b>	<b>Abnahme Keimzahl in log KBE</b>
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	8,2	0 - 1	1,8
		1 - 65	1,2
		65 - 264	0,6
<b>PALCAM-Agar</b>			
<b>Probe</b>	<b>Keimzahl Vorkultur in log KBE/g Milchpulver</b>	<b>Tage</b>	<b>Abnahme Keimzahl in log KBE</b>
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	8,2	0 - 1	2,1
		1 - 65	1,1
		65 - 264	0,6

#### 4.2.3 Zusammenfassung Trocknungsversuche

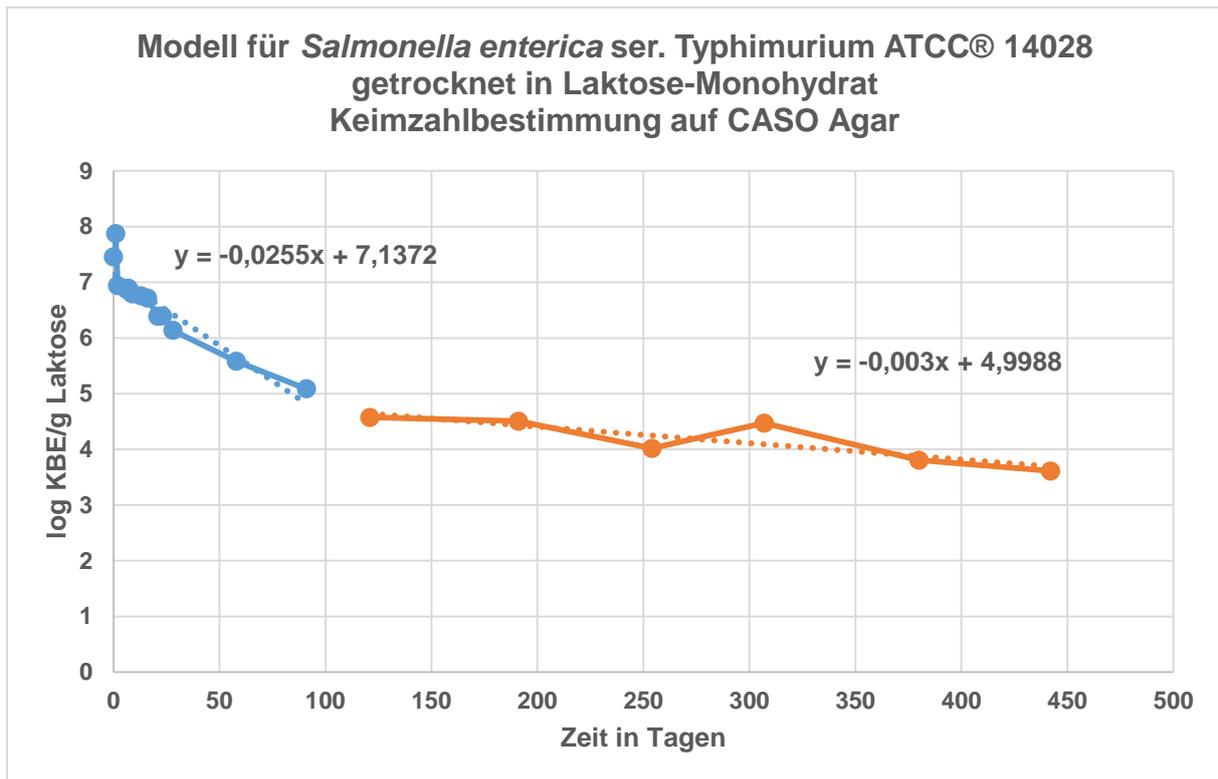
Es wurden zwei unterschiedliche Medien zur Trocknung verschiedener Bakterien eingesetzt, Laktose-Monohydrat und Milchpulver. Die Bakterien *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111, *Escherichia coli* ATCC® 700728 und *Salmonella Enteritidis* ATCC® 13076 konnten nicht in Laktose-Monohydrat getrocknet werden, dafür erfolgreich in Milchpulver.

Für die durchgeführten Milchpulver-Trocknungen lässt sich erkennen, dass die Graphen für die unterschiedlichen Bakterien relativ gleich aussehen. Nach einer initialen Abnahme der Keimzahl direkt nach der Trocknung, stabilisieren sich die Keimzahlen auf dem jeweiligen Selektiv und Nicht-Selektivagar. Über einen längeren Zeitraum bis zu 400 Tagen nimmt die Keimzahl für alle getesteten Bakterien nur noch langsam ab. Es ist anzumerken, dass man anhand der durchgeführten Varianzanalyse statistisch hier trotzdem nicht von einer vollständigen Stabilität der Keimzahlen sprechen kann. Je nach Bakterium und auch verwendetem Selektivagar sind für die getesteten Bakterien unterschiedliche Schädigungsraten zu erkennen. Das Bakterium *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004 wird durch die Trocknung in Milchpulver maximal um 28% geschädigt, während andere Bakterien wie *Escherichia coli* oder *Staphylococcus* bis zu 70% Schädigungsrate aufweisen konnten. Hier wird deutlich, dass verschiedene Bakterien unterschiedlich auf den Prozess der Trocknung reagieren.

Bei der Trocknung verschiedener Bakterien in Laktose lassen sich ebenfalls Unterschiede und Gemeinsamkeiten erkennen. Auch hier gibt es eine anfängliche Phase in deren Verlauf die Keimzahl zunächst stärker abnimmt. Diese kann im Vergleich zur Milchpulver-Trocknung allerdings über mehrere Wochen oder Monate andauern, wie z.B. bei *Salmonella* Typhimurium. Im Vergleich zur Milchpulver-Trocknung kann aber für die in Laktose getrockneten Bakterien festgestellt werden, dass die Keimzahl und damit der erstellte Graph bei einer längeren Lagerung deutlich schneller absinkt. Es ist anzunehmen, dass nach weiteren Tagen oder Wochen der Lagerung keine Bakterien mit den hier verwendeten Methoden mehr nachgewiesen werden können. Im Vergleich hierzu zeigen die Graphen der Milchpulver-Proben eine weniger starke Tendenz in Richtung Nullpunkt. Es ist anzunehmen, dass die Milchpulver-Proben auch weiterhin für eine längere Zeitdauer relativ stabil gelagert werden können. Die Schädigungsraten variieren auch bei der Laktose-Trocknung von Bakterium zu Bakterium. *Salmonella* und *Cronobacter* zeigten mit 90 – 100% sehr hohe Schädigungsraten über den gesamten Zeitraum der Trocknung und Lagerung. Die Schädigungsraten für *Staphylococcus* variierten über den Lagerungszeitraum stärker. Auch zeigte sich hier der Einfluss des verwendeten Selektivmediums. So hatte Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar einen deutlich höheren Einfluss auf die Keimzahl, als Baird Parker-Agar, welcher oft sehr nah an den Werten von CASO-Agar lag. Für den Stamm *Salmonella* Typhimurium wurden ebenfalls Untersuchungen zur Lagerung bei 4°C und -20°C durchgeführt. Hierbei konnte im Vergleich zur Lagerung bei Raumtemperatur eine deutlich stabilere Keimzahl auf beiden verwendeten Agar-Medien festgestellt werden. Die bestimmten Keimzahlen an den unterschiedlichen Messtagen unterscheiden sich bei den vorgelegten Untersuchungen oft von den Keimzahlen der vorangegangenen bzw. nachfolgenden Messtage. Dies erschwert die statistische Auswertung mittels Varianzanalyse, da ein Graph, der optisch stabil erscheint durch die Schwankung der Messwerte statistisch signifikante Unterschiede aufweist. Aus diesem Grund kann in der vorliegenden Arbeit in den meisten Fällen statistisch nicht von einer stabilen Keimzahl gesprochen werden. In Abschnitt 7.2 wird die homogene Durchmischung von Laktose-Proben zu dieser Thematik weiter ausgeführt.

#### 4.3 Erstellung eines Modells zur Charakterisierung des Absterbeverhaltens von *Salmonella* Typhimurium bei Trocknung in Laktose-Monohydrat

Der Stamm *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 wurde für diese Arbeit in Laktose-Monohydrat getrocknet. Da für diesen Stamm in der vorliegenden Arbeit die meisten Ergebnisse generiert wurden, wurde ein Modell erstellt, um die Phasen während der Laktose-Trocknung besser zu charakterisieren. In Abbildung 22 ist das Modell beispielhaft für die in Abschnitt 4.2.2.1 besprochene *Salmonella* Probe 24 h 1 dargestellt. Wie bereits in diesem Abschnitt besprochen zeigt der Graph zwei unterschiedliche Phasen, welche während der Trocknung und Langzeitlagerung auftreten. Eine initiale Phase mit höherem Keimzahlverlust und eine zweite Phase der Stabilisierung in deren Verlauf die Keimzahl über einen längeren Zeitraum langsamer abnimmt. Diese Phasen sind in Abbildung 22 für das Nährmedium CASO-Agar getrennt aufgetragen. In blau zu sehen ist die initiale Phase, in orange die Stabilisierungsphase. Für beide Phasen wurde eine Trendlinie in das Diagramm eingefügt, welche anhand der angegebenen Formel Aufschluss über das Verhalten der Keimzahl über die Zeit gibt. In Tabelle 38 werden vergleichend verschiedene Formeln für unterschiedliche Laktose-Proben angegeben. Anhand dieser Formeln wurde der prozentuale Keimzahlverlust pro Tag für die beiden festgelegten Phasen des Modells angegeben, welche in Tabelle 39 zu finden sind. In der initialen Phase kann hier ein Keimzahlverlust von 4,2 – 6,8% pro Tag festgestellt werden. Im Vergleich hierzu liegt der Keimzahlverlust in der Stabilisierungsphase lediglich bei 0,5 – 1,1% pro Tag.



**Abbildung 22: Modell zur Charakterisierung des Absterbens auf CASO-Agar von *Salmonella enterica* ser.Typhimurium ATCC® 14028 nach Trocknung in Laktose und Langzeitlagerung bei Raumtemperatur.** Dargestellt werden die zwei Phasen des Absterbens über den gesamten Zeitraum von 442 Tagen. Für jede Phase wurde eine lineare Trendlinie für den Graphen erstellt und mit der dazugehörigen Formel versehen.

**Tabelle 38: Auflistung von Trendlinien-Formel verschiedener *Salmonella enterica* ser.Typhimurium ATCC® 14028 Proben nach Trocknung in Laktose und Lagerung bei Raumtemperatur.** Gezeigt werden Formeln für CASO-Agar aus verschiedenen Diagrammen unterschiedlicher Laktose-Trocknungen des Stammes *Salmonella enterica* ser.Typhimurium ATCC® 14028.

Probe	Initiale Phase	Stabilisierungsphase
1	$y = -0,0226x + 6,6773$	$y = -0,0031x + 4,4688$
2	$y = -0,0282x + 7,3727$	$y = -0,0047x + 5,3012$
3	$y = -0,0292x + 6,5076$	$y = -0,0026x + 4,4038$
4	$y = -0,0255x + 7,1372$	$y = -0,003x + 4,9988$
5	$y = -0,022x + 7,6121$	$y = -0,005x + 5,5504$
6	$y = -0,0305x + 7,591$	$y = -0,002x + 5,2112$
7	$y = -0,0188x + 7,1657$	$y = -0,0043x + 6,1032$

**Tabelle 39: Prozentuale Keimzahlabnahme auf CASO-Agar von *Salmonella enterica* ser.Typhimurium ATCC® 14028 Proben nach Trocknung in Laktose und Lagerung bei Raumtemperatur.** Die prozentualen Abnahmen der Keimzahlen wurden anhand der in Tabelle 1 gezeigten Trendlinien-Formeln bestimmt.

<b>Probe</b>	<b>Prozentuale Keimzahl- Abnahme pro Tag: Initiale Phase [in %]</b>	<b>Prozentuale Keimzahl- Abnahme pro Tag: Stabilisierungsphase [in %]</b>
1	5,1	0,7
2	6,3	1,1
3	6,5	0,6
4	5,7	0,7
5	4,9	1,1
6	6,8	0,5
8	4,2	1,0

#### 4.4 Ergebnisse Hitzeschock-Versuche

Als zweite Methode zur Schädigung von Bakterien wurde die Schädigung durch Hitze eingesetzt. Im Bereich der Lebensmittelkonservierung ist Hitze ein beliebtes Mittel der Wahl (Boekel et al. 2000). Aus diesem Grund wurde die Methode des Hitzeschocks zur Erzeugung geschädigter Bakterien ausgewählt. Der Hitzeschock wurde mit vier typischen, in der Lebensmittelindustrie vorkommenden, Bakterien durchgeführt: *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111, *Escherichia coli* ATCC® 700728 und *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004 (Institute of Food Technologists & Food and Drug Administration 2001, S.34; Ruan et al. 2016). Zur Auswahl einer geeigneten Temperatur und Schädigungsdauer wurden Vorversuche, zur Bestimmung der optimalen Temperatur und Zeitdauer, durchgeführt, welche sich auf Angaben aus der Literatur stützten. Der Hitzeschock sollte möglichst kurz und intensiv sein, um die Bearbeitungsdauer kurz zu halten und möglichst nah an die eigentlichen Bedingungen in der Lebensmittelindustrie heranzukommen. So werden für die Pasteurisierung Temperaturen zwischen 63 - 138°C für eine unterschiedliche Zeitdauer von 0,1 Sekunde bis zu 30 Minuten eingesetzt (Watts 2016). Im Anschluss an den Hitzeschock sollten die geschädigten Bakterien ebenfalls konserviert werden, sodass sich Material ergibt, welches über einen längeren Zeitraum dieselbe Keimzahl und Schädigungsrate aufweist. Für die Konservierung wurde die gängige Konservierung der bakteriellen Stammsammlung

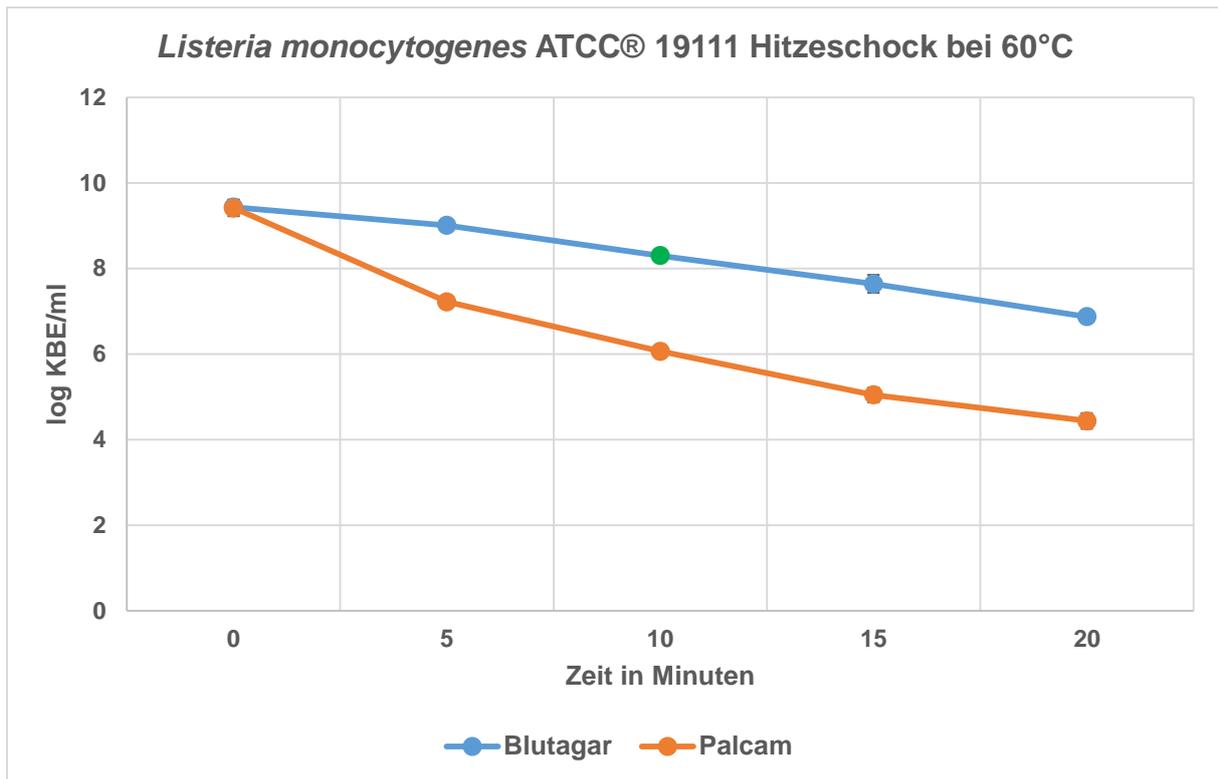
des Labors durchgeführt. Hierfür werden die Bakterien mit 10 – 15% Glycerin in Nährmedium versetzt und eingefroren (Howard 1955; Postgate & Hunter 1961). Im Folgenden werden die Ergebnisse für die Hitzeschädigung der oben genannten Bakterien gezeigt, sowie die Graphen für die Langzeitlagerung bei -80°C.

#### 4.4.1 Vorversuche zum Hitzeschock

Die hier gezeigten Graphen der Vorversuche zeigen die letztendlich verwendete Temperatur, sowie die Entscheidungsgrundlage für die jeweilige Dauer des Hitzeschocks. Es wurden hierzu noch weitere Vorversuche durchgeführt, deren Ergebnisse jedoch nicht relevant sind und hier nicht gezeigt werden, da es sich lediglich um Sondierungsversuche für die etwaige Temperatur und Dauer handelt. Berechnet wurden auch die D-Werte, welche angeben wann die Keimzahl um eine log Stufe bzw. 90% reduziert wurde (Russel 2003).

#### 4.4.2 *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111

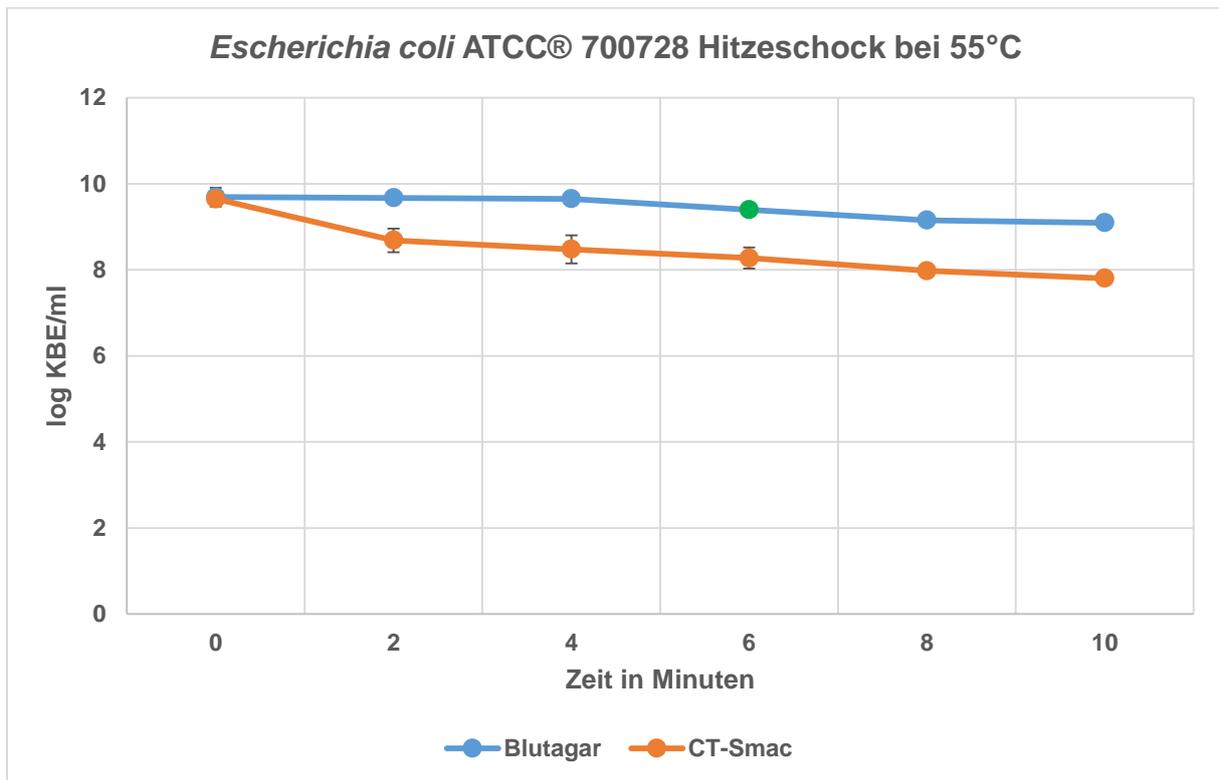
Für *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111 wurde der Hitzeschock bei 60°C über eine Zeitdauer von 20 Minuten durchgeführt. Alle 5 Minuten wurde 1 ml Probe entnommen und die Keimzahl auf Blutagar und PALCAM-Agar untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 gezeigt. Aus dem Vergleich der beiden Keimzahlen wurde die Schädigungsrate nach der Formel in Kapitel 2.3 bestimmt. Die Schädigungsrate lag bereits nach 5 Minuten bei 98,4% und steigerte sich noch bis 99,7% in den folgenden Minuten. In den ersten 5 Minuten konnte ein signifikanter Abfall der Keimzahl von 0,4 log Stufen auf Blutagar und 2,2 log Stufen auf PALCAM-Agar beobachtet werden ( $p < 0,05$ ). In den weiteren 15 Minuten sank die Keimzahl auf Blutagar weiter um signifikante 2,1 log Stufen und auf PALCAM-Agar um 2,8 log Stufen ( $p < 0,05$ ). Der  $D_{60^\circ\text{C}}$ -Wert liegt bei 7,7 Minuten. Es wurde entschieden den Hitzeschock in Zukunft bei 60°C für 5 Minuten auszuführen, da hier bereits eine sehr hohe Schädigungsrate erreicht wurde, welche im weiteren Prozess kaum gesteigert werden konnten. Im Vergleich dazu liegt nach 5 Minuten, im Vergleich zu den bestimmten Werten nach 20 Minuten nur ein geringerer Keimzahlverlust vor. Da das Ziel des Versuchs die Schädigung des Bakteriums und nicht dessen Abtötung war wurde entschieden den Hitzeschock kürzer zu halten.



**Abbildung 23: Hitzeschock von *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111. Der Hitzeschock wurde im Wasserbad bei 60°C für insgesamt 20 Minuten durchgeführt.** Die Bakterien wurden in bereits auf 60°C vorgewärmtes Medium gegeben. Die Probenahme erfolgte nach 5, 10, 15 und 20 Minuten. Die Keimzahlen wurden auf Blutagar und PALCAM-Agar bestimmt. Anmerkung: Auf Blutagar konnte nach 10 Minuten kein Wert für die Keimzahl ermittelt werden. Der grün markierte Punkt in der Graphik wurde ohne Datengrundlage zur Vervollständigung des Diagramms hinzugefügt. Dargestellt werden die Mittelwerte, sowie die doppelte Standardabweichung für jeden Wert (n=8).

#### 4.4.3 *Escherichia coli* ATCC® 700728

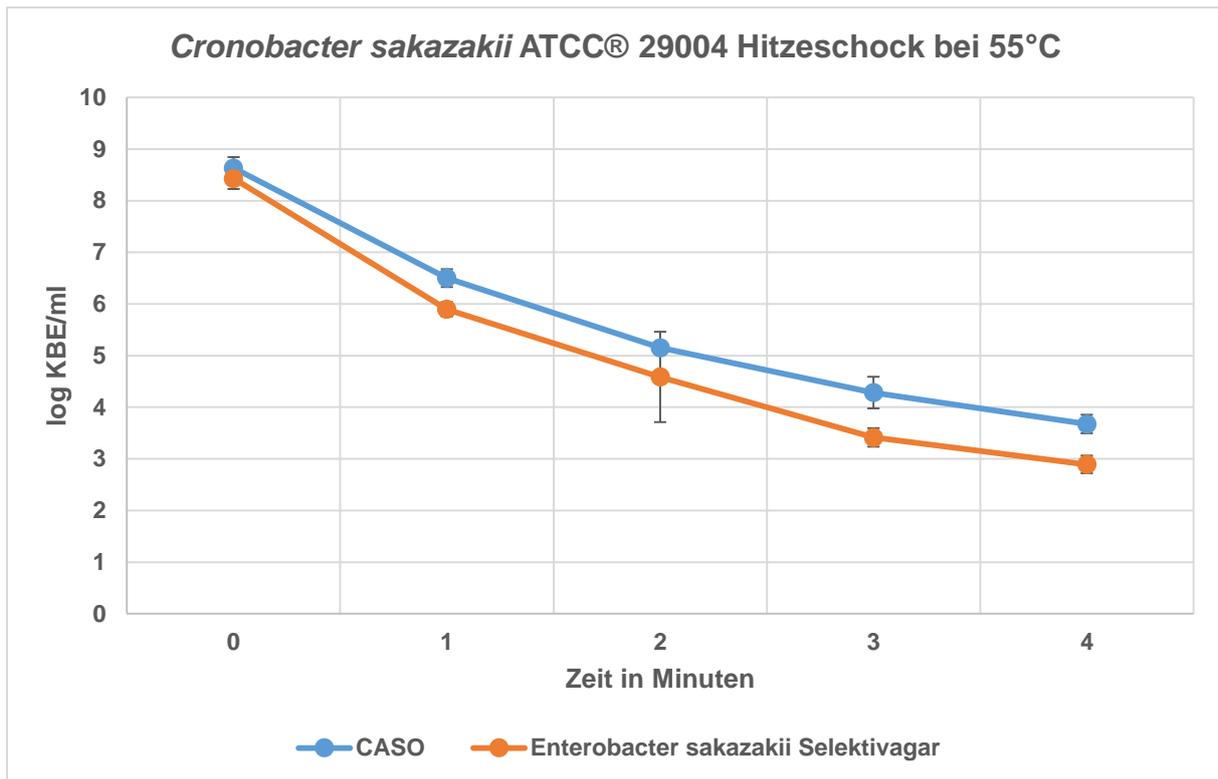
Der Hitzeschock von *Escherichia coli* ATCC® 700728 wurde bei 55°C für insgesamt 10 Minuten durchgeführt. In Abbildung 24 ist der Verlauf der Keimzahl graphisch dargestellt. Über den gesamten Zeitraum nimmt die Keimzahl des Stammes auf Blutagar um 0,6 log Stufen signifikant ab ( $p < 0,05$ ). Auf CT-SMAC-Agar kommt es nach den ersten zwei Minuten zu einem signifikanten Abfall der Keimzahl von 1 log Stufe ( $p < 0,05$ ). Über den restlichen Zeitraum nimmt die Keimzahl nochmal um 1 log Stufe ab. Bereits nach 2 Minuten Hitzeschock liegt die Schädigungsrate bei 89,2% und steigert sich dann nach 10 Minuten Hitzeschock auf bis zu 94,8%. Nach 4 Minuten wurde bereits eine Schädigungsrate von knapp 93,8% erreicht, welche nah am maximalen erreichten Wert liegt. Der  $D_{55^{\circ}\text{C}}$ -Wert liegt bei 14,6 Minuten. Da auch nach 10 Minuten keine deutliche Steigerung der Schädigungsrate erzielt werden konnte und es lediglich zu einer Abnahme der Keimzahl kommt, wurde die Zeitdauer für den Hitzeschock bei 55°C auf 4 Minuten festgesetzt.



**Abbildung 24: Hitzeschock von *Escherichia coli* ATCC® 700728.** Der Hitzeschock wurde im Wasserbad bei 55°C für insgesamt 10 Minuten durchgeführt. Die Bakterien wurden in bereits auf 55°C vorgewärmtes Medium gegeben. Die Probennahme erfolgte nach 2, 4, 6, 8 und 10 Minuten. Die Keimzahlen wurden auf Blutagar und CT-SMAC-Agar bestimmt. Anmerkung: Auf Blutagar konnte nach 6 Minuten kein Wert für die Keimzahl ermittelt werden. Der grün markierte Punkt in der Graphik wurde ohne Datengrundlage zur Vervollständigung des Diagramms hinzugefügt. Dargestellt werden die Mittelwerte, sowie die doppelte Standardabweichung für jeden Wert (n=8).

#### 4.4.4 *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004

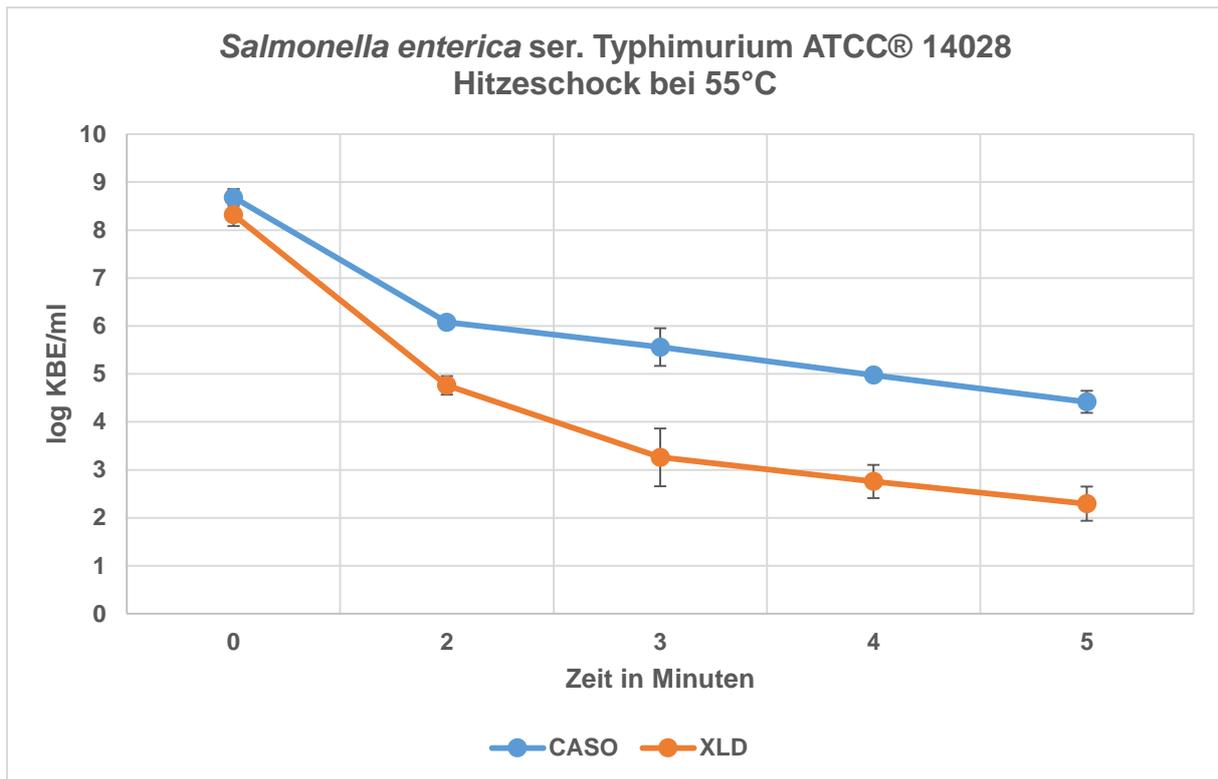
Der Hitzeschock von *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004 wurde bei 55°C für insgesamt 4 Minuten durchgeführt. Im Vergleich zu *Escherichia coli* und *Listeria monocytogenes* kann der Hitzeschock für *Cronobacter sakazakii* nur für 4 Minuten durchgeführt werden, da ein schneller Abfall der Keimzahl zu beobachten ist. Dies wird in Abbildung 25 graphisch dargestellt. Nach zwei Minuten Hitzeschock konnten auf CASO-Agar signifikante 2 log Stufen Keime weniger nachgewiesen werden, auf ESSA-Agar 2,5 log Stufen ( $p < 0,05$ ). Nach jeder weiteren Minute Hitzeschock sank die Keimzahl auf beiden Agars um je 1 log Stufe signifikant ab ( $p < 0,05$ ). Die Schädigungsraten liegen bei 75% nach einer Minute Hitzeschock und erreichen ein Maximum von 87% nach 3 Minuten Hitzeschock. Aufgrund des schnellen Absinkens der Keimzahl durch den Hitzeschock wurde die Dauer für den Hitzeschock auf 2 Minuten festgesetzt. Der  $D_{55^{\circ}\text{C}}$ -Wert liegt bei 0,8 Minuten.



**Abbildung 25: Hitzeschock von *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004.** Der Hitzeschock wurde im Wasserbad bei 55°C für insgesamt 4 Minuten durchgeführt. Die Bakterien wurden in bereits auf 55°C vorgewärmtes Medium gegeben. Die Probennahme erfolgte nach 1, 2, 3, und 4 Minuten. Die Keimzahlen wurden auf CASO-Agar und ESSA-Agar bestimmt. Dargestellt werden die Mittelwerte, sowie die doppelte Standardabweichung für jeden Wert (n=8).

#### 4.4.5 *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028

Auch für den Stamm *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 wurde eine Temperatur von 55°C und eine Maximale Zeitdauer von 5 Minuten ausgewählt. Der Graph für den Hitzeschock ist in Abbildung 26 gezeigt. Auch hier kann direkt nach den ersten zwei Minuten des Hitzeschocks ein hoher Verlust an nachweisbaren Keimen beobachtet werden. Auf CASO-Agar sinkt die Keimzahl um 2,6 log Stufen, auf XLD-Agar um 3,6 log Stufen signifikant ab ( $p < 0,05$ ). In den folgenden 4 Minuten sinkt die Keimzahl auf CASO-Agar pro Minute signifikant um etwa 0,5 log Stufen ( $p < 0,05$ ). Auf XLD-Agar sinkt die Keimzahl nach 3 Minuten nochmals signifikant um 1,5 log Stufen und nimmt danach ebenfalls um 0,5 log Stufen pro Minute ab ( $p < 0,05$ ). Der  $D_{55^\circ\text{C}}$ -Wert liegt bei 1,2 Minuten. Nach zwei Minuten Hitzeschock wird bereits eine Schädigungsrate von 95% erreicht, welche sich nach 4 Minuten noch auf 99% steigerte. In Anbetracht des hohen Verlustes an Bakterien über die Zeit, wurde der Hitzeschock in den nachfolgenden Versuchen ebenfalls auf 2 Minuten begrenzt.



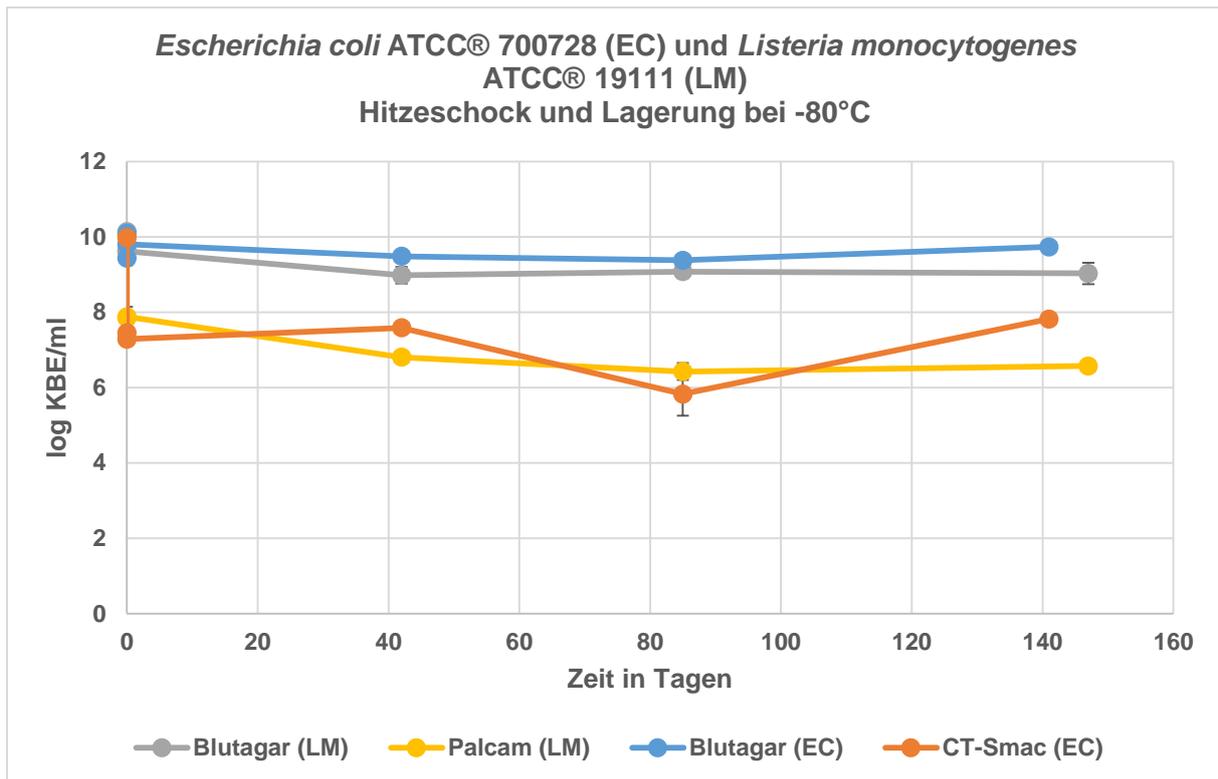
**Abbildung 26: Hitzeschock von *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC® 14028.** Der Hitzeschock wurde im Wasserbad bei 55°C für insgesamt 5 Minuten durchgeführt. Die Bakterien wurden in bereits auf 55°C vorgewärmtes Medium gegeben. Die Probenahme erfolgte nach 2, 3, 4 und 5 Minuten. Die Keimzahlen wurden auf CASO-Agar und XLD-Agar bestimmt. Dargestellt werden die Mittelwerte, sowie die doppelte Standardabweichung für jeden Wert (n=8).

#### 4.4.6 Lagerung der Hitzeschock-Proben bei -80°C

Um die Proben nach dem Hitzeschock so lange wie möglich stabil zu lagern, wurden die gestressten Proben nach dem Hitzeschock mit 15% Glycerin im jeweiligen Nährmedium versetzt und direkt bei -80°C aliquotiert eingefroren. Die vorherige Aufteilung der Proben vor dem Einfrieren in kleinere Portionen diente dazu, wiederholtes einfrieren und auftauen der gesamten Probe zu vermeiden. Durch mehrmaliges einfrieren und auftauen hätte nicht ausgeschlossen werden können, dass die Zellen weiteren Schaden genommen hätten (Sleight et al. 2006). Im Folgenden werden die Ergebnisse für die oben gezeigten Bakterien für die Langzeit-Lagerung von Hitzeschock-Proben aufgeführt.

#### 4.4.7 *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111 und *Escherichia coli* ATCC® 700728 Hitzeschock und Lagerung bei -80°C

Nachfolgend werden die Graphen für *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111 und *Escherichia coli* ATCC® 700728 nach Hitzeschock und Lagerung bei -80°C für 141 bzw. 147 Tagen in Abbildung 27 gezeigt. Es kann festgestellt werden, dass der Verlauf der Graphen für das Selektiv und Nicht-Selektivmedium für beide Stämme sehr ähnlich ist. Nach dem Hitzeschock sinkt die signifikant Keimzahl auf Blutagar für beide Stämme um etwa 0,5 – 0,6 log Stufen und auf dem jeweiligen Selektivagar um etwa 2,2 – 2,5 log Stufen ab ( $p < 0,05$ ). In der folgenden Lagerungszeit bei -80°C bleiben die ermittelten Keimzahlen auf Blutagar für den Stamm *Escherichia coli* bis auf geringe Schwankungen von maximal 0,4 log Stufen konstant. Auf CT-SMAC-Agar schwankt die Keimzahl um maximal 0,5 log Stufen. Eine Ausnahme bildet hier der Wert an Tag 85, welcher eine um 1,7 log Stufen niedrigere Keimzahl aufweist, als der an Tag 42 bestimmte Wert. Bei *Listeria monocytogenes* zeichnet sich nach dem Hitzeschock eine Abnahme der Keimzahl um 0,5 log Stufen auf Blutagar und um 1 log Stufe auf PALCAM-Agar ab. Die Keimzahlen an den Tagen 42, 85 und 147 unterscheiden sich dagegen nur nicht-signifikant um maximal 0,1 log Stufe auf Blutagar ( $p > 0,05$ ) voneinander und signifikant um maximal 0,4 log Stufen auf PALCAM-Agar ( $p < 0,05$ ). Die Schädigungsraten für beide Stämme liegen bei 98 – 99%.

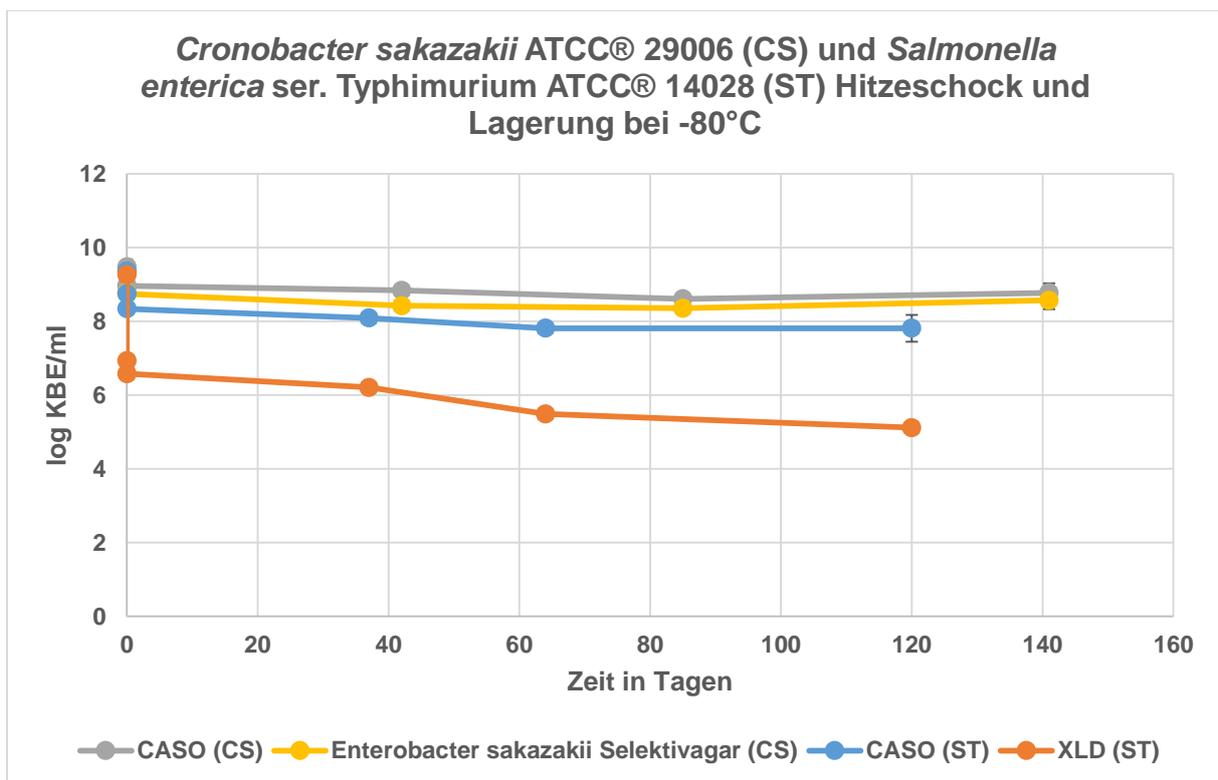


**Abbildung 27: Hitzeschock von *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111 und *Escherichia coli* ATCC® 700728 und Lagerung mit 15% Glycerin in CASO-Bouillon bei -80°C.** Der Hitzeschock wurde für *Listeria monocytogenes* im Wasserbad bei 60°C für insgesamt 5 Minuten durchgeführt und für *Escherichia coli* bei 55°C für 4 Minuten. Die Bakterien wurden in bereits auf die jeweilige Temperatur vorgewärmtes Medium gegeben. Die Keimzahlen wurden auf Blutagar und PALCAM-Agar (*Listeria monocytogenes*) sowie Blutagar und CT-SMAC-Agar (*Escherichia coli*) bestimmt. . Dargestellt werden die Mittelwerte, sowie die doppelte Standardabweichung für jeden Wert (n=4).

#### 4.4.8 *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 und *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004 Hitzeschock und Lagerung bei -80°C

In Abbildung 28 sind die Graphen für den Hitzeschock sowie die anschließende Lagerung bei -80°C für *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 und *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004 zu sehen. Durch den Hitzeschock kommt es bei *Cronobacter sakazakii* zu einer signifikanten Verringerung der Keimzahl um 0,5 – 0,6 log Stufen auf CASO- und ESSA-Agar ( $p < 0,05$ ). Nach dem Einfrieren bleibt die Keimzahl weitgehend stabil. Es kann sowohl auf CASO- als auch auf ESSA-Agar ein maximaler Keimzahlunterschied von 0,4 log Stufen festgestellt werden, verglichen mit der Keimzahl vor dem Einfrieren. Es handelt sich statistisch gesehen um einen signifikanten Unterschied zwischen den Einzelmessungen an den verschiedenen Tagen ( $p < 0,05$ ). Die Schädigungsrate liegt für diesen Stamm im Mittelwert lediglich bei 43%. Für den Stamm *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 kann nach dem Hitzeschock ein signifikanter Keimzahlverlust von 0,6 log Stufen auf CASO-Agar,

sowie von 2,3 log Stufen auf XLD-Agar festgestellt werden ( $p < 0,05$ ). Während die Keimzahl auf CASO-Agar über die Lagerdauer relativ konstant bleibt und über die Dauer von 120 Tagen nur um 0,5 log Stufen signifikant abnimmt, nimmt die Keimzahl auf XLD-Agar im selben Zeitraum um 1,5 log Stufen ab ( $p < 0,05$ ). Im Vergleich zu *Cronobacter* liegt die Schädigungsrate für den *Salmonella*-Stamm bei 98 – 99%. Im Vergleich zu den Vorversuchen kann für beide Stämme die Aussage getroffen werden, dass die Abnahme der Keimzahl durch den Hitzeschock wesentlich geringer ausfällt als es bei den Vorversuchen der Fall war.



**Abbildung 28: Hitzeschock von *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 und *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004 und Lagerung mit 15% Glycerin in BPW-Bouillon bei -80°C.** Der Hitzeschock wurde für beide Stämme im Wasserbad bei 55°C für insgesamt 2 Minuten durchgeführt. Die Bakterien wurden in bereits auf 55°C vorgewärmtes Medium gegeben. Die Keimzahlen wurden auf CASO-Agar und XLD-Agar (*Salmonella* Typhimurium) sowie CASO-Agar und ESSA-Agar (*Cronobacter sakazakii*) bestimmt. . Dargestellt werden die Mittelwerte, sowie die doppelte Standardabweichung für jeden Wert (n=4).

#### 4.4.9 Zusammenfassung Hitzeschock-Versuche

Für die Hitzeschock-Versuche kann festgestellt werden, dass sich die verschiedenen Bakterien sehr unterschiedlich unter Hitzestress verhalten. So konnte in den Vorversuchen für *Salmonella* und *Cronobacter* eine schnelle Abnahme der Keimzahl bei 55°C in einer sehr kurzen Zeitspanne festgestellt werden. Bei den Hitzeschock-

Versuchen mit Langzeitlagerung zeigte sich nach dem Hitzeschock kein derart hoher Verlust an Keimen mehr. *Cronobacter sakazakii* wies in den Versuchen generell die niedrigste Schädigungsrate auf. Es stellte sich als schwierig heraus das Bakterium durch Hitze zu schädigen ohne die Zellen abzutöten. Im Vergleich hierzu zeigte *Escherichia coli* eine vergleichsweise hohe Hitzetoleranz bei 55°C. Auch nach mehreren Minuten bei 55°C zeigte der Stamm kaum ein Absterben der Zellen auf Blutagar. Dafür war hier auf CT-SMAC-Agar die Schädigungsrate bereits nach kurzer Zeit relativ hoch. Die höchste Hitzetoleranz in der Untersuchung zeigte *Listeria monocytogenes*. Auch nach 20 Minuten bei 60°C konnte das Bakterium sowohl auf Selektivagar als auch auf Nicht-Selektivagar nachgewiesen werden. Auch für *Listeria monocytogenes* konnte schon nach kurzer Zeit eine hohe Anzahl an geschädigten Bakterien nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen zur Lagerung Hitze-geschädigter Bakterien zeigte, dass es möglich ist derart geschädigte Bakterien bei -80°C über einen längeren Zeitraum stabil zu lagern. Über die Dauer der Lagerung zeigte sich für alle Bakterien eine gewisse Stabilität der Keimzahlen auf Selektivagar und Nicht-Selektivagar. Auch die Anzahl an geschädigten Zellen blieb während der Lagerung annähernd konstant.

#### **4.5 Lebensmittel- bzw. Validierungsversuch mit Laktose-getrockneten *Salmonella Typhimurium* ATCC® 14028**

Für diesen Lebensmittel- bzw. Validierungsversuch wurde Beba Anfangsmilch als Lebensmittelprobe artifiziell mit dem Stamm *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC® 14028 kontaminiert. Für die artifizielle Kontamination wurden durch Trocknung in Laktose geschädigte Bakterien, sowie als Vergleich eine frisch angesetzte Vorkultur desselben Stammes verwendet. Ziel des Versuchs war es festzustellen, ob geschädigte Bakterien für die interne Nährmedienvvalidierung eingesetzt werden können. Für diese interne Medienvvalidierung werden abhängig vom zu testenden Nährmedium unterschiedliche Lebensmittel und Bakterien eingesetzt. Gearbeitet wird hierbei nach ISO-Norm 16140 zur Methodenvvalidierung, sowie der entsprechenden ISO-Norm für die jeweiligen Bakterien (Europäische Gemeinschaft 2005; ISO 16140-2:2016; ISO 16140-3:2017). Im vorliegenden Fall wurde nach ISO-Norm 16140-3, sowie nach ISO-Norm 6579 gearbeitet (ISO 6579:2002; ISO 16140-3:2017). Bei der Standard-Vergleichsmethode für die artifizielle Kontamination wurde während der Medienvvalidierung eine frisch angesetzte Flüssigkultur des Stammes *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC® 14028 eingesetzt. Anhand dieser Standard-Vergleichsmethode soll überprüft werden, ob mit getrockneten Bakterien vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können. Um zu testen, wie erfolgreich der Einsatz von geschädigten Bakterien im Vergleich zu einer ungeschädigten Vorkultur ist, wurden mehrere Stomacherbeutel mit Milchpulver artifiziell kontaminiert. Die Lebensmittelproben wurden mit verschiedenen Inokula beimpft. Ausgewählt wurden unterschiedliche Inokula von 0,7 KBE bis 28 KBE um sowohl niedrige, mittlere als auch hohe Kontaminationsstufen zu testen.

##### **4.5.1 Ergebnisse der Vorversuche**

Vor Beginn des eigentlichen Versuchs wurden Vorversuche durchgeführt, um festzustellen inwieweit unterschiedliche Ansätze einer Flüssigkultur bei gleichen Konditionen dieselbe Keimzahl aufweisen. Dieser Versuch wurde durchgeführt, da die Lebensmittelprobe mit der flüssigen Vorkultur ohne vorherige Keimzahlbestimmung „blind“ angeimpft werden sollte. Dies bedeutet, dass die Vorkultur am Tag vor dem eigentlichen Lebensmittelversuch angesetzt wird. Eine vorherige Keimzahlbestimmung findet nicht statt. Am Tag des Lebensmittelversuchs wird die

Verdünnung der Vorkultur anhand der in den Vorversuchen generierten Erkenntnisse angesetzt und das Lebensmittel damit angeimpft. Es wurden insgesamt sechs verschiedene Vorkulturen untersucht, welche auf dieselbe Art und Weise angesetzt wurden. Die Keimzahlbestimmung wurde auf CASO-Fertigplatten durchgeführt. Die untenstehenden Keimzahlen (siehe Tabelle 40) wurden anhand der Berechnung im Anhang ermittelt (siehe Kapitel 7.3). Dabei konnte festgestellt werden, dass die jeweils ermittelten Keimzahlen sehr nah beieinanderlagen.

**Tabelle 40: Überprüfung der konstanten Keimzahl verschiedener Flüssigkulturen von *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC® 14028.** Alle untersuchten Kulturen wurden auf dieselbe Art und Weise angesetzt und behandelt.

Nummer Vorkultur	Ermittelte Keimzahl KBE/ml
1	1,48x10 <sup>9</sup>
2	1,52x10 <sup>9</sup>
3	1,48x10 <sup>9</sup>
4	1,49x10 <sup>9</sup>
5	1,47x10 <sup>9</sup>
6	1,48x10 <sup>9</sup>
Mittelwert	1,49x10 <sup>9</sup>

Für die artifizielle Kontamination des Lebensmittels sollten die Beutel mit verschiedenen Inokula angeimpft werden, welche sich in Tabelle 24 finden und zwischen 0,7 KBE und 28 KBE liegen. Anhand des in Tabelle 40 ermittelten Mittelwertes, wurde die weitere Berechnung der Verdünnungen mit einer Keimzahl von 1,5x10<sup>9</sup> KBE/ml durchgeführt. Um zu überprüfen, inwieweit die jeweiligen Inokula durch die ausgewählte Verdünnungsmethode erreicht werden können, wurde hierzu ebenfalls ein Vorversuch durchgeführt. Anhand des bestimmten Wertes von 1,5x10<sup>9</sup> KBE/ml für die flüssige Vorkultur wurde eine Verdünnung in MRD angesetzt, welche genau 28 KBE/ml enthalten und als Ausgangspunkt für die weiteren Verdünnungen dienen sollte. Für diesen Vorversuch konnten beim Ansetzen der Vorverdünnung das in Tabelle 41 aufgeführte Ergebnis erhalten werden. Es zeigte sich, dass durch die gewählte Verdünnungsmethode die jeweiligen Inokula mit einigen Abweichungen erreicht werden können.

**Tabelle 41: Vorversuch zur Vorverdünnung der flüssigen Vorkultur.** Anhand der in Tabelle 1 bestimmten Keimzahlen wurde eine Verdünnung angesetzt, welche 28 KBE/ml enthalten sollte. Aus dieser Verdünnung heraus wurden alle anderen Inokula verdünnt. Die hier gezeigte Tabelle vergleicht die tatsächlich bestimmten Inokula mit den angestrebten Inokula.

Verdünnung Soll-KBE	Ermittelte Ist-KBE			Volumen [µl]	Mittelwert MW Ist-KBE
<b>28</b>	20	34	22	1000	25,3
<b>14</b>	12	10	10	500	10,7
<b>7</b>	6	5	8	250	6,3
<b>3,5</b>	2	2	1	125	1,7
<b>1,4</b>	0	2	1	50	1,3
	0	2	1		
	1	1	3		
	2	1	1		
<b>0,7</b>	2	0	0	25	0,8
	1	0	0		
	1	0	0		
	2	2	1		

Für den Einsatz von getrockneten Bakterien wurde dieselbe Verdünnungsmethode wie für den Einsatz der flüssigen Vorkultur verwendet. Im Vergleich hierzu wurde die Keimzahl der getrockneten Bakterien direkt vor der eigentlichen Verwendung bestimmt. Es erfolgte kein „blindes“ animpfen der Lebensmittelproben. Um zu überprüfen inwieweit die gewählte Verdünnungsmethode für die getrockneten Bakterien geeignet ist, wurde hierzu ebenfalls ein Vorversuch durchgeführt. In diesem Vorversuch sollten die in Tabelle 42 angegebenen Inokula durch die Verdünnungsmethode erreicht werden. Die in Tabelle 42 aufgeführten Ergebnisse zeigen auch hier, dass die jeweiligen Inokula mit einigen Abweichungen erreicht werden können.

**Tabelle 42: Vorversuch zur Vorverdünnung der Laktose-getrockneten Kultur.** Anhand zuvor bestimmten Keimzahlen wurde eine Verdünnung angesetzt, welche 28 KBE/ml enthalten sollte. Aus dieser Verdünnung heraus wurden alle anderen Inokula verdünnt. Die hier gezeigte Tabelle vergleicht die tatsächlich bestimmten Inokula mit den angestrebten Inokula.

<b>Verdünnung Soll-KBE</b>	<b>Ermittelte Ist-KBE</b>			<b>Volumen [µl]</b>	<b>Mittelwert MW Ist-KBE</b>
<b>28</b>	29	25	29	1000	27,7
<b>14</b>	18	18	19	500	18,3
<b>7</b>	6	5	1	250	4,00
<b>3,5</b>	4	4	3	125	3,7
<b>1,4</b>	2	1	0	50	1,3
	0	3	1		
	2	1			
<b>0,7</b>	0	1	1	25	0,8
	2	0	1		
	1	0			

Anhand der in Tabelle 41 und 42 aufgeführten Keimzahlen lässt sich ablesen, dass die Keimzahl für jede Verdünnung nicht immer exakt getroffen werden konnte. Aus diesem Grund wurde eine große Anzahl an unterschiedlichen Inokula für den Versuch ausgewählt, um niedrige, mittlere und hohe Inokula abdecken zu können.

#### 4.5.2 Ergebnisse des Validierungs- bzw. Lebensmittelversuchs

Für den eigentlichen Lebensmittelversuch wurden die Vorverdünnungen im obenstehenden Punkt 4.5.1 beschrieben, angesetzt. Die jeweiligen Stomacher-Beutel mit dem enthaltenen Milchpulver wurden wie beschrieben angeimpft und die tatsächlich erreichten Inokula anhand von Keimzahlbestimmungen untersucht. Dabei konnten die in Tabelle 43 und 44 aufgelisteten Inokula für die flüssige Vorkultur sowie die in Laktose getrockneten Salmonellen erzielt werden. Wie bereits im Vorversuch festgestellt konnten manche Inokula nicht exakt erreicht werden. Allerdings konnte für beide Ansätze ein niedriges, mittleres und hohes Inokulationslevel untersucht werden wie es in der ISO 16140-3 vorgeschlagen wird (ISO 16140-3:2017).

**Tabelle 43: Vorverdünnung der Flüssig-Vorkultur für das Animpfen der Anfangsmilch.** Vorversuch zur Vorverdünnung der flüssigen Vorkultur. Anhand der in Tabelle 1 bestimmten Keimzahlen wurde eine Verdünnung erstellt, welche 28 KBE/ml enthalten sollte. Aus dieser Verdünnung heraus wurden alle anderen Inokula verdünnt. Die hier gezeigte Tabelle vergleicht die tatsächlich bestimmten Inokula mit den angestrebten Inokula.

Verdünnung Soll-KBE	Ermittelte Ist-KBE			Volumen [µl]	Mittelwert MW Ist-KBE
<b>28</b>	26	26	16	1000	22,7
<b>14</b>	15	16	14	500	15
<b>7</b>	4	4	3	250	3,7
<b>3,5</b>	4	3	2	125	3
<b>1,4</b>	2	3	2	50	1,2
	0	1	1		
	1	1	2		
	1	0	0		
<b>0,7</b>	1	0	0	25	0,6
	0	1	1		
	0	0	2		
	1	1	0		

**Tabelle 44: Vorverdünnung der in Laktose getrockneten Vorkultur für das Animpfen der Anfangsmilch.** Anhand zuvor bestimmten Keimzahlen wurde eine Verdünnung erstellt, welche 28 KBE/ml enthalten sollte. Aus dieser Verdünnung heraus wurden alle anderen Inokula verdünnt. Die hier gezeigte Tabelle vergleicht die tatsächlich bestimmten Inokula mit den angestrebten Inokula.

Verdünnung Soll-KBE	Ermittelte Ist-KBE			Volumen [µl]	Mittelwert MW Ist-KBE
<b>28</b>	23	27	27	1000	25,7
<b>14</b>	18	19	18	500	18,3
<b>7</b>	7	4	13	250	8
<b>3,5</b>	4	4	9	125	5,7
<b>1,4</b>	3	3	3	50	1,5
	0	1	1		
	0	0	4		
	2	1	0		
<b>0,7</b>	2	1	1	25	0,9
	0	2	1		
	1	0	0		
	0	1	2		

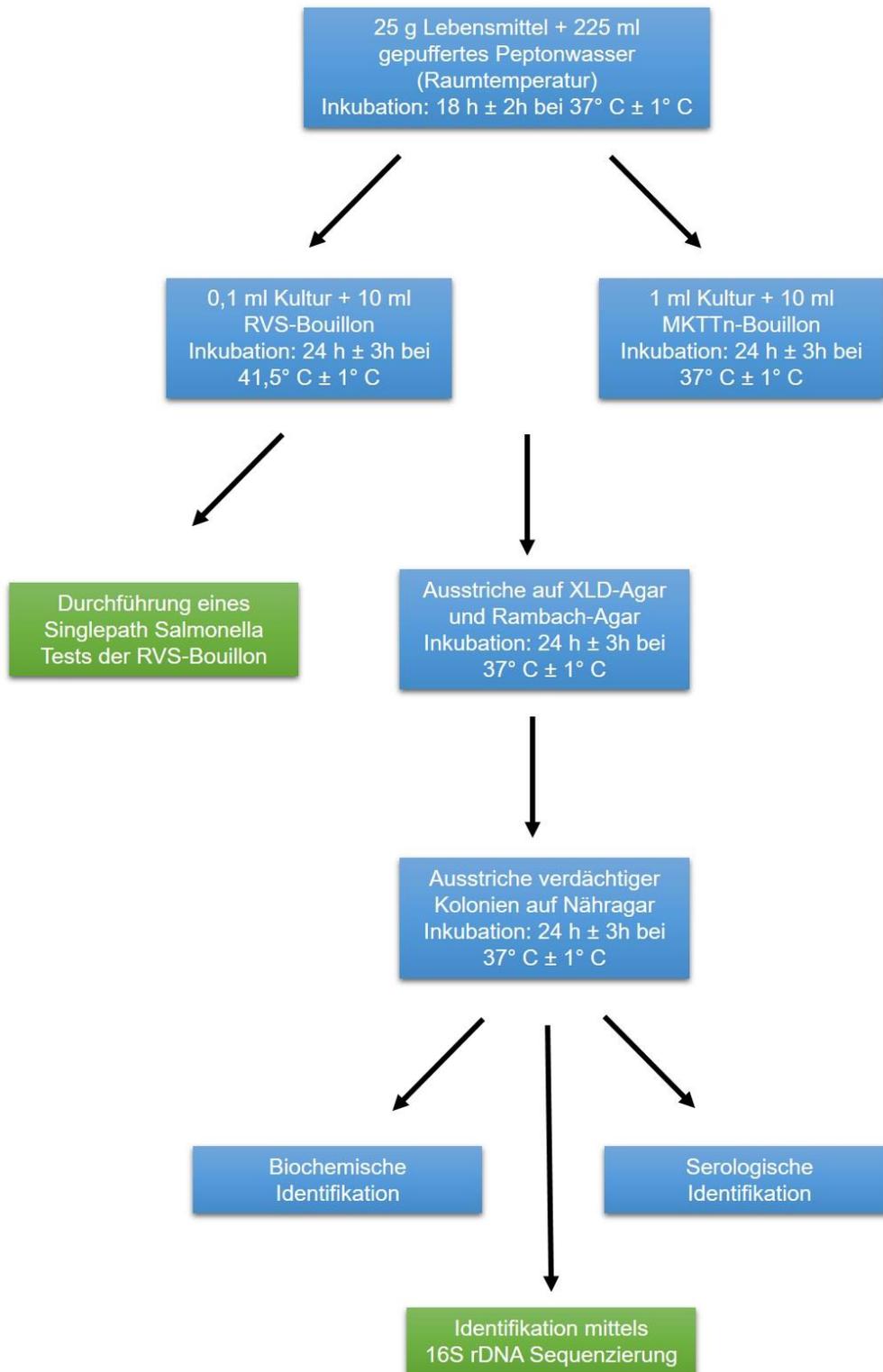
Zur Anreicherung der Milchpulverprobe mit *Salmonella* wurde nach ISO 6579 gearbeitet (ISO 6579:2002). Das Vorgehen wurde in Abbildung 29 zur Verdeutlichung graphisch dargestellt. Nach einer Anreicherung des Lebensmittels in gepuffertem

Peptonwasser folgte eine flüssige Selektivanreicherung in RVS-Bouillon und MKTTn-Bouillon. Nach dieser Selektivanreicherung wurden Ausstriche auf zwei selektiven Agarmedien, Rambach-Agar und XLD-Agar, durchgeführt. Mittels der RVS-Anreicherung wurde ebenfalls ein immunchromatographischer Singlepath-Test für Salmonellen durchgeführt. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden sowohl die Ausstriche auf Selektivnährmedien, sowie die Ergebnisse des Singlepath-Tests verwendet. Anhand der Versuchsdaten in Tabelle 45 lässt sich feststellen, dass die Untersuchungsergebnisse für die jeweiligen Singlepath-Tests, sowie die Selektivausstriche übereinstimmen. Alle Proben, welche mit der Laktose-Vorkultur angeimpft wurden konnten in der vorliegenden Untersuchung als positiv bestätigt werden, während für die Flüssigkultur die Proben 0,7 KBE 1, 0,7 KBE 2 und 3,5 KBE 1 im Singlepath-Test, sowie in den Selektivausstrichen, als negativ ermittelt wurden konnten. Dabei ist anzumerken, dass der Stomacherbeutel der Probe 3,5 KBE 1 während der Vorbereitungsphase beschädigt wurde. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das negative Ergebnis dieser Probe im Singlepath-Test, sowie den Selektivausstrichen darauf zurückzuführen ist. Alle anderen mit der Flüssigkultur artifiziell kontaminierten Proben konnten ebenfalls als positiv bestätigt werden. Für die Proben, welche mit 0,7 KBE angeimpft werden sollten, ist für die Flüssigkultur festzuhalten, dass hier tatsächlich mit etwa 0,6 KBE angeimpft wurde. Bei der Überprüfung des Inokulums konnte auf 6 ausgetropften Feldern keinerlei Wachstum festgestellt werden. Die Wahrscheinlichkeit für den Erhalt eines positiven Ergebnisses lag hier lediglich bei 45%. Für die Laktose-Vorkulturen lag das Inokulum bei 0,9 KBE. Die Inokulum-Überprüfung zeigte auf 4 ausgetropften Feldern kein Wachstum. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 59% kann hier mit einem positiven Ergebnis gerechnet werden. Für die Überprüfung einer derart niedrigen Keimzahl hätte die Untersuchung anhand von mehr Beuteln durchgeführt werden müssen, um zu garantieren, dass einige der Beutel positiv angeimpft werden. Die durchgeführten Selektivausstriche auf XLD-Agar und Rambach-Agar zeigten ein uniformes Bild für die jeweiligen Ausstriche. Dabei konnten auf den Platten keine Verunreinigungen entdeckt werden, die Ausstriche stellten sich wie Reinkulturen dar. Aufgrund dessen wurde entschieden von je einer XLD-Platten sowie einer Rambach-Platte eine Kolonie auf CASO-Agar auszustreichen und diese mittels 16S rDNA-Sequenzierung identifizieren zu lassen. Für beide Kulturen konnte als „Top Match“ *Salmonella enterica enterica* ATCC® 14028 erhalten werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Somit kann dies als

Bestätigung angesehen werden, dass es sich bei den ausgewerteten Ergebnissen tatsächlich um das ursprünglich eingesetzte Bakterium handelte. Insgesamt lässt sich sagen, dass die artifizielle Kontamination des Lebensmittels erfolgreich mit getrockneten Bakterien durchgeführt werden konnte. Die getrockneten Bakterien konnten für alle eingesetzten Inokula mit der durchgeführten Prozedur nachgewiesen werden. Im Vergleich zur verwendeten Standardmethode konnte für den Einsatz der getrockneten Bakterien ein vergleichbares Ergebnis erzielt werden.

**Tabelle 45: Gesamtübersicht Validierungsversuch.** Die unten dargestellte Tabelle zeigt die Auswertung der Singlepath-Tests aus der RVS-Bouillon, sowie die Auswertung der Selektivausstriche aus der RVS- und MKTTn-Bouillon auf Rambach-Agar und XLD-Agar. Gezeigt sind die Ergebnisse der Flüssig-Vorkultur, sowie der zuvor in Laktose getrockneten Kulturen. +: Test war positiv; -: Test war negativ bzw. +: Wachstum auf der Selektivplatte; -: kein Wachstum auf der Selektivplatte. Für das Wachstum auf Selektivplatten konnte das charakteristische Aussehen von *Salmonella enterica* ser. Typhimurium festgestellt werden.

Inokulum	Flüssigkultur Singlepath aus RVS	Flüssigkultur Selektivausstriche				Laktose Singlepath aus RVS	Laktose Selektivausstriche			
		XLD		Rambach			XLD		Rambach	
		RVS	MKTTn	RVS	MKTTn		RVS	MKTTn	RVS	MKTTn
28 KBE 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28 KBE 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14 KBE 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14 KBE 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7 KBE 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7 KBE 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3,5 KBE 1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
3,5 KBE 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,4 KBE 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,4 KBE 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,7 KBE 1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
0,7 KBE 2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Negativ- kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Positiv- kontrolle	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+



**Abbildung 29: Schema zur Vorgehensweise der kulturellen Identifizierung von Salmonellen nach ISO-Norm 6579 (ISO 6579:2002).** Nach einer nicht-selektiven Anreicherung in gepuffertem Peptonwasser erfolgt eine Selektivanreicherung in RVS-Bouillon und MKTTn-Bouillon. Aus dieser Selektivanreicherung werden Ausstriche auf Selektivnährböden (z.b. Rambach oder XLD) durchgeführt. Verdächtige Kolonien werden auf Nähragar ausgestrichen und nach erfolgreichem Wachstum biochemisch bzw. serologisch identifiziert. In der hier durchgeführten Arbeit erfolgte eine Identifikation der Bakterien mittels immunochromatographischem Singlepath-Test für *Salmonella* aus der RVS-Bouillon (grünes Feld links). Von den Selektivausstrichen wurden Ausstriche auf CASO-Agar durchgeführt und diese mittels 16S-rDNA-Sequenzierung identifiziert (grünes Feld unten).

## 5 Diskussion

### 5.1 Massenspektrometrie Detektion von Proteinen

Zur Charakterisierung der Stressreaktion auf molekularer Ebene wurden Untersuchungen mittels TMT-Labeling und Massenspektrometrie-Analyse durchgeführt. Ziel der Untersuchungen war ein Vergleich der Proteinexpression von gestressten Bakterien durch Trocknung in Laktose mit einer ungestressten Vorkultur durchzuführen. Durch das TMT-Labeling war es möglich Unterschiede in der Expression verschiedener Proteine in ungestressten und durch Laktose-Trocknung gestressten Salmonellen festzustellen. Es wurden 27 Proteine mit einer signifikant höheren, sowie 18 Proteine mit einer signifikant niedrigeren Expression in den gestressten Proben identifiziert werden ( $p < 0,05$ , fold-change  $\geq 2$ ).

#### 5.1.1 Hochregulierte Proteine

Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen in *Salmonella*, welche bei der Dehydration auftreten, liegen einige Veröffentlichungen und Studien vor. Hierbei sind unter anderem Transkriptom-Untersuchungen von *Salmonella* durch Finn et al., Deng et al., Gruzdev et al. oder Maserati et al. zu nennen (Deng et al. 2012, Gruzdev et al. 2012, Finn et al. 2013, oder Maserati et al. 2017). In diesen Studien wurden verschiedene Gene identifiziert, welche unter Trockenstress signifikant höher exprimiert werden, als es in ungestressten Zellen der Fall ist. Verglichen mit den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen konnten einige Übereinstimmungen mit den in der Literatur vorhandenen Angaben gefunden werden.

Wird *Salmonella* osmotischem Stress oder Trockenstress ausgesetzt, so kommt es zum Wasserverlust und Zusammenschrumpfen der Zelle sowie einem Anstieg der intrazellulären Metabolite und einer Reduktion der Wasseraktivität. Dieser Prozess kann eine Inhibition zellulärer Prozesse wie DNA-Replikation oder Enzymaktivität nach sich ziehen (Csonka, 1989). Um diesen Prozessen entgegenzuwirken, werden eine Reihe molekularer Mechanismen in der Zelle in Gang gesetzt. Hierzu ist die Erhöhung der Expression einiger Gene und Proteine notwendig. Dabei ist anzunehmen, dass bei Trocknungsprozessen auch noch andere Arten des Stresses auf die Zelle wirken können, wie z.B. oxidativer Stress oder Hungerstress. Es werden dabei verschiedene Gene und Proteine für unterschiedliche Arten von Stress benötigt werden (Gruzdev et al 2012; Spector & Kenyon 2012, Mandal et al. 2017).

Unter der Kategorie Transkriptionsregulation und DNA-Reparatur finden sich die beiden Proteine RecG und RpoS. Beide Proteine wurden in den getrockneten Bakterien höher exprimiert, RecG 3,6-mal höher und RpoS doppelt so hoch. Bei RpoS handelt es sich um den RNA-Polymerase Sigmafaktor  $\sigma^S$ , der vor allem für seine Induktion in der stationären Phase bekannt ist, aber auch bei anderen Arten von Stress, wie Hungerstress, osmotischem-, pH-, oder Temperatur-Stress aktiv ist (Battesti et al. 2011). RpoS wird unter exponentiellen Wachstumsverhältnissen negativ reguliert. Die Translation des Proteins wird blockiert und gebildete Proteine werden von der Zelle schnell abgebaut (Battesti et al. 2011). Unter Stressbedingungen bzw. dem Eintritt in die stationäre Phase steigt die Konzentration von RpoS in der Zelle schnell an und ist für die Regulation vieler unterschiedlicher Gene verantwortlich bzw. mitverantwortlich, welche für die Adaption der Zelle an den Stress eine wichtige Rolle spielen (Fischer et al. 1998; Navarro Llorens et al. 2010). Der Sigmafaktor selbst wird durch andere Kontrollsysteme und Botenstoffe, die an der Detektion von sich ändernden Umweltbedingungen beteiligt sind, aktiviert (Battesti et al. 2011). So wurden unter anderem in *Escherichia coli* die Signalmoleküle ppGpp und pppGpp, welche bei Nährstoffmangel gebildet werden, als Aktivator von RpoS detektiert (Battesti et al. 2011). Ein weiteres Beispiel für einen Aktivator wäre das Zweikomponentensystem BarA-UvrY aus *Escherichia coli* zu nennen, welches für die Umstellung von Glykolyse auf Gluconeogenese verantwortlich ist (Pernestig et al. 2003; Battesti et al. 2011). In *Escherichia coli* wurde entdeckt, dass sich mehr als 10% der Gene unter einer positiven Kontrolle von  $\sigma^S$  befinden (Battesti et al. 2011, Lévi-Meyrueis et al. 2014). Neue Erkenntnisse gehen davon aus, dass einige Gene durch  $\sigma^S$  negativ reguliert werden und der Sigmafaktor auch an der posttranskriptionalen Modifikation beteiligt ist (Lévi-Meyrueis et al. 2014; Lago et al. 2017). Der Sigmafaktor  $\sigma^S$  ist an der Regulation von Genen des Energiestoffwechsels, der Transkription, der Signaltransduktion sowie der Membran Biogenese beteiligt. Die Funktion einiger regulierter Gene und Proteine ist noch unbekannt (Lévi-Meyrueis et al. 2014). Im Bereich des Energiestoffwechsels stehen Gene aus der Glykolyse, dem Pentose-Phosphatweg, dem Phosphotransferasesystem, der gemischten Säuregärung und dem Acetat-Stoffwechsel unter der positiven Kontrolle von  $\sigma^S$ , während Gene des Citratzyklus, der NADH-Dehydrogenase und ATP-Synthase herunterreguliert werden (Lévi-Meyrueis et al. 2014). Es wird angenommen, dass  $\sigma^S$  Gene aktiviert, welche für die Vermeidung oder Reparatur von oxidativem Stress

zuständig sind, wie z.B. Katalase, Superoxid-Dismutase, Fe-S-Reparaturproteine wie *dps* oder *sufABCDSE* (Lévi-Meyrueis et al. 2014). Gleichzeitig werden Gene der Atmungskette negativ reguliert, um eine Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zu vermindern. Des Weiteren werden Gene für die Akkumulation und Produktion von Osmoprotektoren wie Trehalose aktiviert (Lévi-Meyrueis et al. 2014). In einigen Studien wurde der Sigmafaktor  $\sigma^S$  ebenfalls nach der Trocknung von *Salmonella* induziert. Hier zu nennen ist die Studie von Aviles et al., bei der *Salmonella enterica* ser. Tennessee in Milchpulver getrocknet und gelagert wurde, sowie die Studie von Chen & Jiang zur Trocknung von *Salmonella enterica* ser. Typhimurium auf Hühnerabfällen (Aviles et al. 2013; Chen & Jian 2017). Auch nach einem Schock in 0,3 M NaCl konnte eine Induktion des Genes *rpoS* nachgewiesen werden (Balaji et al. 2005). In vielen Studien zur Untersuchung des Transkriptoms von *Salmonella* unter Trockenstress, wird der Sigmafaktor  $\sigma^S$  unter den hochregulierten Genen nicht aufgeführt (Mandal & Kwon 2017; Finn et al. 2013; Deng et al. 2012; Li et al. 2012; Gruzdev et al. 2012). In einigen dieser Studien wurden stattdessen die Gene anderer Sigmafaktoren mit einer erhöhten Expression in den gestressten Bakterien detektiert. Hierzu gehören z.B. *rpoE*, *rpoD*, *rpoN* oder *rpoH* (Gruzdev et al. 2012; Deng et al. 2012, Finn et al. 2013, Mandal & Kwon 2017). In der vorliegenden Arbeit wurden RpoE, RpoN und RpoD ebenfalls nachgewiesen, zeigten im Vergleich in gestressten Salmonellen aber keine stark höhere Expression als in den ungestressten Salmonellen (siehe Rohdaten auf beigefügter CD). Es kann hier spekuliert werden, ob dieser unterschiedliche Nachweis von RpoS sowie der anderen Sigmafaktoren an der Durchführung der Experimente liegen kann sowie an der Art des Stresses (Chen & Jiang 2017; Maserati 2017). Es sind noch nicht alle Mechanismen der Stressreaktion in Bakterien geklärt. Einige wichtige Proteine und Gene spielen auch unter verschiedenen Stressbedingungen eine Rolle. Hier wäre beispielsweise der Sigmafaktor RpoS zu nennen, der unter Säurestress, aber auch bei Temperatur- oder osmotischem Stress aktiviert wird (Battesti et al. 2011). Was für manche Proteine oder Gene am Ende den Ausschlag gibt, damit es zur Transkription und Translation kommt, muss für viele dieser Proteine und Gene noch immer abschließend geklärt werden.

Zu den hochregulierten Proteinen in der gestressten Probe gehört die Adenylat-Cyclase (*cyaA*). In der Veröffentlichung von Spector & Kenyon von 2012 wird die Adenylat-Cyclase im Zuge der Stressantwort bei Hungerstress beschrieben (Spector & Kenyon 2012). Bei Glukosemangel im Medium kommt es zu einer

gesteigerten Expression der Adenylat-Cyclase, welche im Folgenden cAMP produziert, sowie das Rezeptorprotein CRP. Durch die Bildung eines cAMP-CRP-Komplexes können verschiedene Gene aktiviert werden, welche am Transport und der Verwendung alternativer Kohlenhydrat-Quellen beteiligt sind (Spector & Kenyon 2012). In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine doppelt so hohe Expression der Adenylat-Cyclase festgestellt werden, im Vergleich zur ungestressten Probe. Dabei ist anzumerken, dass auch das cAMP-regulierende Protein (CRP) in der Massenspektrometrie-Analyse identifiziert werden konnte, mit einem 1,2-fachen Anstieg der Expression (siehe Rohdaten auf beigefügter CD.). Der Anstieg des Proteins in der Zelle lässt darauf schließen, dass die Zelle zusätzlich zum osmotischen Stress auch noch einem Mangel an verfügbaren Kohlenhydraten ausgesetzt ist und daher gezwungen ist, alternative Kohlenhydratquellen zu verwenden. In verschiedenen Studien zur Transkriptom-Analyse von *Salmonella* unter Trockenstress konnte die Adenylat-Cyclase nicht detektiert werden (Deng et al. 2012, Li et al. 2012, Gruzdev et al. 2012, Finn et al. 2013, Chen & Jiang 2017, Mandal & Kwon 2017).

Die Funktion der ATP-abhängige Helikase RecG ist die DNA-Reparatur und Rekombination (Mahdi et al. 1997). So ist RecG am genetischen Austausch von Informationen über Holliday-Strukturen („Branch-Migration“) bei der Rekombination beteiligt und kann eine Reihe von anderen DNA-Strukturen wie D-Loops oder R-Loops entwinden (Rudolph et al. 2010). Die Rekombination ist ein wichtiger Schritt zur Reparatur der DNA z.B. bei Doppelstrangbrüchen (Lloyd & Buckman 1991). In einer Studie von Yeom & Park von 2012 wurde die Möglichkeit einer Regulatorfunktion von RecG diskutiert. Das Gen *recG* befindet sich laut Studie bei *Pseudomonas* auf demselben Operon wie das *oxyR*-Gen. OxyR ist ebenfalls ein Genregulator und für die Aktivierung von Genen bei oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid zuständig (Yeom & Park 2012). Dabei wird angenommen, dass RecG zur Linearisierung der DNA benötigt wird, damit OxyR im Folgenden die Transkription der jeweiligen Stressgene aktivieren kann (Yeom & Park 2012). Auch wurde für RecG die Fähigkeit zur alleinigen Beeinflussung der Expression verschiedener Gene mit palindromischer Sequenz angegeben (Yeom & Park 2012). Somit könnte RecG nicht nur eine Rolle in der Reparatur und Rekombination der DNA spielen, sondern auch direkt an der Stressantwort beteiligt sein. In der vorliegenden Arbeit konnte auch der Regulator OxyR in der Massenspektrometrie-Analyse nachgewiesen werden. Dieser zeigte allerdings keine signifikant höhere Expression, als in den gestressten Zellen ( $p > 0,05$ ).

Es ist somit anzunehmen, dass RecG in den durchgeführten Versuchen eine andere Funktion erfüllt, welche durch weitere Untersuchungen geklärt werden müsste. Es lag vermutlich ein oxidativer Stress vor, welcher die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und eine Schädigung der DNA nach sich gezogen hat. Zur Reparatur dieser Schäden mittels Rekombination wäre eventuell ein Expressionsanstieg von RecG nötig.

Infolge von osmotischem Stress werden anorganische Ionen wie K<sup>+</sup>-Ionen bzw. kompatible Solute wie Prolin, Betain, Glycin-Betain oder Trehalose in der Zelle angesammelt. Diese werden entweder aus dem Medium in die Zelle aufgenommen oder in der Zelle synthetisiert (Spector & Kenyon 2012). Der erste Schritt zum Schutz der Zelle ist die Anreicherung von K<sup>+</sup>-Ionen zusammen mit dem passenden Gegenion Glutamat in der Zelle (Riedel & Lehner 2007; Spector & Kenyon 2012). Dieser K<sup>+</sup>-Ionen-transport erfolgt durch zwei K<sup>+</sup>-Transportsysteme, welche durch die Gene *kdpABC* und *trk* kodiert werden (Spector & Kenyon 2012). Diese Reaktion tritt bereits nach wenigen Minuten ein und stellt eine kurzzeitige Lösung zur Stabilisierung der Zelle dar, welche im Folgenden durch die Akkumulation kompatibler Solute wie z.B. Trehalose, Prolin oder Betain abgelöst wird (Sleator & Hill 2001; Riedel & Lehner 2007; Spector & Kenyon 2012). Zum Transport dieser Osmoprotektoren in die Zelle werden verschiedene Transportsysteme benötigt. Die Aufnahme von Proline, sowie Glycin-Betain werden durch die Transporter ProP (*proP*) und ProU (*proVWZ*) reguliert (Spector & Kenyon 2012, Finn et al. 2013). Trehalose wird dagegen, mittels Kondensation von Glucose-6-Phosphat und Uridin Diphosphat-Glucose zu Trehalose-6-Phosphat mit Dephosphorylierung zu Trehalose, in der Zelle selbst hergestellt (Csonka, 1989). Diese Reaktionen werden durch die Produkte der Genprodukten der Gene *otsA* und *otsB* katalysiert (Finn et al. 2013). In Studien zur molekularen Charakterisierung von Stress durch Trocknung konnten über Transkriptom-Analysen verschiedene Gene zum Transport von Osmoprotektoren in die Zelle identifiziert werden. Hier sind unter anderem *otsAB*, *proXVW*, *proP* oder *osmVWXY* zu nennen (Li et al. 2012; Finn et al. 2013). In diesen Studien wurden die Zellen auf rostfreiem Stahl unter einer Laminar Flow für 4 h bei Raumtemperatur bzw. auf sterilen Filterdisks in einem Exsikkator für 2 h bei Raumtemperatur getrocknet (Li et al. 2012; Finn et al. 2013). In vergleichbaren Studien von Gruzdev et al. 2012 und Maserati et al 2017 konnte dagegen eine höhere Expression der oben genannten Gene in getrockneten Zellen nicht gezeigt werden. Die Bakterien in diesen Studien wurden in Petrischalen bei 25°C für 22 h bzw. auf Polycarbonat-Filtern für 24 h bei Raumtemperatur in einer

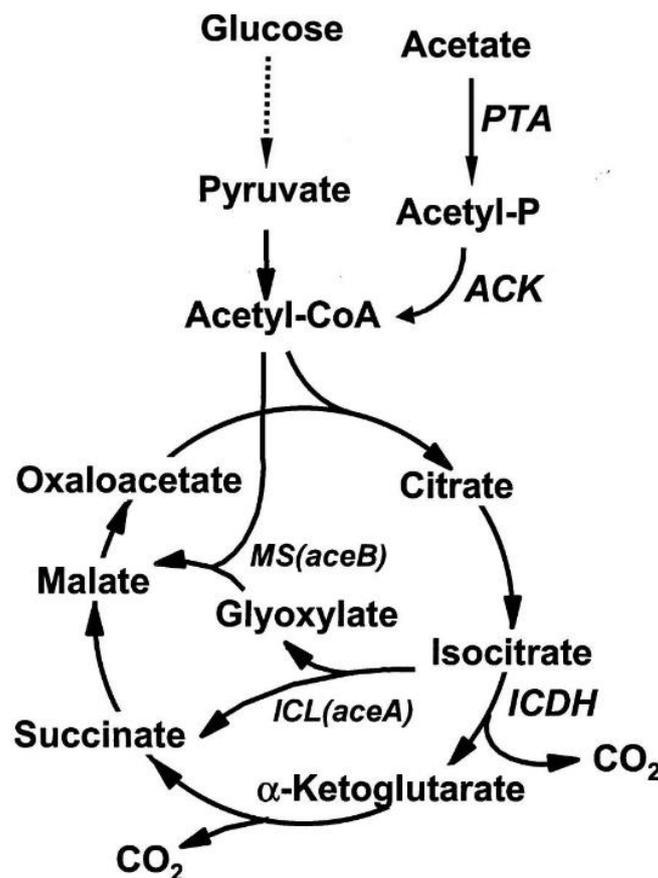
Sicherheitswerkbank getrocknet (Gruzdev et al. 2012; Maserati et al. 2017). In der vorliegenden Arbeit konnten in Bezug auf den Schutz der Zelle durch osmotischen Stress zwei Produkte der Gene *proV* und *proW* zum Transport von Prolin und Glycin-Betain in die Zelle mit einer erhöhten Expression in den Trockenstress-Proben identifiziert werden (Csonka 1989; Finn et al. 2013). Die Änderung der Expression lag dabei bei 2,2 bzw. 2,4. Auch die, für die Akkumulation von kompatiblen Soluten wichtigen Proteine Trk, sowie ProP, OtsB und OtsA konnten in der Massenspektrometrie-Analyse identifiziert werden (siehe Rohdaten auf beigefügter CD). Dabei ist anzumerken, dass der Expressionsunterschied dieser Proteine lediglich zwischen 1,2 – 1,6 lag und diese Proteine deshalb nicht in Tabelle 25 aufgeführt wurden. Aufgrund des Vorhandenseins verschiedener Transporter bzw. Proteine zur Biosynthese von Osmoprotektoren, sowie deren erhöhte Expression in getrockneten Zellen ist anzunehmen, dass die Zelle versucht, den Verlust des Wassers bei der Trocknung durch die Ansammlung von Osmoprotektoren auszugleichen (Lebre et al. 2017). Die Proteine für den Transport von K<sup>+</sup>-Ionen konnten in der Massenspektrometrie-Analyse nicht identifiziert werden. Vergleiche mit der Literatur zeigen deutlich, dass Unterschiede in der Durchführung der Trocknung auch eine unterschiedliche Gen- bzw. Proteinexpression zur Folge haben können. So zeigte sich bei Gruzdev nach 24 h Trocknung eine sehr hohe Expression des *kdpABC*-Systems, während keine erhöhte Expression der Gene von Prolin bzw. Glycin-Betain Transporter wie ProV oder ProU oder für die Biosynthese von Trehalose (*otsAB*) festgestellt werden konnten (Gruzdev et al. 2012). Bei Maserati konnte weder eine erhöhte Expression des *kdpABC*-Systems, *otsAB*, *proXVW*, *proP* festgestellt werden (Maserati et al. 2017). In der Studie von Li wurde eine erhöhte Expression der Gene *proXVW* sowie *otsB* festgestellt (Li et al. 2012). Bei den Untersuchungen von Finn konnten die Gene *proXVW*, *proP* und *otsAB* mit einer erhöhten Expression in getrockneten Zellen identifiziert werden (Finn et al. 2013). Als Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse sind einerseits die verschiedenen Materialien anzubringen, auf denen die Bakterien getrocknet wurden (Filter, rostfreier Stahl, Petrischalen), sowie die unterschiedliche Dauer der Trocknung (2 h – 24 h). Als weiterer Punkt ist das Medium anzuführen, in dem sich die Bakterien vor der Trocknung befunden haben. In den Studien von Gruzdev sowie Maserati wurden die Bakterien vor der Trocknung mit Wasser gewaschen, während die Bakterien in den Studien von Li und Finn vor der Trocknung in PBS bzw. CASO gehalten wurden

(Gruzdev et al. 2012; Li et al. 2012; Finn et al. 2013, Maserati et al. 2017). In der hier vorliegenden Arbeit befanden sich die Zellen vor der Trocknung in gepuffertem Peptonwasser. Es wurde bereits beschrieben, dass die Verwendung von isotonischen Medien einen Einfluss auf derartige Experimente haben kann (Gruzdev et al. 2012; Maserati et al. 2017). Auch befinden sich in Nährmedien verschiedene Verbindungen und Komponenten, welche für das Wachstum und auch den Schutz von Bakterien verwendet werden können und somit potenziell die Transkription verschiedener Gene aktivieren können. Diese sind in deionisiertem Wasser nicht zu finden (Maserati et al. 2017). Während des fortschreitenden Trocknungsprozesses ist es möglich, dass die Zellen aus dem vorhandenen Umgebungsmedium Stoffe aufnehmen könnten. Zum nicht Vorhandensein der Proteine des *kdpABC*-System in der vorliegenden Arbeit lässt sich argumentieren, dass das System laut Angaben in der Literatur, das erste System ist, welches bei einem osmotischen Schock aktiviert wird. Es wird angegeben, dass das *kdp*-System mit fortschreitender Dauer des osmotischen Stresses durch andere Systeme zur Akkumulation von kompatiblen Soluten wie z.B. ProU oder OtsAB abgelöst wird (Sleator & Hill 2001; Riedel & Lehner 2007; Spector & Kenyon 2012). Dadurch lässt sich für die Abwesenheit der Proteine in der vorliegenden Arbeit die lange Trocknungszeit angeben, welche bei 24 h lag. Dadurch kann das Kdp-System möglicherweise schon durch die anderen Systeme wie ProU, ProV oder OtsAB abgelöst worden sein. Dagegen spricht das Vorhandensein einer erhöhten Expression von *kdpABC* in der Studie von Gruzdev nach der Trocknung von 24 h (Gruzdev et al. 2012). Auch wurde bereits ein alternatives Modell zur bakteriellen Stressreaktion bei Trockenstress in Betracht gezogen. Hier wird angegeben, dass die Ionenkonzentration in der Zelle die Expression der Gene für die osmotische Stressantwort reguliert und nicht das *kdp*-System (Balaji et al. 2005). Auch wurde festgestellt, dass nach einem Schock mit NaCl die ersten induzierten Gene, die Gene für Prolin und Betain-Transporter waren (Balaji et al. 2005). Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit nur zwei Proteine zum Transport von Osmoprotektoren in die Zelle gefunden. Andere Proteine wie Trk, ProP, OtsB und OtsA waren in deutlich geringeren Konzentrationen vorhanden (fold-change < 2, siehe Anhang). Da die Zelle sich nach einiger Zeit an den Stress adaptiert, werden möglicherweise auch einige Stressproteine nicht mehr benötigt bzw. durch andere abgelöst (Deng et al. 2012; Maserati 2017, S. 154). So wurde beispielsweise für die Sigmafaktoren RpoS und RpoE unter Hungerstress eine unterschiedliche hohe Expression in den Zellen zu

verschiedenen Zeitpunkten angegeben (Spector & Kenyon 2012). Je nach Aufbau und Durchführung des Experiments können sich Unterschiede zwischen einzelnen Studien ergeben, die einen signifikanten Einfluss auf die Reaktion der bakteriellen Zelle haben können (Chen & Jiang 2017). In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Veränderung im Proteom von *Salmonella* bei Trockenstress angestellt, während in den meisten hier verwendeten Vergleichsstudien Transkriptom-Untersuchungen durchgeführt wurden. Auch dies stellt einen Unterschied dar, welcher einen Einfluss auf die Ergebnisse haben kann.

Im Zuge der Trocknung kann es innerhalb der Zelle zu einer Umstellung des Energie- und Kohlenhydrat-Stoffwechsels aufgrund von „Hungerstress“, ausgelöst durch einen Mangel an Kohlenstoff, Phosphat oder Stickstoff, kommen (Spector & Kenyon 2012). Auch durch die Nutzung von Glucose zur Bildung von Trehalose als Osmoprotektor kann ein Mangel an Glucose in der Zelle entstehen und die Verwendung anderer Energiequellen nötig machen (Finn et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine PrpC und PrpB mit einer erhöhten Expression von 2,1 und 2,8 in den gestressten Proben identifiziert. Hierbei handelt es sich um Proteine, welche im Propionat-Katabolismus oder 2-Methylcitrat-Pfad angesiedelt und auf dem *prpBCDE* Operon kodiert sind (Kuk Lee et al. 2005). Sie ermöglichen das Wachstum der Zelle auf Propionat als alleiniger Kohlenstoffquelle (Kuk Lee et al. 2005). Eine mögliche positive Regulation von *prpBCDE* durch cAMP-CRP wurde bereits beschrieben (Lee et al. 2005). Weiterhin wurde das Protein AceB mit einem signifikanten Anstieg der Expression um 2,1 in der Massenspektrometrie-Analyse erkannt. Zusammen mit AceA, welches in der vorliegenden Untersuchung mit einem Expressionsanstieg von 1,7 (siehe Rohdaten auf beigefügter CD), ebenfalls identifiziert wurde, ist AceB ein Teil des Glyoxylat-Shunt Pfades. Der Glyoxylat-Shunt-Zyklus (GS) ist ein Zwei-Schritte-Zyklus, welcher als Alternative für einige Schritte des Tricarbonsäurezyklus dient, den Verlust von Kohlenstoff verhindert und weniger NADH und CO<sub>2</sub> produziert (Kim et al. 2004; Rui et al. 2010; Ahn et al. 2016; Gruzdev et al. 2012). Dies soll vermutlich auch die Bildung reaktiver Komponenten und Sauerstoffspezies verhindern und somit den oxidativen Stress minimieren (Rui et al. 2010; Gruzdev et al. 2012). Verwendet werden Acetat und Fettsäuren als Kohlenhydratquelle (Ahn et al. 2016). Im Vergleich zu Glukose kann durch den Abbau von Fettsäuren mehr ATP pro Kohlenstoffatom gewonnen werden (Li et al. 2013). Der GS-Zyklus kann durch oxidativen Stress, eine Limitation der Kohlenstoffquelle, Antibiotika-Stress oder im Zuge der Wirtsinfektion

hochreguliert werden (Ahn et al. 2016). Die Isocitrat-Lyase AceA katalysiert dabei die Bildung von Glyoxylat und Succinat aus Isocitrat, während im nächsten Schritt Glyoxylat von der Malat-Synthase AceB in Malat umgewandelt wird (Ahn et al. 2016). Succinat kann über mehrere Schritte wieder in die Gluconeogenese einfließen (Ahn et al. 2016). Abbildung 30 verdeutlicht die Umgehung einzelner Schritte des Citratzyklus durch den Glyoxylat-Shunt-Zyklus.



**Abbildung 30: Glyoxylat-Shunt-Stoffwechselweg (Kim et al. 2004).** Der Glyoxylat-Shunt-Stoffwechselweg umgeht Schritte des Citratzyklus durch den Einsatz der Proteine AceA und AceB. Die Isocitrat-Lyase AceA katalysiert dabei die Bildung von Glyoxylat und Succinat aus Isocitrat, während im nächsten Schritt Glyoxylat von der Malat-Synthase AceB in Malat umgewandelt wird. Abkürzungen: ACK: Acetatkinase; ICDH: Isocitratdehydrogenase; ICL: Isocitrat-Lyase; MS: Malatsynthase; PTA: Phosphotransacetylase; CoA: Coenzym A.

Ebenfalls hochreguliert wurde in den gestressten Bakterien das Enzym Transaldolase (*talA*), welches ein Teil des nicht-oxidativen Pentosephosphatweges ist und nachweislich unter osmotischem Stress hochreguliert wird (Weber et al. 2006). Es katalysiert die Übertragung von Dihydroxyaceton eines Ketose-Donors (z.B. Fructose-6-Phosphat) auf einen Aldehyd-Akzeptor (z.B. D-Erythrose-4-

Phosphat) (Samland et al. 2012). Das Gen *aldB* kodiert eine Aldehyd-Dehydrogenase, welche ebenfalls unter Trockenstress hochreguliert wurde. Es sind verschiedene Aldehyd-Dehydrogenasen in Bakterien bekannt, deren Gemeinsamkeit die Oxidation von Aldehyden in ihre Säureform ist (Xu & Johnson 1995). Eine Hochregulation des Gens *aldB* beim Übergang des bakteriellen Wachstums in die stationäre Phase, wurde bereits beschrieben (Xu & Johnson 1995). Hier wurde ebenfalls eine mögliche Funktion bei der Umsetzung von Aldehyden zur Entgiftung der Zelle in dieser Phase dargestellt (Xu & Johnson 1995). In weiteren Veröffentlichungen wird angenommen, dass es bei vorliegendem oxidativem Stress zu einer Hochregulierung von Aldehyd-Dehydrogenasen, nicht nur in Bakterien, sondern auch in Pflanzen, Säugetieren oder Hefen kommen kann (Singh et al. 2013). Vermutet wird, dass es durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zu einer Schädigung der Zelle kommen kann. Dabei ist eine der häufigsten Angriffspunkte dieser reaktiven Spezies die Lipidmembran, welche durch Peroxidation abgebaut werden kann (Everse & Hsia 1997). Einige dieser Abbauprodukte können Aldehyde darstellen, welche sehr reaktiv sein und Zellkomponenten wie Proteine oder die DNA schädigen können (Lebre et al. 2017). Es wird daher angenommen, dass das Vorhandensein von Aldehyd-Dehydrogenase dem Abbau dieser reaktiven Aldehyde und der Minimierung von oxidativem Stress entgegen wirkt (Kashmiri & Mankar 2014; Singh et al. 2013). Das Gen *yghA* codiert eine Oxidoreduktase, welche in den durchgeführten Untersuchungen in den gestressten Proben um den Faktor 2,1 höher exprimiert wurde als in den ungestressten Proben. Oxidoreduktasen katalysieren den Transfer von Elektronen von einem Elektronen-Donor auf einen Elektronenakzeptor. Über die nachgewiesene Oxidoreduktase YghA aus *Salmonella* konnten in der Literatur nur wenige Angaben gefunden werden. In *Escherichia coli* und *Salmonella Typhimurium* zeigte sich, dass die Oxidoreduktase YghA für die Freisetzung von Protonen zur Senkung des pH-Wertes in der Zelle, bei osmotischem bzw. pH-Stress verantwortlich ist (Chakraborty et al. 2017). Dies könnte im Zusammenhang mit der bereits beschriebenen Alkalisierung des Cytoplasmas durch den osmotischen Stress stehen (Csonka 1989; Weber et al. 2006; Kocharunchitt et al. 2014). In den angegebenen Vergleichsstudien wurden manche der hier erwähnten Gene ebenfalls hochreguliert. So zeigte sich bei Li et al. die Hochregulation der Gene *prpBCDE* und *aceABK*, sowie bei Gruzdev et al. die erhöhte Expression von *aceAB* (Li et al. 2012; Gruzdev et al. 2012). Auch in *Escherichia coli* unter Glucose-Limitation zeigte sich

eine erhöhte Expression von *prpBCDE*, der Malat-Synthase sowie der Aldehyd-Dehydrogenase. Im Vergleich wurde hier die Isocitrat-Dehydrogenase herunterreguliert (Alessandro & Egli 2006). Dies lässt vermuten, dass unter Trockenstress sowie unter Nährstofflimitation einige der in dieser Arbeit detektierten Proteine eine wichtige Rolle im Schutz der Zellen bei der Adaption an Stresskonditionen spielen. Dabei dienen die hier beschriebenen Proteine einerseits der Verwendung alternativer Kohlenhydratquellen, aber vermutlich auch dem Schutz der Zellen vor reaktiven Spezies, welche die Zellkomponenten schädigen könnten.

Mit einer doppelt so hohen Expression in den gestressten Zellen wurde das Protein Dps nachgewiesen. Das Gen *dps* konnte ebenfalls bei einer Untersuchung von Deng & Zhang mit einer erhöhten Expression in *Salmonella* nachgewiesen werden. Die Bakterien wurden in dieser Studie getrocknet und in Erdnussöl eingemischt gelagert (Deng & Zhang 2012). Auch in der Dissertation von Maserati 2017 war die Transkription von *dps* in getrockneten Salmonellen erhöht. Bei Dps handelt es sich um ein DNA-bindendes Schutzprotein bei Hungerstress, welches nachweislich bei oxidativem Stress oder Hungerstress hochreguliert wird (Zhao et al. 2002; Ah Young et al. 2007). Dem Protein wird eine Schutzfunktion der DNA zugeschrieben. Beobachtet wurde eine Bindung des Proteins an die DNA und eine Senkung von Doppelstrang-Brüchen durch reaktive Sauerstoffspezies, hervorgerufen durch eine Abschirmung der DNA mittels Kondensation (Martinez & Kolter 1997; Wolf et al. 1999; Halsey et al. 2004). Weiterhin wurde für *Escherichia coli* gezeigt, dass es sich bei Dps um ein Protein mit Ferritin-ähnlicher Funktion, der Fähigkeit zur Eisenbindung handelt (Zhao et al. 2002). Dps ist in der Lage Fe(II) zu oxidieren und im Kern zu binden. Die Reaktion wird dabei durch Wasserstoffperoxid getrieben, anstelle von Sauerstoff. Dadurch wird sowohl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsumiert und oxidativer Schaden der Zelle durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Fenton-Reaktionen verhindert (Zhao et al. 2002). In der Studien von Deng et al. 2012 wurde das Gen *dps* bei der Lagerung trocken-gestresster Salmonellen in Erdnussöl ebenfalls detektiert. Bei Maserati zeigte sich eine höhere Expression von *dps* in getrockneten Bakterien (Maserati 2017). Im Vergleich dazu zeigte sich bei Chen & Jiang keine höhere Regulation von *dps* in getrockneten Salmonellen (Chen & Jiang et al. 2017). In keiner der anderen verwendeten Veröffentlichungen wurde das Protein Dps ausdrücklich erwähnt (Gruzdev et al. 2012; Li et al. 2012; Finn et al. 2013; Mandal & Kwon 2017). Somit muss die Frage geklärt werden, wieso das Protein in der vorliegenden Untersuchung in getrockneten Salmonellen höher exprimiert wird, in

anderen durchgeführten Studien zur Trocknung von *Salmonella* jedoch nicht. Es kann vermutet werden, dass Dps in der vorliegenden Studie höher exprimiert wird, aufgrund vorliegender reaktiver Verbindungen, welche eventuell Schaden an der DNA verursachen können. Diese Aussage kann durch das Vorhandensein einiger anderer Proteine wie AceAB und AldB gestützt werden, da diesen Proteinen eine Funktion beim Schutz der Zelle gegen reaktive Verbindungen zugesprochen wird (Rui et al. 2010; Gruzdev et al. 2012; Singh et al. 2013; Kashmiri & Mankar 2014). Auch die erhöhte Expression der ATP-abhängige Helikase RecG, welche für die Reparatur der DNA zuständig ist und auch an der Stressantwort bei oxidativem Stress beteiligt ist, spricht für diese These (Mahdi et al. 1997; Yeom & Park 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurden auch einige Proteine mit unbekannter Funktion detektiert. Zu einigen dieser Proteine konnten in der Literatur Angaben über ihre mögliche Funktion gefunden werden. So wurde für das Protein YgaM eine Veröffentlichung gefunden, welche die Ähnlichkeit zu einem Ribosom-bindenden Protein YqjD aus *E. coli* nahe legt (Yoshida et al. 2012). Das *ygaM*-Gen steht wahrscheinlich unter der Kontrolle von  $\sigma^S$  und wurde auch in der Veröffentlichung von Weber et al. 2005 bei Wachstum in der stationären Phase, Salz- und pH-Stress aktiviert. In derselben Veröffentlichung wurden ebenfalls die Gene *yciF*, *ygaU* und *yeaG* identifiziert, welche auch in dieser Arbeit detektiert werden konnten. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Gene, welche ebenfalls unter der Kontrolle von  $\sigma^S$  stehen (Ibanez-Ruiz et al. 2000; Weber et al. 2005). Das Gen *ygdI* wurde in einer Untersuchung zum Überleben von *Salmonella enterica* ser Enteritidis in Eiklar identifiziert (Clavijo et al. 2006). Da die genauen Funktionen der gefundenen hypothetischen und unbekanntenen Proteine noch nicht aufgeklärt wurden, ist es nötig weitere Versuche zu deren Funktion und ihrer Rolle in der Stressantwort durchzuführen. Viele Mechanismen in Bakterien sind noch nicht aufgeklärt und es bedarf weiterer Untersuchungen.

Im Vergleich zu anderen Veröffentlichungen konnten in der vorliegenden Arbeit einige Proteine nachgewiesen werden, die auch in anderen Veröffentlichungen unter Trockenstress bei *Salmonella* nachgewiesen wurden. Nichtsdestotrotz finden sich in dieser Arbeit auch Proteine, welche in anderen Studien zum Transkriptom oder Proteome von getrockneten Salmonellen nicht erwähnt werden. Dies mag unter anderem an der unterschiedlichen Durchführung der Versuche liegen, welche einen

Einfluss auf die Reaktion der Bakterien haben kann (Maserati 2017). Hier zu nennen sind die Dauer und Art der Trocknung sowie die vorherige Behandlung der Bakterien vor der Trocknung, die Rehydration der Zellen und auch der Zeitpunkt der Untersuchung (Gruzdev et al. 2011; Maserti et al. 2017). Auch wurden in dieser Arbeit Proteine detektiert, während es sich in vielen anderen Untersuchungen um Transkriptom-Untersuchungen gehandelt hat. Dabei kann nicht davon ausgegangen werden, dass die transkribierte mRNA mit den translatierten Proteinen übereinstimmt (Mehra et al. 2003, Follman et al. 2009; Fränzel et al. 2010;). Es wurden in verschiedenen Untersuchungen bereits Unterschiede zwischen Transkriptom- und Proteomprofil in gestressten Bakterien entdeckt, welche auf Regulationsmechanismen während der Transkription, post-Transkription, Translation und post-Translation zurückzuführen sein können (Fränzel et al. 2010; Follman et al. 2009). Für gestresste Bakterien wurde auch eine deutlich höhere Proteolyse-Rate detektiert, im Vergleich zu Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase. Proteine werden also wesentlich schneller abgebaut und umgesetzt (Michalik et al. 2009; Trötschel et al. 2013). Auch Proteine, welche keine Funktion in der Zelle mehr erfüllen, können z.B. unter Hungerstress abgebaut werden (Michalik et al. 2009). In Untersuchungen von Deng et al. wurde das Transkriptom von getrockneten Salmonellen untersucht, welche in Erdnussöl gelagert wurden. Hier wurde nach einer Lagerdauer von 216 und 512 h eine deutliche Abnahme der Transkriptionsrate in den gestressten Bakterien detektiert. Die Zellen sind in eine Phase der physiologischen Dormanz übergegangen (Deng et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit kann keine genaue Aussage getroffen werden, ob es bereits nach der Einmischung der Bakterien in die Laktose zu einem osmotischen Effekt gekommen ist bzw. ab welchem Zeitpunkt sich die Trocknung tatsächlich auf die Bakterien und ihren Stoffwechsel ausgewirkt hat. Es ist möglich, dass es nach der langen Trocknungszeit von 24 h bereits zu einer Adaption der Bakterien gekommen ist und daher nicht mehr alle, in anderen Veröffentlichungen beschriebenen Proteine, nachgewiesen werden konnten. Daher wäre es in weiteren Versuchen notwendig, die Wasseraktivität der Laktose vor und während der Trocknung zu bestimmen, um einen Anhaltspunkt zu haben, wann der Trocknungsprozess für die Bakterien einsetzt. Probennahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten sowie eine anschließende Proteinanalyse wären sinnvoll, um Unterschiede während der Trocknungsphase zu erkennen und mehr Einblick in die Adaption der Bakterien zu erhalten. Letztlich ist die Stressantwort in Bakterien ein

komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren, die noch nicht vollständig verstanden ist. Über viele Vorgänge kann daher nur spekuliert werden und es müssen weitere Untersuchungen folgen.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich, dass *Salmonella* bei der Trocknung in Laktose einige grundlegende Änderungen im Proteinprofil vornimmt im Vergleich zu einer ungestressten Vorkultur. Insgesamt konnten Proteine detektiert werden, welche verantwortlich für die Aktivierung der Stressantwort sind sowie Proteine zum Ausgleich des osmotischen Stresses. Auch einige Stoffwechsel-Proteine wurden translatiert, welche die Möglichkeit zur Verwertung alternativer Kohlenstoff-Quellen bieten, aber zum Teil auch eine Art Schutzfunktion für die Zelle aufweisen, indem sie reaktive Verbindungen abbauen bzw. deren Bildung verhindern. Es konnten auch Proteine nachgewiesen werden, die mit dem Schutz der DNA vor reaktiven Verbindungen, in Verbindung gebracht werden. Es lässt sich somit sagen, dass die Zelle bei Trocknung in Laktose sowohl einem osmotischen Stress ausgesetzt ist, welcher wahrscheinlich durch den Verlust von Wasser während der Trocknung ausgelöst wird und durch die Ansammlung von kompatiblen Osmoprotektoren wie Betain ausgeglichen werden müssen (Lebre et al. 2017). Des Weiteren liegt die Vermutung nahe, dass ebenfalls eine Art Hungerstress in der Zelle vorliegt, welcher die Verwertung alternativer Stoffwechselwege zur Verwertung anderer Energiequellen nötig macht. Nicht zuletzt wurden auch einige Mechanismen zum Schutz der Zelle vor reaktiven Verbindungen festgestellt, was die Vermutung nahe legt, dass auch ein oxidativer Stress auf die Bakterien einwirkt.

### 5.1.2 Herunterregulierte Gene

Zu den Proteinen, welche in der vorliegenden Arbeit in den gestressten Bakterien herunterreguliert wurden, gehören Komponenten des Arginine-Transportsystems ArtI und ArtJ. Im Vergleich dazu konnte in der Liste der hochregulierten Proteine die Proteine AstB und AstD gefunden werden, welche für den Abbau der Aminosäure Arginine verantwortlich sind (Lévi-Meyrueis et al. 2014). Die Expressionen dieser Proteine lagen um das 1,5-fache und 1,3-fache über der Expression in ungestressten Zellen (siehe Rohdaten auf beigefügter CD). Es wurde bereits beschrieben, dass *astA*-Mutanten einen kompetitiven Nachteil gegenüber dem Wildtyp in der stationären Phase haben (Lévi-Meyrueis et al. 2014). Da die Gene positiv durch  $\sigma^S$  reguliert

werden, ist der Unterschied zwischen der Expression der Transporter und der Proteine für den Abbau von Arginine ungewöhnlich (Lago et al. 2017). Es wurden ebenfalls zwei weitere Transportsysteme für Putrescin (PotD), sowie für Molybdän (ModA) in den Untersuchungen entdeckt, welche in den gestressten Proben signifikant niedriger exprimiert wurden, als in den ungestressten Probe. Bei Putrescin handelt es sich um ein Amin, welches Bakterien als alternative Kohlenstoff-Quelle dienen kann (Schneider et al. 2013). Die Gene für den Putrescin-Stoffwechsel stehen unter der Kontrolle von  $\sigma^S$  und werden durch diverse Formen von Stress aktiviert (Schneider et al. 2013; Lévi-Meyrueis et al. 2014; Lago et al. 2017). Auch für den Putrescin-Stoffwechsel konnten, einige Proteine gefunden werden, welche für die Umsetzung von Putrescin verantwortlich sind und, verglichen mit dem Transportsystem PotD, in den gestressten Bakterien höher exprimiert wurden als in den ungestressten. Hierzu gehören die Proteine YdcW, GabD und GabT, welche 1,3 - 1,5 Mal höher exprimiert wurden (Lévi-Meyrueis et al. 2014, siehe Rohdaten auf beigefügter CD). In einer Veröffentlichung von Ruan wurde beschrieben, dass Putrescin ebenfalls zur Ausbalancierung der positiven Ladung durch das Einströmen von  $K^+$ -Ionen zum Ausgleichen des Wasserverlustes bei osmotischem Schock dient (Ruan et al. 2011). Das Protein ModA stellt einen Teil des Molybdän-Transportsystems ModABC dar (Pedrick et al. 2014). Molybdän wird in der Zelle zur Produktion von Cofaktoren und für die Funktion verschiedener Proteine, vor allem beim anaeroben Wachstum mit alternativen Elektronenakzeptoren wie Nitrat oder Dimethylsulfoxid benötigt (Rech et al. 1996; Grunden & Shanmugam 1997; Pedrick et al. 2014). In Notzeiten werden Proteine, welche falsch gefaltet wurden oder nicht mehr benötigt werden, abgebaut und für den Energiestoffwechsel der Zelle eingesetzt, wie z.B. in *Staphylococcus aureus* (Michalik et al. 2009). Möglicherweise konnten durch den Trocknungsprozess keine Aminosäuren, Putrescin oder Molybdän mehr aus dem umgebenden Medium aufgenommen werden. Putrescin wird in der vorliegenden Untersuchung auch nicht zum Ausgleich positiver Ladungen durch einströmender  $K^+$ -Ionen benötigt, da das Transportsystem für diese Ionen *kdpABC* nicht hochreguliert wurde (Ruan et al. 2011; Spector & Kenyon 2012). Die Expression der Transporter wurde im Folgenden herunterreguliert und die Transporter durch die Zelle abgebaut, da sie nicht mehr benötigt wurden. Dies könnte bereits eine Anpassung der Zelle an den andauernden osmotischen Stress sein.

Das Protein FliC ist die Flagellum Untereinheit, welche auf der Oberfläche von *Salmonella* exprimiert und der Fortbewegung dient (Cummings et al. 2006). Die Expression des Proteins wird unter anderem mit der Infektion eines Wirts assoziiert (Cummings et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit zeigte FliC eine deutlich niedrigere Expression in den gestressten Proben. Somit ist anzunehmen, dass die Fortbewegung von *Salmonella* unter Trockenstress eingeschränkt ist. Ähnliches wurde bereits für *Pseudomonas fluorescens* und auch für *Desulfovibrio vulgaris* unter osmotischem Stress festgestellt (Guyard-Nicodème et al. 2008; He et al. 2010). In einer Studie zu *Listeria monocytogenes* zeigte sich ebenfalls, dass Deletionen der Flagellum-assoziierten Gene zu einer deutlich höheren Toleranz gegenüber Trockenstress führt (Hingston et al. 2015). Im Vergleich hierzu konnte in *Bradyrhizobium japonicum* unter Trockenstress eine Hochregulation der Gene für die Flagellen ermittelt werden, sowie auch in *Pseudomonas putida* (Cytryn et al. 2007; Gülez et al. 2011). Es muss daher in weiteren Untersuchungen geklärt werden, inwieweit die Expression von Flagellen eine Rolle bei der Resistenz von Bakterien gegen osmotischen Stress bzw. Trockenstress spielt.

In der Kategorie Elektronentransfer wurden zwei Proteine CybC und GrxA mit deutlich niedrigeren Expressionen in den gestressten Bakterien ermittelt. Bei GrxA handelt es sich um Glutaredoxin, ein Redoxenzym, welches durch Glutathion reduziert werden kann (Jordan et al. 1997). Glutaredoxin besitzt zwei Redox-aktive Cystein-Reste deren SH-Gruppen oxidiert oder reduziert vorliegen können (Jordan et al. 1997). Glutaredoxin spielt unter anderem bei der Reduktion von Ribonukleotiden zu Deoxyribonukleotiden eine Rolle (Jordan et al. 1997). Im Zuge der Stressreaktion wird GrxA mit der Reduktion des Regulators OxyR in seine inaktive Form in Verbindung gebracht. OxyR wird unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress oxidiert und kann Gene zum Schutz gegen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzieren (Spector & Kenyon 2012). Der Regulator OxyR zeigte in den durchgeführten Untersuchungen keine signifikant höhere Expression in den gestressten Proben, während Glutaredoxin 2 (Grx B) mit einer 1,7-fach höheren Expression in den gestressten Proben detektiert werden konnte (siehe Rohdaten auf beigefügter CD). In einer Veröffentlichung von Potamitou aus dem Jahre 2002 wurde die Expression verschiedener Glutaredoxine 1, 2 und 3 (*grxABC*) aus *Escherichia coli* untersucht. Dabei konnte für GrxA festgestellt werden, dass dieses in der stationären Phase herunterreguliert und GrxB hochreguliert wurde (Potamitou et al. 2002). Des Weiteren scheint GrxB nicht durch OxyR reguliert zu werden (Potamitou et al. 2002).

Dies würde auch den hier vorliegenden Ergebnissen entsprechen und darauf hinweisen, dass es sich bei dem vorliegenden Stress um Hungerstress bzw. eine Stressantwort auf den Eintritt in die stationäre Phase und weniger um eine Reaktion auf  $H_2O_2$  handelt.

Ein weiteres Protein aus der Kategorie Elektronentransfer ist das Cytochrom b562, welches eine Häm-Gruppe des Cytochrom<sub>b</sub>-Komplexes darstellt und am Elektronentransport der Atmungskette beteiligt ist (Minagawa et al. 1990). Cytochrom b562 wurde in der vorliegenden Untersuchung in den gestressten Proben signifikant niedriger exprimiert als in den ungestressten. Da es sich bei Cytochrom b562 um eine Komplexverbindung mit Fe-S-Clustern handelt, kann die Verbindung zur Stressreaktion möglicherweise deswegen hergestellt werden. Durch bestimmte Stressbedingungen, kann es möglicherweise zu einem Abbau der Cytochrom-Häme durch oxidative oder nitrosative Verbindungen kommen, welche im Folgenden für die Zelle potenziell toxische Eisenverbindungen freisetzen können (Justino et al. 2006; Choby & Skaar 2016). Durch Herunterregulierung der Produktion von Hämen könnte dies verhindert werden. Unterstützt würde die These durch die erhöhte Expression von Dps welches unter anderem Fe(II) oxidieren und in seinem Kern binden kann. Dadurch wird oxidativer Schaden der Zelle durch Fenton-Reaktionen verhindert (Zhao et al. 2002). Diese These müsste durch weitere Untersuchungen wie die Bestimmung von reaktiven Eisenverbindungen in der Zelle gestützt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Unterdrückung der Häm-Produktion durch die Zelle, um Eisen für andere essenzielle Bereiche des Stoffwechsels zur Verfügung zu haben (Li et al. 2013).

In der durchgeführten Untersuchung konnten einige Kälteschock-Proteine CspCDE identifiziert werden, die in den gestressten Proben um das 2,4 – 3-fache niedriger exprimiert waren als in den ungestressten Proben. Dabei handelt es sich bei CspD um einen neuen DNA-Replikations-Inhibitor, der in *Escherichia coli* in der stationären Phase und unter Kohlenhydrat-Hungerstress aktiviert wird (Yamanaka et al. 2001). CspD bindet unspezifisch an ssDNA und inhibiert die DNA-Synthese bei der Initiation und Elongation (Yamanaka et al. 2001). CspC und CspE werden dagegen bei 37°C produziert und sind in der Lage RNA und ssDNA zu binden (Phadtare & Inouye 2000). Es wird vermutet, dass die Csp-Proteine in der Lage sind sekundäre Strukturen der RNA zu lösen und Transkription und Elongation zu erleichtern (Phadtare & Inouye 2000). Die Proteine CspACE fungieren auch als Transkriptions-Antiterminatoren

(Phadtare & Inouye 2000). Ein weiteres Chaperon, welches in den durchgeführten Untersuchungen in gestressten Bakterien geringer exprimiert wurde, ist das Säurestress-Chaperon HdeB. Zusammen mit HdeA werden die Gene der beiden Proteine bei der Belastung der Bakterien durch niedrige pH-Werte transkribiert (Ding et al. 2015; Dahl et al. 2015). Diese niedrigen pH-Werte können unter anderem beim Eintritt der Bakterien in den Magen von Säugetieren auftreten (Dahl et al. 2015). Während HdeA bei pH-Werten von 2- 3 aktiv ist, zeigt HdeB seine größte Aktivität bei pH-Werten zwischen 4 – 5 (Ding et al. 2015; Dahl et al. 2015). Überzählige Protonen aufgrund eines niedrigen pH-Wertes in der Zelle können zur Entfaltung und Aggregation von Proteinen in der Zelle führen (Dahl et al. 2015). Es wird vermutet, dass HdeB entfaltete Proteine bindet, die Rückfaltung unterstützt und ihre Aggregation verhindert. Der genaue Mechanismus ist hierbei noch nicht geklärt (Ding et al. 2015; Dahl et al. 2015). HdeA konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Ebenfalls in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde dagegen das Sekretions-Chaperon SicA. *Salmonella spp.* besitzt spezialisierte Protein Sekretionssysteme, welches im Falle der Infektion eines Wirtes, bestimmte bakterielle Proteine in die Wirtszellen abgegeben kann, die dem Vorteil des Bakteriums dienen (Tucker & Galán 2000). Zu diesem Sekretionssystem gehört auch SicA (Tucker & Galán 2000). Es wird vermutet, dass SicA als Chaperon die Abgabe von Proteinen in die Wirtszelle sowie deren Stabilisierung unterstützt (Tucker & Galán 2000). Des Weiteren handelt es sich bei SicA möglicherweise um einen Cofaktor, welcher mit an der Expression verschiedener Gene des Sekretionssystems beteiligt ist (Darwin & Miller 2001). Die Vermutung liegt nahe, dass die Zelle unter Trockenstress keine Verwendung für die oben genannten Chaperone hat. Da keine Infektion des Wirtes vorliegt, wird auch keine Sekretionssystem benötigt. Chaperone können an der Faltung von denaturierten Proteinen beteiligt sein. Es wurde auch bereits nachgewiesen, dass verschiedene Chaperone in gestressten Bakterien induziert werden (Riedel & Lehner 2007; Kocharunchitt et al. 2014; Lebre et al. 2017). Da es sich bei den hier vorliegenden Chaperonen um Kälteschock-Proteine handelt sowie um ein Säurestress-Chaperon, liegt die Vermutung allerdings nahe, dass die nötigen Umweltbedingungen für die Aktivierung der Transkription dieser Chaperone nicht vorliegen.

Das Protein PliC ist ein Lysozym-Inhibitor und gehört zu einer der drei bekannten Familien von Lysozym-Inhibitoren. Lysozym spielt eine wichtige Rolle im Immunsystem von Vertebraten und dient der Hydrolyse der Peptidoglykane von

bakteriellen Zellwänden (Leysen et al. 2011; Andryushchenko et al. 2013). Dabei handelt es sich um einen bakteriolytischen Effekt. Zur Inhibition von Lysozym bei der Invasion des Wirtes werden Lysozym-Inhibitoren wie PliC von den Bakterien gebildet (Leysen et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde PliC in den gestressten Bakterien 2,1-fach niedriger exprimiert als in den ungestressten Proben. Da keine Infektion einer Wirtszelle vorliegt und es keine Bedrohung durch den Abbau der Zellwand durch Lysozym gibt, ist das Protein augenscheinlich nicht von großer Bedeutung für den Umgang der Zelle mit Trockenstress. Wie bereits oben erwähnt werden für die Stressreaktion unwichtige Proteine nicht transkribiert bzw. nicht translatiert oder von der Zelle abgebaut (Michalik et al. 2009; Trötschel et al. 2013).

Zwei herunterregulierte Proteine YggV und Ndk in den gestressten Bakterien gehören in den Bereich der Nukleotid-Biosynthese. Bei YggV handelt es sich um eine dITP/XTP Pyrophosphatase, welche in den gestressten Proben 2,5-fach niedriger exprimiert wurde. In *Escherichia coli* wurde bereits von einer dITP/XTP Pyrophosphatase berichtet, deren Aufgabe die Hydrolyse von ITP (Inosintriphosphat) und XTP (Xanthosintriphosphat) unter Freisetzung von Pyrophosphat ist (Zheng et al. 2005). Diese können durch Desaminierung von ATP (Adenosintriphosphat) und GTP (Guanosintriphosphat) durch den Einfluss von chemischen Mutagenen oder oxidativem Stress entstehen (Zheng et al. 2005). Beim Einbau dieser „falschen“ Nukleotide in die DNA und RNA entstehen Mutationen (Zheng et al. 2005). Zur Verhinderung der Akkumulation von ITP und XTP in der Zelle und deren Einbau in die DNA werden diese durch die dITP/XTP Pyrophosphatase abgebaut (Chung et al. 2002; Zheng et al. 2005). Im Zuge der Trocknung wurden bereits einige hochregulierte Proteine identifiziert, welche bei oxidativem Stress eine Schutzfunktion der Zelle oder auch der DNA einnehmen. Hierzu würde auch die dITP/XTP Pyrophosphatase gehören. Dass das Protein stattdessen herunterreguliert wurde, könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, dass in der Zelle kein ITP und XTP vorliegen. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass in der Zelle die Transkription und auch Replikation heruntergefahren wurden und somit kein Einbau von Nukleotiden mehr stattfindet (Deng et al. 2011). Eine Unterstützung der These könnte das erhöhte Vorliegen des Proteins Dps sein, welches die DNA kondensiert und damit unzugänglich machen kann (Martinez & Kolter 1997; Wolf et al. 1999). Ebenfalls für eine Senkung der Rate von Transkription und Replikation würde die niedrigere Expression des Protein Ndk sprechen. Die Nukleosid-Diphosphat Kinase ist für die

Synthese von Nukleosidtriphosphaten aus den jeweiligen Diphosphaten (Ginther & Ingraham 1974). Die Herunterregulierung des Proteins würde dafür sprechen, dass keine bzw. weniger Nukleosidtriphosphate von der Zelle benötigt werden, da möglicherweise der Bedarf der selbigen aufgrund niedrigerer Transkriptionsraten geringer ist. Diese These müsste durch die Bestimmung der Transkriptionsrate oder des Gehalts an ITP und XTP in der Zelle weiter untersucht werden.

## 5.2 SDS-Page

Anhand der durchgeführten zweidimensionalen Gelelektrophorese konnten Proteine identifiziert werden, welche in den gestressten Bakterien höher oder niedriger exprimiert wurden, als in den ungestressten Bakterien. Es zeigte sich, dass auch zwischen den verschiedenen Arten des Stresses unterschiedliche Proteine mit erhöhter Expression zu finden sind. Dies lässt darauf schließen, dass für den jeweiligen Stress andere Anpassungen auf molekularer Ebene erfolgen. Die Analyse der einzelnen Proteine mittels Massenspektrometrie konnte in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden. Hierzu müssten Folgeversuche durchgeführt werden. Ein Vergleich der Proteine zwischen den verschiedenen Arten des Stresses wäre interessant, sowie ein Vergleich mit den Ergebnissen der TMT-Untersuchungen. Im Falle des horizontalen Schmiere auf den Gelbildern von *Cronobacter sakazakii* erscheint es notwendig die verwendete Methode für zukünftige Versuche zu optimieren. Die Vermutung liegt nahe, dass der Schmier durch Probleme in der ersten Dimension der Fokussierung auftraten. Eine Anpassung der Fokussierungszeit könnte eine mögliche Lösung sein. Zur Vermeidung unterschiedlich hoher Konzentrationen der Proteine auf den Gelen sollte eine Optimierung der Messmethode für die Proteinkonzentration erfolgen. Nur durch den Auftrag gleicher Proteinmengen auf die Gele kann für zukünftige Versuche eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse sichergestellt werden.

## 5.3 Diskussion Trocknungsversuche

Lebensmittel können eine Reihe von Bakterien enthalten, die für den Menschen potenziell gefährlich sein können. Deshalb ist es wichtig, dass Lebensmittel auf pathogene Bakterien hin getestet werden, um Krankheitsfälle zu verhindern (Institute of Food Technologists & Food and Drug Administration 2001; Wu 2008). Lebensmittel werden oft einer Reihe von Prozessen unterzogen, welche die Haltbarkeit erhöhen und vorhandene Bakterien abtöten bzw. deren Wachstum hemmen sollen (Institute of Food

Technologists & Food and Drug Administration 2001). Dies kann die Bildung von subletal geschädigten Bakterien hervorrufen, welche aufgrund ihrer Schädigung sensitiver gegenüber bestimmter Nachweismethoden, wie Selektivnährmedien sein können. Unter günstigen Bedingungen können sich die Zellen allerdings reparieren und ihr Wachstum ungehindert aufnehmen (Wu 2008). Dies stellt ein potenzielles Risiko für den Lebensmittelkonsumenten dar und auch eine Herausforderung bei der Detektion dieser Bakterien (Busch & Donnelly 1992). Für die Detektion von Bakterien in Lebensmitteln gibt es eine Reihe von verschiedenen Methoden, die von klassischer Mikrobiologie bis zu molekularen oder immunologischen Methoden reichen (Priyanka et al. 2016). Bei der Entwicklung von Methoden, Nährmedien oder Nachweissystemen für die Detektion von pathogenen Bakterien in Lebensmitteln, gilt es hierbei herauszufinden, wie sensitiv und geeignet eine bestimmte Methode bzw. ein Nährmedium oder ein Nachweissystem für die jeweilige Anwendung ist. Durch die Validierung wird untersucht, ob eine Methode bestimmte vordefinierte Anforderungen für eine spezifische Anwendung erfüllen kann (ISO 16140-1:2016). Die Untersuchungen werden mit verschiedenen Bakterien und auch Lebensmitteln durchgeführt. Für die Verwendung von Lebensmitteln wird von der Internationalen Organisation für Normung (ISO) vorgegeben, dass möglichst natürlich kontaminierte Lebensmittel für diese Untersuchungen verwendet werden sollen (Wallace 1996; ISO 16140-2:2016). Eine ausreichende Menge natürlich kontaminierter Lebensmittel zu erhalten, kann in der Realität allerdings oft nicht durchführbar sein, weshalb es in diesem Fall erlaubt ist, die Lebensmittel künstlich zu kontaminieren (Wallace 1996; Jasson et al. 2007; ISO 16140-2:2016). Wie bereits beschrieben, können Bakterien in Lebensmitteln auch in geschädigter Form vorhanden sein. Deshalb ist es bei der Entwicklung von Methoden, Nährmedien oder Nachweissystemen wichtig, bei der künstlichen Kontamination von Lebensmittelproben auch geschädigte Bakterien einzusetzen (Wallace 1996; Jasson et al. 2007; ISO 16140-2:2016). In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche durchgeführt, um Bakterien durch Trocknung und Hitze zu schädigen und über einen längeren Zeitraum bei stabiler Keimzahl und Schädigungsrate zu lagern. Die Protokolle zur Schädigung von Bakterien sollen zukünftig für Laborinterne Validierungen von Nährmedien und Nachweismethoden von Bakterien in Lebensmitteln verwendet werden. Für die Trocknung bzw. den Hitzeschock wurden relevante, lebensmittelpathogene Bakterien aus der ISO-Norm 11133 eingesetzt, welche häufig im Bereich der Qualitätssicherung von

Nährmedien verwendet werden (ISO 11133:2014). Die Bakterien sollten auch eine Relevanz für den jeweiligen Stress haben und beispielsweise in Lebensmitteln mit niedriger Wasseraktivität oder Hitze behandelten Lebensmitteln zu finden sein (Institute of Food Technologists & Food and Drug Administration 2001, S.34; Rachon et al. 2016; Ruan & Buchanan 2016; Sanchez-Maldonado et al. 2017). Es wurden Untersuchungen durchgeführt zur Schädigung von Bakterien durch Trocknung in Laktose-Monohydrat und Milchpulver, sowie durch Hitze. Diese geschädigten Bakterien sollten über einen längeren Zeitraum gelagert und die Keimzahl sowie die Schädigungsrate überwacht werden.

### 5.3.1 Trocknung von Bakterien in Laktose-Monohydrat und Milchpulver

Das Ziel der Versuche war geschädigte Bakterien durch Trocknung in Pulver herzustellen und diese über einen längeren Zeitraum bei stabiler Keimzahl lagern zu können. Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Cronobacter sakazakii*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* ser Enteritidis und *Escherichia coli* haben sich bei der Trocknung sehr unterschiedlich verhalten. So konnten *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* ser Enteritidis und *Escherichia coli* nicht in Laktose-Monohydrat getrocknet werden, dagegen erfolgreich in Milchpulver. Hier wird vor allem deutlich, dass es auch zwischen verschiedenen Serotypen einer Art eine unterschiedliche Widerstandsfähigkeit gegen stressige Umweltbedingungen wie Dehydration geben kann. Dies wurde in den durchgeführten Untersuchungen bei den Serotypen *Salmonella enterica* ser Enteritidis und *Salmonella enterica* ser. Typhimurium deutlich. *Salmonella enterica* ser. Typhimurium konnte sowohl in Milchpulver als auch in Laktose-Monohydrat getrocknet werden während *Salmonella enterica* ser Enteritidis nur in Milchpulver getrocknet werden konnte. *Salmonella enterica* ser Enteritidis scheint damit weniger widerstandsfähig gegen Trocknungsprozesse zu sein. Diese unterschiedliche Widerstandsfähigkeit verschiedener Serotypen von *Salmonella* wurde auch in anderen Veröffentlichungen beschrieben. In der Veröffentlichung von Gruzdev et al. wurden verschiedene *Salmonella* Serotypen in 96-Well Platten luftgetrocknet und danach noch verschiedenen stressigen Bedingungen wie Hitze, Ethanol, Gallensalze oder UV-Strahlung ausgesetzt. Dabei zeigte sich, dass sich vier Serotypen sehr ähnlich verhielten, während *Salmonella enterica* ser. *Hadar* anfälliger für die stressige

Behandlung durch Trocknung sowie die Folgebehandlungen zu sein schien (Gruzdev et al. 2011). Ähnliches wurde in einer Studie von Margas beobachtet, in der verschiedene *Salmonella* Serotypen auf rostfreien Stahldisks getrocknet wurden. Einige Serotypen überlebten den Trocknungsprozess deutlich besser als andere. Es konnte ebenfalls festgestellt werden, dass verschiedene Stämme desselben Serotyps den Trocknungsprozess ebenfalls unterschiedlich gut überlebten (Margas 2016). Auch bei der Trocknung von verschiedenen *Listeria monocytogenes* Stämmen auf Polypropylen Coupons konnten deutliche Unterschiede zwischen einzelnen Stämmen hinsichtlich der Kultivierbarkeit nach der Trocknung festgestellt werden (Zoz et al. 2017). Wieso diese Unterschiede zwischen einzelnen Serotypen und sogar zwischen verschiedenen Stämmen desselben Serotyps, bestehen, bleibt abschließend zu klären (Gruzdev et al. 2011; Margas 2016; Zoz et al. 2017).

In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass die Trocknung in Milchpulver statt in Laktose-Monohydrat einen deutlichen Einfluss auf die Lebensfähigkeit aller getesteten Bakterien hat. Alle getesteten Bakterien zeigten nach einem initialen Abfall der Keimzahl eine gute Stabilität in Milchpulver, während vor allem für *Salmonella* und *Cronobacter* in Laktose-Monohydrat ein deutliches Absinken der Keimzahl in der Lagerzeit beobachtet werden konnte. Es zeigten sich prinzipiell höhere Schädigungsraten bei der Trocknung in Laktose-Monohydrat. Drei untersuchte Stämme, *Salmonella enterica* ser Enteritidis, *Escherichia coli* und *Listeria monocytogenes* konnten nicht in Laktose-Monohydrat getrocknet werden. Direkt nach dem Prozess der Trocknung konnten beide Bakterien mit den hier verwendeten Methoden weder auf selektivem noch auf nicht-selektivem Agar nachgewiesen werden. *Salmonella enterica* ser Enteritidis, *Escherichia coli* und *Listeria monocytogenes* Stämme wurden in einigen Veröffentlichungen ebenfalls für die Trocknung in verschiedenen Medien und Lebensmitteln verwendet. Verschiedene Stämme dieser beiden Bakterien wurden auf Pistazien und Mandeln, in Kartoffelstärke, Säuglingsreisflocken, Trockenmilchpulver sowie auf Oberflächen getrocknet und konnten nach der Trocknung mit kulturellen Methoden nachgewiesen werden (Doyle et al. 1985; Deng et al. 1998; Park & Beuchat 2000; Uesugi et al. 2006; Hansen & Vogel 2010; Takahashi et al. 2011; Kimber et al. 2012; Zoz et al. 2017). Wie bereits zuvor beschrieben können sich Unterschiede für verschiedene Serotypen eines Bakteriums, sowie auch verschiedene Stämme eines Serotyps in der Resistenz gegenüber Trocknung zeigen (Gruzdev et al. 2011; Margas 2016; Zoz et al. 2017).

Auch ein Einfluss der Lebensmittelmatrix wurde für *Salmonella* in verschiedenen Erdnussbutter-Aufstrichen festgestellt. Hier wurden unterschiedliche Überlebensraten in den verschiedenen Aufstrichen festgestellt. Vermutet wurde, dass diese Ergebnisse im Zusammenhang mit der Zusammensetzung der Produkte stehen und die Überlebensrate von der Größe der Fett- und Wassertropfen in den Produkten abhängt, welche gleichzeitig die Verfügbarkeit von Nährstoffen beeinflusst (Burnett et al. 2000). In der Studie von Hiramatsu wurden Stämme von *Salmonella* und *E. coli* auf verschiedenen Lebensmitteln wie Schokolade, gerösteten Erdnüssen oder getrockneten Äpfeln getrocknet (Hiramatsu et al. 2005). Die verwendeten Stämme zeigten auf Schokolade und gerösteten Erdnüssen eine höhere Überlebensrate als auf Lebensmitteln mit niedrigem pH-Wert wie getrockneten Äpfeln. Es wurde vermutet, dass sowohl pH-Wert, Salz- und auch Fettgehalt einen Einfluss auf das Überleben der Bakterien haben können (Hiramatsu et al. 2005). In einer Veröffentlichung von Mohammad wurde die unbeschadete Beförderung probiotischer Mikroorganismen in den Darm thematisiert und das Überleben dieser Mikroorganismen in Lebensmitteln während der Produktion und der anschließenden Lagerung sowie im Gastrointestinaltrakt (Mohammad et al. 2012). Hier wurden einige Faktoren genannt, welche einen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von Mikroorganismen haben können. Unter anderem wurden hier auch der Fettgehalt von Milch, die Supplementierung mit Nährstoffen, Zusatz von Zucker oder Salz, mikrobiologische Begleitflora oder pH-Wert genannt. Einige probiotische Laktobazillen können in Milch nicht wachsen, da keine freien Aminosäuren und Peptide sowie Vitamine vorhanden sind. Deshalb muss die Milch supplementiert werden, z.B. mit Casein, L-Cystein, Hefeextrakt, Glukose, Vitaminen, Mineralien oder Antioxidantien (Mohammad et al. 2012). Das verwendete Milchpulver enthält im Vergleich zu Laktose-Monohydrat Fette, Proteine sowie zugesetzte Vitamine. Einige dieser Komponenten können potenziell eine schützende Wirkung auf die Bakterien haben. Auch eine Verfügbarkeit schützender Nährstoffe vor der kompletten Trocknung wäre denkbar. Untersuchungen zum protektiven Effekt von Magermilchpulver auf Sprühtrocknung von Milchsäurebakterien zeigten, dass Laktose nicht ausreichend war, um die Lebensfähigkeit der Bakterien zu unterstützen (Zheng et al. 2015). Milchfett wurde als negativ für die Lebensfähigkeit der Bakterien bei der Trocknung beschrieben. Als weitere protektive Agenzien wurden Milchproteine sowie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  Kationen angegeben. Der protektive Effekt von Milchpulver ist allerdings noch nicht abschließend geklärt (Zheng et al. 2015). Warum die Stämme

*Salmonella enterica* ser Enteritidis, *Escherichia coli* ATCC® 700728 und *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111 nicht in Laktose-Monohydrat getrocknet werden konnten bedarf weiterer Klärung durch Folgeuntersuchungen. In dieser Arbeit wurden keine weiteren *Listeria monocytogenes* und *Escherichia coli* Stämme untersucht, weshalb nicht auszuschließen ist, dass es sich um ein Stamm-spezifisches Phänomen handelt. Dies wäre somit ebenfalls, durch Trocknung anderer Stämme, in weiteren Untersuchungen zu klären. Insgesamt kann für die vorliegende Arbeit auch die Aussage getroffen werden, dass *Cronobacter* und *Salmonella* Typhimurium bei der Lagerung in Milchpulver eine höhere Stabilität aufweisen, als es bei den Trocknungen in Laktose der Fall war. Für alle getesteten Stämme zeigte sich in Milchpulver direkt nach der Trocknung ein initialer Abfall und eine anschließende Stabilisierung der Keimzahl. Dieser Effekt war auch bei der Lagerung der Laktose-Proben bei Temperaturen von 4°C und -20°C zu beobachten. Bei den Laktose-Trocknungen, welche bei Raumtemperatur gelagert wurden, zog sich der initiale Abfall der Keimzahl dagegen meist über mehrere Tage und Wochen hin, bevor sich die Keimzahl stabilisierte. Dies lässt ebenfalls auf einen protektiven Effekt des Milchpulvers schließen, welcher es den Zellen ermöglicht sich schneller auf den Stress einzustellen (Zheng et al. 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Lagerung des Stammes *Salmonella enterica* ser. Typhimurium bei -20°C und 4°C nach Trocknung in Laktose-Monohydrat durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Keimzahl bei einer längeren Lagerung der getrockneten Bakterien bei -20°C und 4°C annähernd konstant bleibt. Im Vergleich hierzu konnte für die Lagerung bei Raumtemperatur ein kontinuierlicher Abfall der Keimzahl über die Lagerdauer beobachtet werden. In verschiedenen Studien wurde ebenfalls der Einfluss verschiedener Faktoren auf das Überleben von Bakterien während und nach der Trocknung beschrieben. Hier zu nennen wäre einerseits die Lagertemperatur nach der Trocknung. Für getrocknete *L. monocytogenes* und *E. coli* Stämme zeigte sich bei Trocknung auf Mandeln und Pistazien ein Einfluss der Lagertemperatur. So zeigte sich bei Lagerung der getrockneten Bakterien kaum eine Reduktion der Keimzahl bei Temperaturen von -19°C und 4°C, während sich die Keimzahl bei 24°C innerhalb von 12 Monaten deutlich reduzierte (Kimber et al. 2012). Dies konnte ebenfalls bei Trocknungsversuchen von *E. coli* in Kartoffelstärke und anschließender Lagerung bei 4°C, 20°C und 37°C, mit *Salmonella* inokulierten Pekanüssen, welche bei -18, -7, 5 und 21°C gelagert wurden,

mit *Salmonella* inokulierten Mandeln, welche bei -20, 4, 23 und 25°C gelagert wurden, sowie mit *Salmonella* inokulierter Erdnussbutter, welche bei 5 und 21°C gelagert wurde, beobachtet werden (Beuchat & Heaton 1975; Park & Beuchat 2000; Burnett et al. 2000; Uesugi et al. 2006). Das Ergebnis dieser Studien, dass getrocknete Bakterien welche bei niedrigen Temperaturen gelagert werden, länger lebensfähig bleiben, stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein.

Auch weitere Faktoren können das Überleben getrockneter Bakterien beeinflussen, wie z.B. der  $a_w$ -Wert. Für *E. coli*, getrocknet in Kartoffelstärke, zeigte sich, dass die Überlebensfähigkeit mit sinkendem  $a_w$ -Wert erhöht wird (Park & Beuchat 2000). Dasselbe Ergebnis wurde auch für *Cronobacter sakazakii* in Säuglings-Milchpulver und Müsli festgestellt. Bei niedrigen  $a_w$ -Werten von 0,25 – 0,33 überlebte *Cronobacter* besser als bei hohen  $a_w$ -Werten von 0,69 – 0,82 (Beuchat et al. 2009). In der Studie von Deng konnte dagegen festgestellt werden, dass ein höherer  $a_w$ -Wert sich positiv auf das Überleben von *E. coli* in Müsli auswirkt (Deng et al. 1998). Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde der  $a_w$ -Wert der verwendeten Medien nicht bestimmt. Es sollten weitere Versuche zum Einfluss des  $a_w$ -Wertes auf die Trocknung und Lagerung der Bakterien durchgeführt werden. Für zukünftige Versuche wäre es möglich, eine höhere Stabilität der Keimzahl, durch die Einstellung und Kontrolle des  $a_w$ -Wertes zu erzielen.

Für alle in dieser Arbeit untersuchten Bakterien und Ansätze zeigte sich zunächst ein initialer Abfall der Keimzahl um einige log-Stufen. Dies betraf sowohl die Milchpulver-, als auch die Laktose-Trocknung. Dies wurde ebenfalls in Veröffentlichungen zur Trocknung von *Escherichia coli* in Kartoffelstärke, *Salmonella* in Molkepulver, *Listeria monocytogenes* in fettfreier Trockenmilch, *Salmonella* in Trockentierfutter, *Salmonella* in Trockenmilch, Kakaopuder, Knochen- und Fleischmehl sowie Hühnerfutter gezeigt (Mossel & Koopman 1965; Juven et al. 1984; Park & Beuchat 2000; Santillana Farakos et al. 2013). Vermutet wurde, dass die Überführung der Zellen in eine Umgebung mit niedrigerer Wasseraktivität einen initialen osmotischen Schock ausübt, welcher zu einem abrupten Absterben der Zellen führen kann (Mossel & Koopman 1965; Juven et al. 1984).

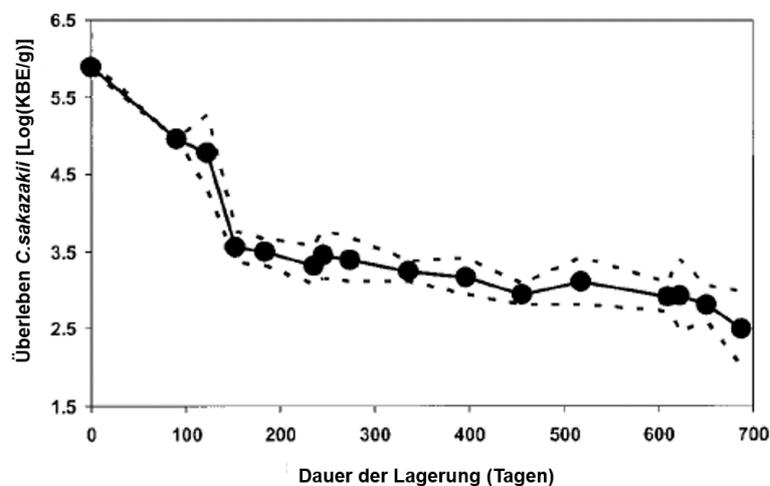
Für die Trocknung von *Salmonella* in Laktose wurden Kulturen verwendet, welche für 24 h bei 36°C inkubiert wurden (stationäre Phase) und Kulturen, welche für 4 h bei 36°C inkubiert wurden (exponentielle Phase). In den durchgeführten Untersuchungen

konnten keine Unterschiede bei der Resistenz beider Kulturen gegen die Trocknung festgestellt werden. Bereits in einigen anderen Veröffentlichungen wurde der gegenteilige Effekt beschrieben. Es zeigte sich für *Salmonella*, dass Kulturen in der stationären Phase den Trocknungsprozess deutlich besser überlebten als Kulturen in der frühen oder mittleren exponentiellen Phase. Auch bei anschließender Lagerung waren die Bakterien in der stationären Phase deutlich resistenter gegen die Lagerung unter Bedingungen mit niedriger Wasseraktivität (Gruzdev et al. 2012). Ähnliches wurde auch für *Cronobacter sakazakii* festgestellt (Breeuwer et al. 2003). Als Grund hierfür wurde die Aktivierung einer Stressantwort beim Eintreten in die stationäre Phase, aufgrund eines Mangels an verfügbaren Nährstoffen im Medium, angegeben. Dies sorgt für eine größere Widerstandsfähigkeit der Zellen gegen Dehydration (Meng et al. 2008). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien sich nicht in der exponentiellen Phase befunden haben oder bereits Stressproteine gebildet haben. Dies müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

### 5.3.2 Vergleich der Stabilität von getrockneten Bakterien mit Literaturwerten

Zum Thema Trocknung von *Cronobacter sakazakii* und *Salmonella* in Milchpulver gibt es einige Studien. Für *Cronobacter* unterscheidet sich der Verlauf der Keimzahl bei Trocknung in Milchpulver und anschließender Lagerung in der vorliegenden Arbeit von Ergebnissen anderer Studien. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach einer initialen Abnahme der Keimzahl um etwa 1 log Stufe eine weitere Abnahme der Keimzahl um etwa 1 log Stufe innerhalb von 392 Tagen. In einer Untersuchung von Barron & Forsythe lag die initiale Abnahme der Keimzahl bei 3 log Stufen, gefolgt von einer weiteren Abnahme um 3,34 log Stufen in den ersten 6 Monaten und einer weiteren Abnahme der Keimzahl um 1,18 log Stufen innerhalb der folgenden 30 Monate. In dieser Studie wurde eine flüssige Kultur in Säuglingsnahrung unter einem Luftstrom getrocknet (Barron & Forsythe 2007). Eine andere Veröffentlichung mischte eine Flüssigkultur tropfenweise in getrocknete Säuglingsnahrung und trocknete diese dann im Anschluss. Hier konnte in den ersten 150 Tagen eine Abnahme der Keimzahl um 2,3 log Stufen und nach weiteren 534 Tagen eine Abnahme um 1 log Stufe beobachtet werden (Edelson-Mammel et al. 2005). In der Arbeit von Beuchat wurde eine Sprühinokulation des Milchpulvers durchgeführt. Bei einer Lagertemperatur von 21°C, welche der Temperatur in der vorliegenden Arbeit am ehesten entspricht, und

einem  $a_w$ -Wert von 0,26 und 0,31 konnte nach 6 Monaten eine Abnahme von etwa 2 log Stufen und nach weiteren 6 Monaten 1 log Stufe beobachtet werden (Beuchat et al. 2009). Im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit sind die Keimzahl-Abnahmen der oben genannten Veröffentlichungen höher und die Stabilität der getrockneten Bakterien geringer. Nach der initiale Abnahme der Keimzahl, direkt nach der Trocknung, sinkt die Keimzahl lediglich um 1 log Stufe, während in den anderen Arbeiten eine höhere Abnahme der Keimzahl zu beobachten ist. Der Verlauf der Graphen in den oben beschriebenen Arbeiten erinnert dabei eher an die Graphen der Laktose-Trocknung von *Cronobacter sakazakii* (siehe Abbildung 30 und Abbildung 15). Eine mögliche Erklärung sind die unterschiedlichen Methoden zur Trocknung des Bakteriums, sowie die Anzahl an inokulierten Bakterien. So wurde die Laktose flüssig angeimpft, während für das Animpfen des Milchpulvers ein Zellpellet verwendet wurde. In einigen der oben beschriebenen Arbeiten wurden ebenfalls flüssige Kulturen für die Trocknung verwendet. Dies könnte einen möglichen Effekt auf die Stabilität der Bakterien haben. Auch ein Unterschied in der Zusammensetzung des verwendeten Milchpulvers könnte einen Einfluss auf das Überleben der Bakterien haben. Wie bereits zuvor diskutiert, könnte auch der verwendete Stamm einen Unterschied bei der Widerstandsfähigkeit gegen die Trocknung machen (Gruzdev et al. 2011). Auch wurde der  $a_w$ -Wert in dieser Arbeit nicht bestimmt. Wie bereits oben erwähnt kann auch dieser einen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Bakterien haben (Park & Beuchat 2000; Beuchat et al. 2009).



**Abbildung 31: Überleben von *Cronobacter sakazakii* in pulverförmiger Säuglingsnahrung (nach Edelson-Mammel et al. 2005).** Angegeben sind die log KBE pro Milliliter nach Rehydratation des Pulvers. Alle Punkte sind Mittelwerte aus drei Replikaten. Die gepunktete Linie repräsentiert die Standardabweichungen  $\pm 3$ .

Für *Salmonella* wurden bereits verschiedene Untersuchungen zur Trocknung und Langzeitlagerung durchgeführt. In Magermilchpulver zeigte sich eine Reduktion der Keimzahl um 3 log Stufen nach 10 Tagen und um weitere 1,5 - 3 log Stufen nach weiteren 50 Tagen (Lian et al. 2015). Dies ist gemessen an den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen eine vergleichsweise schnelle Abnahme der Keimzahl in kurzer Zeit. Pekanüssen wurden mit 5 log KBE *Salmonella Typhimurium* angeimpft. Nach 8 Wochen bei 21°C reduzierte sich die Keimzahl um 3,3 log Stufen und blieb dann relativ konstant für weitere 24 Wochen (Beuchat & Heaton 1975). Für *Salmonella Typhimurium* getrocknet in 96-Well Platten in Wasser zeigte sich für eine stationäre Kultur eine Abnahme um 3 log Stufen nach 4 Wochen Lagerung. Nach weiteren 8 Wochen nahm die Keimzahl um etwa 1,2 log Stufen ab. Mandeln wurden mit 7,5 log KBE *Salmonella Enteritidis* beimpft und bei 23°C gelagert. Nach sieben Tagen konnte eine Reduktion der Keimzahl um 0,1 log KBE festgestellt werden. Innerhalb von 550 Tagen sank die Keimzahl um etwa 3,1 log Stufen ab (Uesugi et al. 2005). Verglichen mit den in dieser Arbeit generierten Ergebnissen zur Trocknung von *Salmonella Typhimurium* in Laktose-Monohydrat zeigt sich innerhalb von 91 - 121 Tagen eine Abnahme der Keimzahl von 2,4 – 3,6 log KBE. Dies würde in etwa den Werten in den Veröffentlichungen von Beuchat & Heaton sowie Gruzdev entsprechen (Beuchat & Heaton 1975; Gruzdev et al. 2012). Die weitere Abnahme der Keimzahl zwischen 1,2 – 2,9 log KBE in 383 Tagen entspricht am ehesten den Werten der Veröffentlichung von Uesugi. Hier nimmt die Keimzahl innerhalb von 550 Tagen insgesamt 3,1 log KBE ab (Uesugi et al. 2005). Insgesamt konnte auch in den verschiedenen Veröffentlichungen ein stärkerer Abfall der Keimzahl in den ersten Wochen beobachtet werden. Danach sinkt die Keimzahl meist langsamer ab (Beuchat & Heaton 1975; Uesugi et al. 2005; Gruzdev et al. 2012). Dies lässt auf eine Phase der Anpassung schließen. Vergleicht man die Ergebnisse der oben beschriebenen Studien mit der Trocknung von *Salmonella* in Milchpulver, so zeigt sich, dass in Milchpulver eine höhere Stabilität der Keimzahl über einen längeren Zeitraum erzielt werden kann. Die Keimzahl nimmt hier innerhalb von 530 Tagen nur um 0,3 – 0,7 log Stufen ab. Prinzipiell zeigt sich jedoch, dass auch bei verschiedenen Arten der Trocknung und anschließender Lagerung ein ähnlicher Verlauf des Graphen vorliegen kann. Dabei spielen verschiedene Faktoren wie die Art der Trocknung, der verwendete Serotyp, die Wasseraktivität und Temperatur sowie das verwendete Trägermedium eine Rolle für das Verhalten des Bakteriums unter Trockenstress

(Park & Beuchat 2000; Burnett et al. 2000; Gruzdev et al. 2011; Kimber et al. 2012; Maserati et al. 2017). Für das hier untersuchte Bakterium *Salmonella* Typhimurium wurde in Kapitel 4.3 ein Modell für die Trocknung in Laktose-Monohydrat aufgestellt. Es wurden für die beiden beschriebenen Phasen während der Lagerung des Bakteriums Absterberaten ermittelt- Diese lagen für die initiale Phase zwischen 1,88 - 3% und für die Stabilisierungsphase zwischen 0,2 – 0,5% pro Tag Lagerung. Da die Werte für mehrere Ansätze desselben Stammes sehr nah beieinander liegen, kann man dieses Modell auf zukünftige Versuche anwenden, um darauf zu schließen wie sich die Keimzahl innerhalb einer gegebenen Trocknungsperiode verhält. Dies erleichtert die Keimzahlbestimmung und auch die artifizielle Kontamination von Validierungsproben. Auch für die anderen hier untersuchten Bakterien könnte solch ein Modell nützliche Erkenntnisse liefern.

Für *Listeria monocytogenes* wurde eine Studie zur Trocknung und Lagerung auf Mandeln und Pistazien gefunden (Kimber et al. 2012). Die hier gezeigten Graphen für die Lagerung bei 4°C und -19°C entsprechen anhand der Stabilität den in dieser Arbeit vorliegenden Graphen. Im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen zeigte *Listeria monocytogenes* auf Mandeln und Pistazien eine Abnahme der Keimzahl innerhalb von 100 Tagen bei 24°C um 2 - 2,5 log KBE, was etwa der initialen Keimzahlabnahme direkt nach der Trocknung in Milchpulver entspricht (Kimber et al. 2012). Eine annähernde Stabilität der Keimzahl erfolgt erst nach 100 - 200 Tagen. Ähnliches wird deutlich für die Lagerung von *Listeria* auf rostfreien Stahldisks und in verschiedene Lebensmittel. Innerhalb von 10 - 15 Tagen nimmt die Keimzahl etwa um 3 – 4 log Stufen ab, um in den folgenden 15 Tagen um eine weitere log Stufe abzunehmen (Takahashi et al. 2011). Auch dies spricht wieder für die These, dass je nach verwendetem Medium bzw. Lebensmittel für die Trocknung, eine schnellere Anpassung an die Umstände erfolgen kann.

Auch *Escherichia coli* zeigte in Milchpulver nach einer initialen Abnahme der Keimzahl eine hohe Stabilität mit einem Verlust der Keimzahl von einer log Stufe innerhalb von 364 Tagen. Vergleichende Werte in der Literatur zeigen eine deutlich geringere Stabilität von *Escherichia coli* getrocknet in Buttermilchpulver, Hühnerpulver oder Kartoffelstärke, welche bei etwa 20°C gelagert wurden (Deng et al. 1998; Park & Beuchat 2000). In Buttermilchpulver und Hühnerpulver reduziert sich die Keimzahl von 5,7 log KBE innerhalb einer Woche um 2,1 log Stufen sowie um weitere 1,2 bzw. 0,5

log Stufen innerhalb der nächsten zwei Wochen. Nach weiteren 6 Wochen sinkt die Keimzahl um weitere 1,5 bzw. 0,5 log Stufen und nach 12 Wochen kann *Escherichia coli* nicht mehr im Buttermilch- und Hühnerpulver nachgewiesen werden (Deng et al. 1998). In Kartoffelstärke sinkt die Keimzahl innerhalb einer Woche um 2,7 log Stufen und innerhalb der nächsten 4 Wochen um weitere 1,7 log Stufen. Nach 15 Wochen kann das Bakterium nicht mehr in der Stärke nachgewiesen werden (Park & Beuchat 2000). Auch auf Mandeln und Pistazien zeigt *Escherichia coli* bei Raumpemperatur Lagerung eine geringe Stabilität. Auf Pistazien nimmt die Keimzahl innerhalb von 150 Tagen um 2,5 log Stufen ab und stabilisiert sich im Folgenden bei einer sehr niedrigen Keimzahl von 0,5 - 1 log KBE. Auf Mandeln reduziert sich die Keimzahl innerhalb von 250 Tagen um 4 log Stufen (Kimber et al. 2012). Verglichen mit den Werten in der Literatur kann *Escherichia coli* in Milchpulver länger stabil gelagert werden und entspricht auch hier eher Werten, welche beispielsweise in den Untersuchungen von Kimber für die Lagerung der Proben bei 4°C oder -19°C, ermittelt wurden (Kimber et al. 2012).

Für *Staphylococcus* konnten nur wenige Untersuchungen zur Resistenz bei Trocknung in Pulver gefunden werden. In einer Veröffentlichung von Umoh wurden Milchpulverproben auf *Staphylococcus aureus* hin untersucht (Umoh et al. 1985). Im Milchpulver vorhandene Staphylokokken zeigten innerhalb von 12 Tagen Unterschiede von 0,2 – 0,4 log Stufen (Umoh et al. 1985). Eine hohe Stabilität der Keimzahl konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl für *Staphylococcus aureus* als auch für *Staphylococcus epidermidis* getrocknet in Laktose-Monohydrat und Milchpulver erzielt werden. Da laut der EG Verordnung 2073/2005 Trockenprodukte wie z.B. Milch- und Molkepulver auf koagulasepositive Staphylokokken getestet werden müssen, handelt es sich für solche Produkte um ein relevantes Bakterium (Europäische Gemeinschaft 2005). Die hier generierten Daten zeigen deutlich die Resistenz des Bakteriums gegenüber Trockenstress und die potentielle Gefahr für den Endkonsumenten durch die lange Überlebensdauer des Bakteriums in Trockenprodukten.

#### 5.4 Diskussion Hitzeschock

Es wurden ebenfalls Versuche zur Hitzeschädigung von Bakterien sowie der anschließenden Lagerung bei -80°C in Nährmedium mit 15% Glycerin durchgeführt. In den Vorversuchen wurde der D-Wert für die Bakterien *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111, *Escherichia coli* ATCC® 700728, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC® 14028 und *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29004 bestimmt. Die D-Werte bei 55°C lagen für *Salmonella*, *Cronobacter* und *E. coli* bei, 1,2 Minuten, 0,8 Minuten und 14,6 Minuten. Für *Listeria monocytogenes* lag der D-Wert bei 60°C bei 5 Minuten. Damit zeigten *Listeria monocytogenes* und *Escherichia coli* in den Untersuchungen die größte Resistenz gegen die Hitzebehandlung und die höchste Überlebensrate.

In einer Veröffentlichung von Bunning zeigte *Salmonella* Typhimurium einen D-Wert von 0,8 bei 52°C (Bunning et al. 1990). Im Vergleich dazu gibt eine andere Arbeit D<sub>55°C</sub>-Werte von 1,7 – 5,7 für verschiedene *Salmonella enterica* Stämme an (Amado et al. 2013). Eine Studie zur Hitzebehandlung von *Salmonella* Typhimurium gibt D<sub>55°C</sub>-Werte von 0,51 an (Gabriel et al. 2008). Der in dieser Arbeit bestimmte Wert liegt zwischen den Werten der drei Studien. Einige andere Veröffentlichungen, in denen die Inaktivierung von *Salmonella* in verschiedenen Lebensmitteln thematisiert wird, werden deutlich höhere D-Werte beschrieben. So wurden hier D<sub>55°C</sub>-Werte von 67,7 und 8 – 9 Minuten für verschiedene Stämme und Lebensmittel angegeben (Sherry et al. 2004; Osaili et al. 2006).

Für *Escherichia coli* werden in der Arbeit von Amado D<sub>55°C</sub>-Werte zwischen 6,09 und 34,08 angegeben (Amado et al. 2013). Bei Durchführung eines Hitzeschocks in PBS im Wasserbad konnten D<sub>55°C</sub>-Werte von 1,18 – 2,55 ermittelt werden (Gabriel et al. 2008). In der Studie von Murano & Pierson wird ein D<sub>55°C</sub>-Werte von 8 angegeben (Murano & Pierson 1993). Bei Verwendung unterschiedlicher Bedingungen zur Anzucht von *E. coli* können je nach Behandlung verschiedene D<sub>55°C</sub>-Werte ermittelt werden. So wurden in der Veröffentlichung von Jackson exponentielle und stationäre Kulturen getestet, sowie verschiedene Lagertemperaturen vor dem Hitzeschock. Für exponentielle Vorkulturen konnten hier D<sub>55°C</sub>-Werte von 1,0 – 1,7 und für stationäre Vorkulturen zwischen 6,9 – 21,3 ermittelt werden (Jackson et al. 1995). Der in dieser Arbeit ermittelte D-Wert liegt im Bereich der Werte von Amado und Jackson und über

den Werten aus den Veröffentlichungen von Murano & Pierson sowie Gabriel (Murano & Pierson 1993; Jackson et al. 1995; Gabriel et al. 2008; Amado et al. 2013).

Ein  $D_{61^{\circ}\text{C}}$ -Wert für *Listeria monocytogenes* in Ready-to-eat Truthanfleischwurst liegt bei 2,04 Minuten (McCormick et al. 2003). In einer Studie von Lemaire konnten für verschiedene *Listeria monocytogenes* Stämme  $D_{60^{\circ}\text{C}}$ -Werte zwischen 1,3 – 6,5 ermittelt werden (Lemaire et al. 1989). Der in dieser Arbeit ermittelte D-Wert liegt über dem D-Wert für Ready-to-eat Truthanfleischwurst und im Bereich der Arbeit von Lemaire (Lemaire et al. 1989; McCormick et al. 2003). Bei McCormick liegt die Inkubationstemperatur  $1^{\circ}\text{C}$  über der in dieser Arbeit verwendeten Temperatur und kann somit einen Einfluss auf die Kinetik des Bakteriums haben (McCormick et al. 2003).

*Cronobacter sakazakii* zeigte in den vorliegenden Versuchen einen  $D_{55^{\circ}\text{C}}$ -Wert von 0,8 Minuten und damit den niedrigsten D-Wert. Vergleichend hierzu finden sich  $D_{52^{\circ}\text{C}}$ -Werte verschiedener *Cronobacter* Stämme von 12 – 16,18 und  $D_{56^{\circ}\text{C}}$ -Werte von 3,36 – 4,67 in Saline (Kim & Park 2007). In verschiedenen Milch- und Muttermilchersatzformeln konnten  $D_{54^{\circ}\text{C}}$ -Werte von 4,77 – 7,50 sowie  $D_{56^{\circ}\text{C}}$ -Werte von 1,49 -2,66 ermittelt werden (Osaili et al. 2009). In gelöster Pulver-Säuglingsnahrung wurden  $D_{54^{\circ}\text{C}}$ -Werte von 18,21 – 19,57 sowie  $D_{56^{\circ}\text{C}}$ -Werte von 4,52 - 4,64 für verschiedene *Cronobacter* Stämme beobachtet (Ghassem et al. 2011). Der in dieser Arbeit bestimmte D-Wert liegt deutlich unter den D-Werten der oben beschriebenen Veröffentlichungen.

Auch für den Hitzeschock von Bakterien gibt es einige Aspekte die einen Einfluss auf die Absterbe-Kinetik von Bakterien haben können. In der Arbeit von Amado, Ghassem, Lemaire zeigt sich, dass verschiedene Stämme desselben Bakteriums unterschiedliche D-Werte haben können (Lemaire et al. 1989; Ghassem et al. 2011; Amado et al. 2013). Dies wurde auch bereits für das Verhalten von verschiedenen Stämmen und Serotypen während der Trocknung beschrieben (Gruzdev et al. 2011; Margas 2016; Zoz et al. 2017). Weiterhin konnte auch in einer Veröffentlichung gezeigt werden, dass Kulturen in der stationären Phase widerstandsfähiger gegen Hitzestress sein können, als Kulturen in der exponentiellen Phase (Jackson et al. 1995). Nicht zuletzt kann auch ein unterschiedliches Medium bzw. das Vorhandensein einer Lebensmittelmatrix die Kinetik des Hitzeschocks beeinflussen und eventuell einen schützenden Effekt auf das Bakterium haben. So zeigte sich beispielsweise in

unterschiedlichen Milch- und Muttermilchersatzformeln für dasselbe Bakterium und dieselbe Temperatur ein Unterschied in den D-Werten (Osaili et al. 2009). Auch in der Veröffentlichung von Ghassem können Unterschiede in den D-Werten für verschiedene Medien festgestellt werden (Ghassem et al. 2011). Aufgrund dessen kann kein Standard D-Wert für das jeweilige Bakterium festgelegt und ermittelt werden, da sowohl das Medium, als auch der Stamm und die Wachstumsphase einen Einfluss auf die Keimzahlen während des Hitzeschocks haben können. Aufgrund dessen muss die Kinetik des Hitzeschocks für jeden neu untersuchten Stamm separat bestimmt werden. Auch bei Verwendung anderer Medien oder einer Lebensmittelmatrix kann ein Unterschied in der Reaktion des Bakteriums auf den Hitzeschock eintreten.

Die Konservierung von Bakterien mit Glycerin und die Lagerung bei Temperaturen unter 0°C ist ein weit verbreitetes und schon seit Jahren bekanntes Vorgehen. Durch den Zusatz von Glycerin in das Medium können Bakterien über einen längeren Zeitraum bei Minustemperaturen stabil gelagert werden (Howard 1955; Postgate & Hunter 1961). In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen Kulturen nach einem Hitzeschock in Nährmedium mit 15% Glycerin bei -80°C einzufrieren. Es konnte festgestellt werden, dass die Keimzahl über 120 – 140 Tage eine gute Stabilität zeigten. Auch eine Zunahme der Schädigung konnte kaum beobachtet werden. Dieser Effekt könnte einerseits dem zugegebenen Glycerin zugeschrieben werden, da für Glycerin ein protektiver Effekt bei der Kryokonservierung nachgewiesen wurde. Glycerin wird in die Zellen aufgenommen und kann dort die Bildung von Eiskristallen verhindern (Izawa et al. 2004). Es wurde vermutet, dass Glycerin auch an der Veränderung der Lipidzusammensetzung von Membranen verantwortlich ist (Izawa et al. 2004). Diese kann während eines Kälteschocks sowie auch während eines Hitzeschocks verändert werden um die Fluidität der Membran zu verändern (Chattopadhyay 2006). Auch eine Aggregation von Proteinen soll durch die Ansammlung von Glycerin verhindert werden (Chattopadhyay 2006). Neben den protektiven Eigenschaften von Glycerin, ist eine weitere Möglichkeit der Kreuzschutz von Bakterien. Werden Bakterien durch eine Veränderung in der Umwelt gestresst, so kann es sein, dass diese Zellen auch resistenter gegenüber anderen Arten des Stresses werden (Chung et al. 2006). So wurde bereits festgestellt, dass Hitzeschock Proteine nicht nur vor Hitzestress schützen, sondern auch die Toleranz beim Einfrieren der Zellen erhöhen (Chow & Tung 1998). Hitzeschock-Proteine werden unter verschiedenen Bedingungen aktiviert und sind nicht nur auf den Hitzeschock

beschränkt (Chow & Tung 1998, Courgeon et al. 1984; Michel & Starke 1986; Yura et al. 1993). Zur Überprüfung des Einflusses von Glycerin müssten weitere Versuche zum Einfrieren der Hitzeschock-Proben ohne Zugabe von Glycerin durchgeführt werden. Beim Einfrieren von Hitzeschock-Kulturen ist zu bedenken, dass beim Einfrieren der Zellen zusätzlich ein Kälteschock ausgelöst werden kann. Dies könnte potenziell einen weiteren Stress für die Zelle darstellen und man hätte keine reine Hitzeschock-Kultur mehr für die Untersuchungen vorliegen. Dies müsste durch molekulare Untersuchungen zur Charakterisierung des Stresses vor und nach dem Einfrieren, sowie nach Zugabe von Glycerin zu den Zellen geklärt werden.

Zusammenfassend lässt sich für die durchgeführten Untersuchungen sagen, dass es möglich ist Hitzeschock-Kulturen stabil bei -80°C, durch Zugabe von 15% Glycerin in das Nährmedium, zu lagern. Diese gelagerten Hitzeschock Kulturen zeigen auch bei langer Lagerung eine sehr stabile Keimzahl und können jederzeit für Validierungsversuche aufgetaut und eingesetzt werden. Somit ist es möglich, auch bei länger andauernden Untersuchungen dasselbe Referenzmaterial vorliegen zu haben. Die Eignung der geschädigten Bakterien zur artifiziellen Kontamination von Lebensmittelproben müsste untersucht werden.

## **5.5 Einsatz von geschädigten Bakterien für die Untersuchung von Lebensmitteln**

Die geschädigten Bakterien sollen in Zukunft für die Validierung von Nährmedien und Nachweissystemen, welche für die Lebensmittel- und Pharmabranche entwickelt wurden, eingesetzt werden. Aufgrund dessen wurde ein Validierungsversuch laut ISO 16140-3 und ISO 6579, mit Milchpulver als Lebensmittel, durchgeführt. Wie bereits beschrieben ist es angeraten, mit dem zu testenden Bakterium natürlich kontaminierte Lebensmittel für Validierungsversuche zu verwenden (ISO 6579:2002; ISO 16140-2:2016). Die verwendeten Lebensmittel dürfen aber auch artifiziell kontaminiert werden (Wallace 1996; ISO 16140-2:2016). Dabei werden häufig vitale, ungestresste Mikroorganismen eingesetzt, welche in einem Nährmedium und damit unter optimalen Bedingungen angezogen wurden (Finkel 2006). In der Umwelt und auch in Lebensmitteln kommen solche optimalen Bedingungen nicht zwangsläufig vor, was zum Stress für das Bakterium führen kann in dessen Verlauf die Bakterien auch geschädigt werden können (Finkel 2006). Selektive Stoffe in Nährmedien, welche zum

Nachweis von Bakterien in Lebensmitteln verwendet werden, können geschädigte Bakterien töten. Dadurch kann die Anzahl an Bakterien in einem Lebensmittel unterschätzt werden, was ein potenzielles Sicherheitsrisiko darstellen kann (Jassen et al. 2007). Für die Validierung von Anreicherungs- und Detektionsmethoden sollten daher, wann immer möglich, natürlich kontaminierte Lebensmittel oder gestresste Bakterien verwendet werden (Jassen et al. 2007). In dieser Arbeit wurden in Laktose getrocknete *Salmonella enterica* ser. Typhimurium zur Durchführung eines Validierungsversuchs mit Milchpulver verwendet. Um einen Vergleich für die Effektivität des Nachweises zu haben, wurden ebenfalls Lebensmittelproben mittels einer flüssigen, in gepuffertem Peptonwasser angezogenen, Bakterienkultur angeimpft. Dies stellt ein im Labor verwendetes Standardvorgehen dar. Es wurden mehrere Beutel mit Milchpulver artifiziell mit unterschiedlichen Keimmengen an ungestressten und gestressten Bakterien kontaminiert. Die Ergebnisse wurden miteinander verglichen. Letztlich kann die Aussage getroffen werden, dass die getrockneten Bakterien für die Validierung von Lebensmitteln eingesetzt werden können. Es zeigte sich, dass durch den Einsatz von getrockneten Bakterien ebenso viele Beutel positiv nachgewiesen werden konnten, wie es für die flüssige Kultur der Fall war. Da man die Keimzahl, im Vergleich zu der angesetzten Flüssigkultur, am Vortag bestimmen konnte, erleichterte dies zusätzlich die Kalkulation der Bakterienmenge für die Inokulation der Lebensmittel. Weitere Untersuchungen zum Einsatz der getrockneten Bakterien in Milchpulver sowie der Hitzeschockkulturen müssen noch durchgeführt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abram, Florence; Lee, Cheng S.; Gunnigle, Eoin; O'Flaherty, Vincent (2009): Optimisation of protein extraction and 2-DE for metaproteomics of microbial communities from anaerobic wastewater treatment biofilms. In: *Electrophoresis* 30 (23), S. 4149–4151. DOI: 10.1002/elps.200900474.
- Ahn, Sungeun; Jung, Jaejoon; Jang, In-Ae; Madsen, Eugene L.; Park, Woojun (2016): Role of Glyoxylate Shunt in Oxidative Stress Response. In: *Journal of Biological Chemistry* 291 (22), S. 11928–11938. DOI: 10.1074/jbc.M115.708149.
- Allwood, M C; Russell, A D (1967): Mechanism of Thermal Injury in *Staphylococcus aureus*: I. Relationship Between Viability and Leakage. In: *Applied Microbiology* 15 (6), S. 1266–1269.
- Amado, Isabel R.; Vázquez, Jose A.; Guerra, Nelson P.; Pastrana, Lorenzo (2014): Thermal resistance of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from vegetable feed ingredients. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94 (11), S. 2274–2281. DOI: 10.1002/jsfa.6554.
- Andino, A.; Hanning, I. (2015): *Salmonella enterica*. Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. In: *The Scientific World Journal* 2015 (7), S. 1–16. DOI: 10.1155/2015/520179.
- Andryushchenko, S. V.; Perunova, N. B.; Bukharin, O. V. (2014): Periplasmic lysozyme inhibitor pliC and its role in antilysozyme activity of enterobacteria. In: *Microbiology* 83 (3), S. 211–219. DOI: 10.1134/S0026261714030047.
- Andrews, Wallace H. (1996): Validation of modern methods in food microbiology by AOAC INTERNATIONAL collaborative study. In: *Food Control* 7 (1), S. 19–29. DOI: 10.1016/0956-7135(96)00007-2.
- Annous, Bassam (Hg.) (2012): *Salmonella* - Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies: InTech Open. DOI: 10.5772/2470; ISBN: 978-953-51-0661-6
- AOAC International (2012): AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. 2012-02
- AOAC International (2016): Final Report and Executive Summaries from the AOAC International Presidential Task Force on Best Practices in Microbiological Methodology, 2016-10, Nr. 12
- Asada, S.; Takano, M.; Shibasaki, I. (1979): Deoxyribonucleic acid strand breaks during drying of *Escherichia coli* on a hydrophobic filter membrane. In: *Applied and Environmental Microbiology* 37 (2), S. 266–273.
- Aviles, Bryan; Klotz, Courtney; Eifert, Joseph; Williams, Robert; Ponder, Monica (2013): Biofilms promote survival and virulence of *Salmonella enterica* sv. Tennessee during prolonged dry storage and after passage through an in vitro digestion system. In: *International Journal of Food Microbiology* 162 (3), S. 252–259. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.026.

- Balaji, B.; O'Connor, K.; Lucas, J. R.; Anderson, J. M.; Csonka, L. N. (2005): Timing of Induction of Osmotically Controlled Genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, Determined with Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR. In: *Applied and Environmental Microbiology* 71 (12), S. 8273–8283. DOI: 10.1128/AEM.71.12.8273–8283.2005.
- Barron, Juncal Caubilla; Forsythe, Stephen J. (2007): Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula. In: *Journal of Food Protection* 70 (9), S. 2111–2117.
- Battesti, Aurelia; Majdalani, Nadim; Gottesman, Susan (2011): The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli*. In: *Annual Review of Microbiology* 65 (1), S. 189–213. DOI: 10.1146/annurev-micro-090110-102946.
- Benov, Ludmil; Al-Ibraheem, Jameela (2002): Disrupting *Escherichia coli* a comparison of methods. In: *Journal of biochemistry and molecular biology* 35 (4), S. 428–431.
- Besse, N. G.; Brissonnet, F. D.; Lafarge, V.; Leclerc, V. (2000): Effect of various environmental parameters on the recovery of sublethally salt-damaged and acid-damaged *Listeria monocytogenes*. In: *Journal of Applied Microbiology* 89 (6), S. 944–950.
- Beuchat, L. R.; Heaton, E. K. (1975): *Salmonella* Survival on Pecans as Influenced by Processing and Storage Conditions. In: *Applied Microbiology* 29 (6), S. 795–801.
- Beuchat, Larry R.; Kim, Hoikyung; Gurtler, Joshua B.; Lin, Li-Chun; Ryu, Jee-Hoon; Richards, Glenner M. (2009): *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. In: *International Journal of Food Microbiology* 136 (2), S. 204–213. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.029.
- Beuchat, L.; Komitopoulou, E.; Betts, R.; Beckers, H.; Bourdichon, F.; et al. (2011): Persistence and Survival of Pathogens in Dry Foods and Dry Food Processing Environments. Belgium: International Life Sciences Institute Europe (ILSI).
- Bhunia, Arun K. (2008): Foodborne microbial pathogens. Mechanisms and pathogenesis. New York; Springer International Publishing AG. ISBN: 978-0-387-74537-4
- Billi, Daniela; Potts, Malcom (2002): Life and death of dried prokaryotes. In: *Research in Microbiology* (Vol. 153), S. 7–12.
- Botteldoorn, Nadine; van Coillie, Els; Grijspeerdt, Koen; Werbrouck, Hadewig; Haesebrouck, Freddy; Donné, Eef et al. (2006): Real-time reverse transcription PCR for the quantification of the *mntH* expression of *Salmonella enterica* as a function of growth phase and phagosome-like conditions. In: *Journal of Microbiological Methods* 66 (1), S. 125–135. DOI: 10.1016/j.mimet.2005.11.003.
- Breeuwer, P.; Lardeau, A.; Peterz, M.; Joosten, H.M. (2003): Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. In: *J Appl Microbiol* 95 (5), S. 967–973. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02067.x.
- Brown, Geoffrey R.; Sutcliffe, Iain C.; Bendell, David; Cummings, Stephen P. (2000): The modification of the membrane of *Oceanomonas baumannii* when subjected to both osmotic and organic solvent stress. In: *FEMS Microbiology Letters* 189, S. 149–154.
- Brzozowski, Tomasz (Hg.) (2012): New Advances in the Basic and Clinical Gastroenterology: InTech Open. DOI: 10.5772/2238; ISBN: 978-953-51-0521-3

- Bunning, V. K.; Crawford, R. G.; Tierney, J. T.; Peeler, J. T. (1990): Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after sublethal heat shock. In: *Applied and environmental microbiology* 56 (10), S. 3216–3219.
- Burgess, Catherine M.; Gianotti, Andrea; Gruzdev, Nadia; Holah, John; Knøchel, Susanne; Lehner, Angelika et al. (2016): The response of foodborne pathogens to osmotic and desiccation stresses in the food chain. In: *International Journal of Food Microbiology* 221, S. 37–53. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.014.
- Burnett, S. L.; Gehm, E. R.; Weissinger, W. R.; Beuchat, L. R. (2000): Survival of *Salmonella* in peanut butter and peanut butter spread. In: *Journal of applied microbiology* 89 (3), S. 472–477.
- Busch, S. V.; Donnelly, C. W. (1992): Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. In: *Applied and environmental microbiology* 58 (1)
- Chakraborty, Smarajit; Winardhi, Ricksen S.; Morgan, Leslie K.; Yan, Jie; Kenney, Linda J. (2017): Non-canonical activation of OmpR drives acid and osmotic stress responses in single bacterial cells. In: *Nature Communications* 8 (1), S. 1748. DOI: 10.1038/s41467-017-02030-0.
- Chang, Qing; Amemiya, Takashi; Liu, Jianbo; Xu, Xiaojing; Rajendran, Narasimmalu; Itoh, Kiminori (2009): Identification and validation of suitable reference genes for quantitative expression of xylA and xylE genes in *Pseudomonas putida* mt-2. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107 (2), S. 210–214. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2008.09.017.
- Chattopadhyay, M. K. (2006): Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. In: *Journal of biosciences* 31 (1), S. 157–165.
- Chen, Zhao; Jiang, Xiuping; Dozois, Charles M. (2017): Thermal Resistance and Gene Expression of both Desiccation-Adapted and Rehydrated *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Cells in Aged Broiler Litter. In: *Applied and Environmental Microbiology* 83 (12), S. e00367-17. DOI: 10.1128/AEM.00367-17.
- Choby, Jacob E.; Skaar, Eric P. (2016): Heme Synthesis and Acquisition in Bacterial Pathogens. In: *Journal of Molecular Biology* 428 (17), S. 3408–3428. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.03.018.
- Chow, King-Chuen; Tung, Wai Lin (1998): Overexpression of dnaK/dnaJ and groEL confers freeze tolerance to *Escherichia coli*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 253 (2), S. 502–505. DOI: 10.1006/bbrc.1998.9766.
- Christman, Michael F.; Morgan, Robin W.; Jacobson, Fredric S.; Ames, Bruce N. (1985): Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. In: *Cell* 41 (3), S. 753–762. DOI: 10.1016/S0092-8674(85)80056-8.
- Chung, Ji Hyung; Park, Hyun-Young; Lee, Jong Ho; Jang, Yangsoo (2002): Identification of the dTIP- and XTP-hydrolyzing protein from *Escherichia coli*. In: *Journal of biochemistry and molecular biology* 35 (4), S. 403–408.
- Chung, H.J.; Bang, W.; Drake, M.A. (2006): Stress Response of *Escherichia coli*. In: *Comp Rev Food Sci Food Safety* 5 (3), S. 52–64. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2006.00002.x.

- Clark, C. W.; Ordal, Z. J. (1969): Thermal injury and recovery of *Salmonella typhimurium* and its effect on enumeration procedures. In: *Applied microbiology* 18 (3), S. 332–336.
- Clavijo, R. I.; Loui, C.; Andersen, G. L.; Riley, L. W.; Lu, S. (2006): Identification of Genes Associated with Survival of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Chicken Egg Albumen. In: *Applied and environmental microbiology* 72 (2), S. 1055–1064. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1055–1064.2006.
- Courgeon, A. M.; Maisonhaute, C.; Best-Belpomme, M. (1984): Heat shock proteins are induced by cadmium in *Drosophila* cells. In: *Experimental cell research* 153 (2), S. 515–521.
- Crowe, Lois M.; Crowe, John H.; Rudolph, Alan; Womersley, Christopher; Appel, Lori (1985): Preservation of Freeze-Dried Liposomes by Trehalose. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 242 (1), S. 240–247.
- Crum-Cianflone, Nancy F. (2008): Salmonellosis and the gastrointestinal tract: more than just peanut butter. In: *Current gastroenterology reports* 10 (4), S. 424–431.
- Csonka, Laszlo N. (1989): Physiological and Genetic Responses of Bacteria to Osmotic Stress. In: *American Society for Microbiology* 53 (1), S. 121–147.
- Cummings, Lisa A.; Wilkerson, W. David; Bergsbaken, Tessa; Cookson, Brad T. (2006): In vivo, fliC expression by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is heterogeneous, regulated by ClpX, and anatomically restricted. In: *Molecular Microbiology* 61 (3), S. 795–809. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05271.x.
- Cytryn, E. J.; Sangurdekar, D. P.; Streeter, J. G.; Franck, W. L.; Chang, W.-s.; Stacey, G. et al. (2007): Transcriptional and Physiological Responses of *Bradyrhizobium japonicum* to Desiccation-Induced Stress. In: *Journal of Bacteriology* 189 (19), S. 6751–6762. DOI: 10.1128/JB.00533-07.
- Dahl, Jan-Ulrik; Koldewey, Philipp; Salmon, Loïc; Horowitz, Scott; Bardwell, James C. A.; Jakob, Ursula (2015): HdeB Functions as an Acid-protective Chaperone in Bacteria. In: *Journal of Biological Chemistry* 290 (1), S. 65–75. DOI: 10.1074/jbc.M114.612986.
- Darwin, K.H. (2001): Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*. In: *The EMBO Journal* 20 (8), S. 1850–1862. DOI: 10.1093/emboj/20.8.1850.
- Davidson, J. F.; Schiestl, R. H. (2001): Mitochondrial Respiratory Electron Carriers Are Involved in Oxidative Stress during Heat Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecular and Cellular Biology* 21 (24), S. 8483–8489. DOI: 10.1128/MCB.21.24.8483-8489.2001.
- Davidson, J. F.; Whyte, B.; Bissinger, P. H.; Schiestl, R. H. (1996): Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (10), S. 5116–5121.
- Deng, Xiangyu; Li, Zengxin; Zhang, Wei (2012): Transcriptome sequencing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. In: *Food Microbiology* 30 (1), S. 311–315. DOI: 10.1016/j.fm.2011.11.001.

- Deng, Y.; Ryu, J. H.; Beuchat, L. R. (1998): Influence of temperature and pH on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry foods and growth in reconstituted infant rice cereal. In: *International Journal of Food Microbiology* 45 (3), S. 173–184.
- Deutsches Institut für Normung (1984): DIN 10161-1:1984, 02-1984: Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen; Bestimmung der aeroben Keimzahl bei 30 °C. Tropfplatten-Verfahren.
- Ding, Jienv; Yang, Chengfeng; Niu, Xiaogang; Hu, Yunfei; Jin, Changwen (2015): HdeB chaperone activity is coupled to its intrinsic dynamic properties. In: *Scientific Reports* 5 (1), S. 1292. DOI: 10.1038/srep16856.
- Dong, Tao; Schellhorn, Herb E. (2009): Global effect of RpoS on gene expression in pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. In: *BMC Genomics* 10 (1), S. 349. DOI: 10.1186/1471-2164-10-349.
- Doyle, Michael P.; Meske, Louise M.; Marth, Elmer H. (1985): Survival of *Listeria monocytogenes* During the Manufacture and Storage of Nonfat Dry Milk. In: *Journal of Food Protection* 48 (9), S. 740–742.
- Doyle, Michael P.; Steenson, Larry R.; Meng, Jianghong (2013): Bacteria in Food and Beverage Production. In: Eugene Rosenberg, Edward F. DeLong, Stephen Lory, Erko Stackebrandt und Fabiano Thompson (Hg.): *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 241–256.
- Du, Hong; Wang, Min; Luo, Zhe; Ni, Bin; Wang, Fei; Meng, Yan Chen et al. (2011): Coregulation of Gene Expression by Sigma Factors RpoE and RpoS in *Salmonella enterica* Serovar Typhi During Hyperosmotic Stress. In: *Curr Microbiol* 62 (5), S. 1483–1489. DOI: 10.1007/s00284-011-9890-8.
- Edelson-Mammel, Sharon G.; Porteous, Mary K.; Buchanan, Robert L. (2005): Survival of *Enterobacter sakazakii* in a dehydrated powdered infant formula. In: *Journal of Food Protection* 68 (9), S. 1900–1902.
- Edyta, Margas (2016, Dissertation). The survival and control of *Salmonella* in low water activity foods' environments. Universität von Nottingham
- El-Gazzar, Fathy E.; Bohner; Hans F.; Marth; Elmer H (1991): Growth of *Listeria monocytogenes* at 4, 32, and 40°C in Skim Milk and in Retentate and Permeate from Ultrafiltered Skim Milk. In: *Journal of food protection* 54 (5), S. 338–342. DOI: 10.4315/0362-028X-54.5.338.
- Environmental Protection Agency (EPA 2010): Microbiological Alternate Test Procedure ATP Protocol for Drinking Water, Ambient Water, Wastewater and Sewage Sludge Monitoring Methods; 2010-9.
- Esbelin, Julia; Santos, Tiago; Hébraud, Michel (2018): Desiccation: An environmental and food industry stress that bacteria commonly face. In: *Food Microbiology* 69, S. 82–88. DOI: 10.1016/j.fm.2017.07.017.
- Europäische Gemeinschaft (2005): Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel.
- European Food Safety Authority (2017): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. In: *EFS2* 15 (12), S. 148. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.5077.
- Everse, Johannes; Nelson, Hsia (1997): The Toxicities of Native and Modified Hemoglobins. In: *Elsevier Science Inc.* 22 (6), S. 1075–1099.

- Farber, J. M.; Sanders, G. W.; Speirs, J. I.; D'Aoust, J. Y.; Emmons, D. B.; McKellar, R. (1988): Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in inoculated and naturally contaminated raw milk. In: *International Journal of Food Microbiology* 7 (4), S. 277–286.
- Farrokh, Choreh; Jordan, Kieran; Auvray, Frederic; Glass, Kathleen; Oppegaard, Hanne; Raynaud, Sabrina et al. (2013): Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. In: *International Journal of Food Microbiology* 162 (2), S. 190–212. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008.
- Finkel, Steven E. (2006): Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. In: *Nature Reviews Microbiology* 4 (2), S. 113–120. DOI: 10.1038/nrmicro1340.
- Finn, S.; Handler, K.; Condell, O.; Colgan, A.; Cooney, S.; McClure, P. et al. (2013a): ProP Is Required for the Survival of Desiccated *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Cells on a Stainless Steel Surface. In: *Applied and Environmental Microbiology* 79 (14), S. 4376–4384. DOI: 10.1128/AEM.00515-13.
- Finn, Sarah; Condell, Orla; McClure, Peter; Amézquita, Alejandro; Fanning, Séamus (2013): Mechanisms of survival, responses and sources of *Salmonella* in low-moisture environments. In: *Frontiers in Microbiology* 4. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00331.
- Fischer, Daniele; Teich, Antje; Neubauer, Peter; Hengge-Aronis, Regine (1998): The General Stress Sigma Factor  $\zeta$ S of *Escherichia coli* Is Induced during Diauxic Shift from Glucose to Lactose. In: *Journal of bacteriology* 180 (23), S. 6203–6206.
- Florindo, C.; Ferreira, R.; Borges, V.; Spellerberg, B.; Gomes, J.P.; Borrego, M.J. (2012): Selection of reference genes for real-time expression studies in *Streptococcus agalactiae*. In: *Journal of Microbiological Methods* 90 (3), S. 220–227. DOI: 10.1016/j.mimet.2012.05.011.
- Follmann, Martin; Ochrombel, Ines; Krämer, Reinhard; Trötschel, Christian; Poetsch, Ansgar; Rückert, Christian et al. (2009): Functional genomics of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis. In: *BMC Genomics* 10 (1), S. 621. DOI: 10.1186/1471-2164-10-621.
- França, M.B.; Panek, A.D.; Eleutherio, E.C.A. (2007): Oxidative stress and its effects during dehydration. In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 146 (4), S. 621–631. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.02.030.
- Fränzel, Benjamin; Trötschel, Christian; Rückert, Christian; Kalinowski, Jörn; Poetsch, Ansgar; Wolters, Dirk Andreas (2010): Adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to salt-stress conditions. In: *Proteomics* 10 (3), S. 445–457. DOI: 10.1002/pmic.200900482.
- Friedemann, Miriam (2007): *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). In: *International Journal of Food Microbiology* 116 (1), S. 1–10. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.018.
- Gabriel, Alonzo A.; Nakano, Hiroyuki (2009): Inactivation of *Salmonella*, *E. coli* and *Listeria monocytogenes* in phosphate-buffered saline and apple juice by ultraviolet and heat treatments. In: *Food Control* 20 (4), S. 443–446. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.08.008.

- Gal-Mor, Ohad; Elhadad, Dana; Deng, Wanyin; Rahav, Galia; Finlay, Brett B.; Chakravorty, Dipshikha (2011): The *Salmonella enterica* PhoP Directly Activates the Horizontally Acquired SPI-2 Gene *sseL* and Is Functionally Different from a *S. bongori* Ortholog. In: *PloS one* 6 (5), S. e20024. DOI: 10.1371/journal.pone.0020024.
- García, Armando Hernández (2011): Anhydrobiosis in bacteria: From physiology to applications. In: *Journal of Biosciences* 36 (5), S. 939–950. DOI: 10.1007/s12038-011-9107-0.
- Ghassem, M.; Babji, A. S.; Forsythe, S. J.; Norrakhia, A. S. (2011): Growth and survival of *Cronobacter* species as measured by media performance. In: *International Food Research Journal* 18, S. 367–372.
- Ginther, C. L.; Ingraham, J. L. (1974): Nucleoside diphosphokinase of *Salmonella typhimurium*. In: *The Journal of biological chemistry* 249 (11), S. 3406–3411.
- Grunden, A. M.; Shanmugam, K. T. (1997): Molybdate transport and regulation in bacteria. In: *Archives of microbiology* 168 (5), S. 345–354.
- Gruzdev, Nadia; McClelland, Michael; Porwollik, Steffen; Ofaim, Shany; Pinto, Riky; Saldinger-Sela, Shlomo (2012): Global Transcriptional Analysis of Dehydrated *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. In: *Applied Environmental Microbiology*. 78 (22), S. 7866–7875. DOI: 10.1128/AEM.01822-12.
- Gruzdev, Nadia; Pinto, Riky; Sela, Shlomo (2011): Effect of Desiccation on Tolerance of *Salmonella enterica* to Multiple Stresses. In: *Applied Environmental Microbiology*. 77 (5), S. 1667–1673. DOI: 10.1128/AEM.02156-10.
- Gruzdev, Nadia; Pinto, Riky; Sela, Shlomo (2012): Persistence of *Salmonella enterica* during dehydration and subsequent cold storage. In: *Food Microbiology* 32 (2), S. 415–422. DOI: 10.1016/j.fm.2012.08.003.
- Gülez, Gamze; Dechesne, Arnaud; Workman, Christopher T.; Smets, Barth F. (2012): Transcriptome Dynamics of *Pseudomonas putida* KT2440 under Water Stress. In: *Applied Environmental Microbiology*. 78 (3), S. 676–683. DOI: 10.1128/AEM.06150-11.
- Guyard-Nicodème, Muriel; Bazire, Alexis; Hémerly, Gaëlle; Meylheuc, Thierry; Mollé, Daniel; Orange, Nicole et al. (2008): Outer membrane Modifications of *Pseudomonas fluorescens* MF37 in Response to Hyperosmolarity. In: *Journal of Proteome Research* 7 (3), S. 1218–1225. DOI: 10.1021/pr070539x.
- Halsey, T. A.; Vazquez-Torres, A.; Gravidahl, D. J.; Fang, F. C.; Libby, S. J. (2004): The Ferritin-Like Dps Protein Is Required for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Oxidative Stress Resistance and Virulence. In: *Infection and Immunity* 72 (2), S. 1155–1158. DOI: 10.1128/IAI.72.2.1155–1158.2004.
- Halverson, Larr J.; Firestone, Mary K. (2000): Differential Effects of Permeating and Nonpermeating Solutes on the Fatty Acid Composition of *Pseudomonas putida*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 66 (6), S. 2414–2421.
- He, Z.; Zhou, A.; Baidoo, E.; He, Q.; Joachimiak, M. P.; Benke, P. et al. (2010): Global Transcriptional, Physiological, and Metabolite Analyses of the Responses of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough to Salt Adaptation. In: *Applied and Environmental Microbiology* 76 (5), S. 1574–1586. DOI: 10.1128/AEM.02141-09.

- Hennekinne, Jacques-Antoine; Buyser, Marie-Laure de; Dragacci, Sylviane (2012): *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. In: *FEMS Microbiology Reviews* 36 (4), S. 815–836. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x.
- Hingston, Patricia A.; Piercey, Marta J.; Truelstrup Hansen, Lisbeth; Björkroth, J. (2015): Genes Associated with Desiccation and Osmotic Stress in *Listeria monocytogenes* as Revealed by Insertional Mutagenesis. In: *Applied Environmental Microbiology* 81 (16), S. 5350–5362. DOI: 10.1128/AEM.01134-15.
- Hiramatsu, R.; Matsumoto, M.; Sakae, K.; Miyazaki, Y. (2005): Ability of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* To Survive in a Desiccation Model System and in Dry Foods. In: *Applied and Environmental Microbiology* 71 (11), S. 6657–6663. DOI: 10.1128/AEM.71.11.6657–6663.2005.
- Hoekstra, Folkert A.; Golovina, Elena A.; Buitink, Julia (2001): Mechanisms of plant desiccation tolerance. In: *Trends in Plant Science* 6 (9), S. 431–438.
- Howard, D. H. (1956): The preservation of bacteria by freezing in glycerol broth. In: *Journal of bacteriology* 71 (5), S. 625.
- Huggett, J.; Dheda, K.; Bustin, S.; Zumla, A. (2005): Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. In: *Genes & Immunity* 6 (4), S. 279–284. DOI: 10.1038/sj.gene.6364190.
- Ibanez-Ruiz, M.; Robbe-Saule, V.; Hermant, D.; Labrude, S.; Norel, F. (2000): Identification of RpoS (sigma(S))-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. In: *Journal of bacteriology* 182 (20), S. 5749–5756.
- Institute of Food Technologists & Food and Drug Administration (2001): Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods. In: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2.
- International Association for Standardisation (2014): DIN ISO 11133:2014, Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser - Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien; 2014-11.
- International Association for Standardisation (2002): ISO 6579:2002, 07-2002: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella spp.*
- International Association for Standardisation (2016): ISO 22964:2006, 02-2016: Milk and milk products — Detection of *Enterobacter sakazakii*.
- International Association for Standardisation (2016): ISO 16140-1:2016, 06-2016: Microbiology of the food chain — Method validation — Part 1: Vocabulary.
- International Association for Standardisation (2016): ISO 16140-2:2016, 06-2016: Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
- International Association for Standardisation (2017) Draft ISO 16140-3:2017, 02-2017: Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory.
- International Association for Standardisation (2017): ISO11290-1:2017, 05-2017: Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria spp.* —Part 1: Detection method.

- Izawa, Shingo; Sato, Machiko; Yokoigawa, Kumio; Inoue, Yoshiharu (2004): Intracellular glycerol influences resistance to freeze stress in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of a quadruple mutant in glycerol dehydrogenase genes and glycerol-enriched cells. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 66 (1), S. 108–114. DOI: 10.1007/s00253-004-1624-4.
- Jackson, T. C.; Hardin, M. D.; Acuff, G. R. (1996): Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in a nutrient medium and in ground beef patties as influenced by storage and holding temperatures. In: *Journal of food protection* 59 (3), S. 230–237.
- Jain, Nishant Kumar; Roy, Ipsita (2008): Effect of trehalose on protein structure. In: *Protein Science* 103, S. NA. DOI: 10.1002/pro.3.
- Jasson, Vicky; Uyttendaele, Mieke; Rajkovic, Andreja; Debevere, Johan (2007): Establishment of procedures provoking sub-lethal injury of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* O157 to serve method performance testing. In: *International Journal of Food Microbiology* 118 (3), S. 241–249. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.016.
- Jennison, M. W.; Wadsworth, G. P. (1940): Evaluation of the Errors Involved in Estimating Bacterial Numbers by the Plating Method. In: *Journal of Bacteriology* 39 (4), S. 389–397.
- Joerger, Rolf D.; Sartori, Casey; Frye, Jonathan G.; Turpin, Jennifer B.; Schmidt, Carl; McClelland, Michael; Porwollik, Steffen (2012): Gene Expression Analysis of *Salmonella enterica* Enteritidis Nal R and *Salmonella enterica* Kentucky 3795 Exposed to HCl and Acetic Acid in Rich Medium. In: *Foodborne Pathogens and Disease* 9 (4), S. 331–337. DOI: 10.1089/fpd.2011.0984.
- Jordan, A.; Aslund, F.; Pontis, E.; Reichard, P.; Holmgren, A. (1997): Characterization of *Escherichia coli* NrdH. A glutaredoxin-like protein with a thioredoxin-like activity profile. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (29), S. 18044–18050.
- Justino, Marta C.; Almeida, Cláudia C.; Teixeira, Miguel; Saraiva, Lígia M. (2007): *Escherichia coli* Di-iron YtfE Protein Is Necessary for the Repair of Stress-damaged Iron-Sulfur Clusters. In: *Journal of Biological Chemistry* 282 (14), S. 10352–10359. DOI: 10.1074/jbc.M610656200.
- Juven, B. J.; Cox, N. A.; Bailey, J. S.; Thomson, J. E.; Charles, O. W.; Shutze, J. V. (1984): Survival of *Salmonella* in Dry Food and Feed. In: *Journal of Food Protection* 47 (6), S. 445–448.
- Kadariya, Jhalka; Smith, Tara C.; Thapaliya, Dipendra (2014): *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. In: *BioMed Research International* 1, S. 1–9. DOI: 10.1155/2014/827965.
- Kang, Jonathan (2012; Bachelorarbeit): Thermal persistence in *E. coli* and the heat shock response. Brown Universität, USA.
- Kaper, James B.; Nataro, James P.; Mobley, Harry L. T. (2004): Pathogenic *Escherichia coli*. In: *Nature Reviews Microbiology* 2 (2), S. 123–140. DOI: 10.1038/nrmicro818.
- Karas, Vlad O.; Westerlaken, Ilja; Meyer, Anne S.; Gourse, R. L. (2015): The DNA-Binding Protein from Starved Cells (Dps) Utilizes Dual Functions To Defend Cells against Multiple Stresses. In: *Journal of Bacteriology* 197 (19), S. 3206–3215. DOI: 10.1128/JB.00475-15.

- Kashmiri, Z. N.; Mankar, S. A. (2014): Free radicals and oxidative stress in bacteria. In: *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3 (9), S. 34–40.
- Kell, D. B.; Kaprelyants, A. S.; Weichart, D. H.; Harwood, C. R.; Barer, M. R. (1998): Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 73 (2), S. 169–187.
- Kim, H.-J.; Kim, T.-H.; Kim, Y.; Lee, H.-S. (2004): Identification and Characterization of *glxR*, a Gene Involved in Regulation of Glyoxylate Bypass in *Corynebacterium glutamicum*. In: *Journal of bacteriology* 186 (11), S. 3453–3460. DOI: 10.1128/JB.186.11.3453–3460.2004.
- Kim, Soo-Hwan; Park, Jong-Hyun (2007): Thermal resistance and inactivation of *Enterobacter sakazakii* isolates during rehydration of powdered infant formula. In: *Journal of microbiology and biotechnology* 17 (2), S. 364–368.
- Kimber, Martha A.; Kaur, Harbir; Wang, Luxin; Danyluk, Michelle D.; Harris, Linda J. (2012): Survival of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on Inoculated Almonds and Pistachios Stored at –19, 4, and 24°C. In: *Journal of Food Protection* 75 (8), S. 1394–1403. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-12-023.
- Kocharunchitt, Chawalit; King, Thea; Gobius, Kari; Bowman, John P.; Ross, Tom; Chatterji, Dipankar (2014): Global Genome Response of *Escherichia coli* O157:H7 Sakai during Dynamic Changes in Growth Kinetics Induced by an Abrupt Downshift in Water Activity. In: *PLOS ONE* 9 (3), S. e90422. DOI: 10.1371/journal.pone.0090422.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Lago, Magali; Monteil, Véronique; Douche, Thibaut; Guglielmini, Julien; Criscuolo, Alexis; Maufrais, Corinne et al. (2017): Proteome remodelling by the stress sigma factor RpoS/σS in *Salmonella*: identification of small proteins and evidence for post-transcriptional regulation. In: *Scientific Reports* 7 (1), S. 37. DOI: 10.1038/s41598-017-02362-3.
- Lebre, Pedro H.; Maayer, Pieter de; Cowan, Don A. (2017): Xerotolerant bacteria: surviving through a dry spell. In: *Nature Reviews Microbiology* 15 (5), S. 285–296. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.16.
- Lee, S. K.; Newman, J. D.; Keasling, J. D. (2005): Catabolite Repression of the Propionate Catabolic Genes in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: Evidence for Involvement of the Cyclic AMP Receptor Protein. In: *Journal of bacteriology* 187 (8), S. 2793–2800. DOI: 10.1128/JB.187.8.2793–2800.2005.
- Leslie, Samuel B.; Israeli, Eitan; Lighthart, Bruce; Crowe, John H.; Crowe, Lois M. (1995): Trehalose and Sucrose Protect Both Membranes and Proteins in Intact Bacteria during Drying. In: *Applied and Environmental Microbiology* 61 (10), S. 3592–3597.
- Lévi-Meyrueis, Corinne; Monteil, Véronique; Sismeiro, Odile; Dillies, Marie-Agnès; Monot, Marc; Jagla, Bernd et al. (2014): Expanding the RpoS/σS-Network by RNA Sequencing and Identification of σS-Controlled Small RNAs in *Salmonella*. In: *PLOS ONE* 9 (5), S. e96918. DOI: 10.1371/journal.pone.0096918.

- Leyer, Ilona; Wesche, Karsten (2008): *Multivariate Statistik in der Ökologie. Eine Einführung. Korrigierter Nachdruck* Berlin, Heidelberg [u.a.]: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Leysen, S.; van Herreweghe, J.M.; Callewaert, L.; Heirbaut, M.; Buntinx, P.; Michiels, C.W.; Strelkov, S.V. (2011): Molecular Basis of Bacterial Defense against Host Lysozymes: X-ray Structures of Periplasmic Lysozyme Inhibitors PliI and PliC. In: *Journal of Molecular Biology* 405 (5), S. 1233–1245. DOI: 10.1016/j.jmb.2010.12.007.
- Li, Fangfang; Wang, Yang; Gong, Kai; Wang, Qian; Liang, Quanfeng; Qi, Qingsheng (2014): Constitutive expression of RyhB regulates the heme biosynthesis pathway and increases the 5-aminolevulinic acid accumulation in *Escherichia coli*. In: *FEMS Microbiology Letters* 350 (2), S. 209–215. DOI: 10.1111/1574-6968.12322.
- Li, Haiping; Bhaskara, Anuhya; Megalis, Christina; Tortorello, Mary Lou (2012): Transcriptomic Analysis of *Salmonella* Desiccation Resistance. In: *Foodborne Pathogens and Disease* 9 (12), S. 1143–1151. DOI: 10.1089/fpd.2012.1254.
- Li, Hui; Gänzle, Michael (2016): Some Like It Hot: Heat Resistance of *Escherichia coli* in Food. In: *Frontiers in Microbiology* 7, S. 2226. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01763.
- Lian, Feng; Zhao, Wei; Yang, Rui-jin; Tang, Yali; Katiyo, Wendy (2015): Survival of *Salmonella enterica* in skim milk powder with different water activity and water mobility. In: *Food Control* 47, S. 1–6. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.06.036.
- Lloyd, R. G.; Buckman, C. (1991): Genetic analysis of the recG locus of *Escherichia coli* K-12 and of its role in recombination and DNA repair. In: *Journal of bacteriology* 173 (3), S. 1004–1011.
- Lindhardt, Charlotte (2014) persönliche Mitteilung vom 10.08.2014: In der Vergangenheit bei der Firma Merck KGaA in Darmstadt durchgeführte Versuche zur Trocknung von Salmonellen in pulverförmiger Laktose. Merck KGaA in Darmstadt.
- Lindner, Sabine (2014, Masterarbeit): Entwicklung einer Real-Time PCR zum simultanen Nachweis von *Listeria spp.* und *Listeria monocytogenes*. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Mahdi, A. A.; McGlynn, P.; Levett, S. D.; Lloyd, R. G. (1997): DNA binding and helicase domains of the *Escherichia coli* recombination protein RecG. In: *Nucleic acids research* 25 (19), S. 3875–3880.
- Malafaia, Carolina B.; Guerra, Myrzânia L.; Silva, Túlio D.; Paiva, Patrícia M. G.; Souza, Elineide B.; Correia, Maria T. S.; Silva, Márcia V. (2015): Selection of a protein solubilization method suitable for phytopathogenic bacteria: a proteomics approach. In: *Proteome Science* 13 (1), S. 407. DOI: 10.1186/s12953-015-0062-9.
- Mandal, Rabindra K.; Kwon, Young M. (2017): Global Screening of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Genes for Desiccation Survival. In: *Frontiers in Microbiology* 8, S. 69. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01723.
- Mao, Y.; Doyle, M. P.; Chen, J. (2001): Insertion Mutagenesis of wca Reduces Acid and Heat Tolerance of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. In: *Journal of Bacteriology* 183 (12), S. 3811–3815. DOI: 10.1128/JB.183.12.3811–3815.2001.
- Marco, M.L.; Kleerebezem, M. (2008): Assessment of real-time RT-PCR for quantification of *Lactobacillus plantarum* gene expression during stationary phase and nutrient starvation. In: *Journal of Applied Microbiology* 104 (2), S. 587–594. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03578.x.

- Margas, Edyta (2016, Dissertation): The survival and control of *Salmonella* in low water activity foods' environments. Universität von Nottingham.
- Margas, Edyta; Alstrom-Moore, Amias; Dodd, Christine; Holah, John (2011): *Salmonella* survival in low aw environment. The University of Nottingham. In: *11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11)* (Abstract).
- Martinez, A.; Kolter, R. (1997): Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. In: *Journal of bacteriology* 179 (16), S. 5188–5194.
- Maserati, Alice (2017, Dissertation): *Salmonella's* Desiccation Survival and Thermal Tolerance: Genetic, Physiological and Metabolic Factors. Universität von Minnesota.
- Maserati, Alice; Fink, Ryan C.; Lourenco, Antonio; Julius, Matthew L.; Diez-Gonzalez, Francisco; Nierman, William C. (2017): General response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to desiccation: A new role for the virulence factors *sopD* and *sseD* in survival. In: *PLOS ONE* 12 (11), S. e0187692. DOI: 10.1371/journal.pone.0187692.
- McCormick, K.; Han, I. Y.; Acton, J. C.; Sheldon, B. W.; Dawson, P. L. (2003): D and z-values for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* typhimurium in packaged low-fat ready-to-eat turkey bologna subjected to a surface pasteurization treatment. In: *Poultry science* 82 (8), S. 1337–1342.
- McMeechan, A.; Roberts, M.; Cogan, T. A.; Jorgensen, F.; Stevenson, A.; Lewis, C. et al. (2007): Role of the alternative sigma factors E and S in survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium during starvation, refrigeration and osmotic shock. In: *Microbiology* 153 (1), S. 263–269. DOI: 10.1099/mic.0.29235-0.
- McMillan, Mary; Pereg, Lily (2014): Evaluation of reference genes for gene expression analysis using quantitative RT-PCR in *Azospirillum brasilense*. In: *PLOS ONE* 9 (5), S. e98162. DOI: 10.1371/journal.pone.0098162.
- McQuiston, J. R.; Herrera-Leon, S.; Wertheim, B. C.; Doyle, J.; Fields, P. I.; Tauxe, R. V.; Logsdon, J. M. (2008): Molecular Phylogeny of the *Salmonellae*: Relationships among *Salmonella* Species and Subspecies Determined from Four Housekeeping Genes and Evidence of Lateral Gene Transfer Events. In: *Journal of Bacteriology* 190 (21), S. 7060–7067. DOI: 10.1128/JB.01552-07.
- Mehmeti, Ibrahim; Kiran, Fadime; Osmanagaoglu, Ozlem: Comparison of three methods for determination of protein concentration in lactic acid bacteria for proteomics studies. In: *African Journal of Biotechnology* 10 (11), S. 2178–2185.
- Mehra, Amit; Lee, Kelvin H.; Hatzimanikatis, Vassily (2003): Insights into the relation between mRNA and protein expression patterns: I. theoretical considerations. In: *Biotechnology and Bioengineering* 84 (7), S. 822–833. DOI: 10.1002/bit.10860.
- Meng, X.C.; Stanton, C.; Fitzgerald, G.F.; Daly, C.; Ross, R.P. (2008): Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. In: *Food Chemistry* 106 (4), S. 1406–1416. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.04.076.
- Mey, Marjan de; Lequeux, Gaspard J.; Maertens, Jo; Muynck, Cassandra I. de; Soetaert, Wim K.; Vandamme, Erick J. (2008): Comparison of protein quantification and extraction methods suitable for *E. coli* cultures. In: *Biologicals* 36 (3), S. 198–202. DOI: 10.1016/j.biologicals.2007.10.001.

- Michalik, Stephan; Liebeke, Manuel; Zühlke, Daniela; Lalk, Michael; Bernhardt, Jörg; Gerth, Ulf; Hecker, Michael (2009): Proteolysis during long-term glucose starvation in *Staphylococcus aureus* COL. In: *Proteomics* 9 (19), S. 4468–4477. DOI: 10.1002/pmic.200900168.
- Michel, Gérard P.F.; Starka, Jiri (1986): Effect of Ethanol and Heat Stresses on the Protein Pattern of *Zymomonas mobilis*. In: *Journal of Bacteriology* (Vol. 165, No. 3), S. 1040–1042.
- Minagawa, Jun; Nakamura, Hiro; Yamato, Ichiro; Mogi, Tatsushi; Anraku, Yasuhiro (1989): Transcriptional Regulation of the Cytochrome b562-Complex in *Escherichia coli*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 265 (19), S. 11198–11203.
- Mohammad, Amir; Mohammadi, Reza; Sohrabvandi, Sara (2012): Delivery of Probiotic Microorganisms into Gastrointestinal Tract by Food Products. In: Tomasz Brzozowski (Hg.): *New Advances in the Basic and Clinical Gastroenterology*: InTech Open. DOI: 10.5772/47946; ISBN: 978-953-51-0521-3
- Mossel, D. A.; Koopman, M. J. (1965): Losses in viable cells of *Salmonellae* upon inoculation into dry animal feeds of various types. In: *Poultry science* 44, S. 890–892.
- Murano, Elisa A.; Pierson, Merle D. (1993): Effect of Heat Shock and Incubation Atmosphere on Injury and Recovery of *Escherichia coli* 0157:H. In: *Journal of food protection* 56 (7), S. 568–572.
- Murthy, T.R.K.; Gaur, R. (1987): Effect of incorporation of tween 80 and magnesium chloride on the recovery of coliforms in VRB medium from fresh, refrigerated and frozen minced buffalo meat. In: *International Journal of Food Microbiology* 4 (4), S. 341. DOI: 10.1016/0168-1605(87)90009-2.
- Nagel, J. G.; Kunz, L. J. (1973): Needless retesting of quality-assured, commercially prepared culture media. In: *Applied Microbiology* 26 (1), S. 31–37.
- Nair, S.; Finkel, S. E. (2004): Dps Protects Cells against Multiple Stresses during Stationary Phase. In: *Journal of Bacteriology* 186 (13), S. 4192–4198. DOI: 10.1128/JB.186.13.4192–4198.2004.
- Namvar, Amirmorteza Ebrahimzadeh; Bastarahang, Sara; Abbasi, Niloufar; Ghehi, Ghazaleh Sheikhi; Farhadbakhtarian, Sara; Arezi, Parastoo et al.: Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. In: *GMS Hygiene and Infection Control* 9 (3).
- Navarro Llorens, Juana María; Tormo, Antonio; Martínez-García, Esteban (2010): Stationary phase in gram-negative bacteria. In: *FEMS Microbiology Reviews* 34 (4), S. 476–495. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00213.x.
- O'Farrell, P. H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. In: *The Journal of biological chemistry* 250 (10), S. 4007–4021.
- Osaili, T.; Forsythe, S. (2009): Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter species* in infant formula. In: *International Journal of Food Microbiology* 136 (2), S. 214–220. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.006.
- Osaili, T.; Griffis, C. L.; Martin, E. M.; Beard, B. L.; Keener, A.; Marcy, J. A. (2006): Thermal inactivation studies of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken-fried beef patties. In: *Journal of food protection* 69 (5), S. 1080–1086.

- Osaili, T.M.; Shaker, R.R.; Al-Haddaq, M.S.; Al-Nabulsi, A.A.; Holley, R.A. (2009): Heat resistance of *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in milk and special feeding formula. In: *Journal of Applied Microbiology* 107 (3), S. 928–935. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04271.x.
- Osborne, C. M.; Bremer, P. J. (2002): Development of a technique to quantify the effectiveness of enrichment regimes in recovering "stressed" *Listeria* cells. In: *Journal of food protection* 65 (7), S. 1122–1128.
- Park, C. M.; Beuchat, L. R. (2000): Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in potato starch as affected by water activity, pH and temperature. In: *Letters in applied microbiology* 31 (5), S. 364–367.
- Pernestig, A.-K.; Georgellis, D.; Romeo, T.; Suzuki, K.; Tomenius, H.; Normark, S.; Melefors, O. (2003): The *Escherichia coli* BarA-UvrY Two-Component System Is Needed for Efficient Switching between Glycolytic and Gluconeogenic Carbon Sources. In: *Journal of bacteriology* 185 (3), S. 843–853. DOI: 10.1128/JB.185.3.843–853.2003.
- Phadtare, S.; Inouye, M. (2001): Role of CspC and CspE in Regulation of Expression of RpoS and UspA, the Stress Response Proteins in *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 183 (4), S. 1205–1214. DOI: 10.1128/JB.183.4.1205–1214.2001.
- Pleitner, Aaron; Zhai, Yong; Winter, Roland; Ruan, Lifang; McMullen, Lynn M.; Gänzle, Michael G. (2012): Compatible solutes contribute to heat resistance and ribosome stability in *Escherichia coli* AW1.7. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1824 (12), S. 1351–1357. DOI: 10.1016/j.bbapap.2012.07.007.
- Postgate, J. R.; Hunter, J. R. (1961): On the Survival of Frozen Bacteria. In: *Journal of General Microbiology* 26 (3), S. 367–378. DOI: 10.1099/00221287-26-3-367.
- Potamitou, Aristi; Neubauer, Peter; Holmgren, Arne; Vlamis-Gardikas, Alexios (2002): Expression of *Escherichia coli* Glutaredoxin 2 Is Mainly Regulated by ppGpp and  $\delta$ S. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (20), S. 17775–17780. DOI: 10.1074/jbc.M201306200.
- Potts, Malcom (1994): Desiccation Tolerance of Prokaryotes. In: *Microbiological Reviews* (Vol. 58, No. 4).
- Privalle, Christopher T.; Fridovich, Irwin (1987): Induction of superoxide dismutase in *Escherichia coli* by heat shock. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (9), S. 2723–2726.
- Priyanka, B.; Patil, Rajashekhar K.; Dwarakanath, Sulatha (2016): A review on detection methods used for foodborne pathogens. In: *Indian Journal of Medical Research* 144 (3), S. 327–338. DOI: 10.4103/0971-5916.198677.
- Qiagen (2015): RNAprotect® Bacteria Reagent Handbook. HB-1704-001
- Rachon, Grzegorz; Gibbs, Paul (2015): Pathogens in low moisture food. In: *Food Science & Technology* (No. 29), S. 45–47. Online verfügbar unter <http://fstjournal.org/features/pathogens-low-moisture-food>, zuletzt geprüft am 26.02.2018.
- Rachon, Grzegorz; Peñaloza, Walter; Gibbs, Paul A. (2016): Inactivation of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecium* NRRL B-2354 in a selection of low moisture foods. In: *International Journal of Food Microbiology* 231, S. 16–25. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.022.

- Ray, B.; Speck, M. L. (1972): Repair of injury induced by freezing *Escherichia coli* as influenced by recovery medium. In: *Applied microbiology* 24 (2), S. 258–263.
- Ray, Bibek (2004): *Fundamental food microbiology*. 3te Edition. Boca Raton, Florida: CRC Press. ISBN: 0-203-99825-1
- Rebecchi, L.; Altiero, T.; Guidetti, R. (2007): Anhydrobiosis: the extreme limit of desiccation tolerance. In: *Invertebrate Survival Journal* 4, S. 65–81.
- Rech, S.; Wolin, C.; Gunsalus, R. P. (1996): Properties of the periplasmic ModA molybdate-binding protein of *Escherichia coli*. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (5), S. 2557–2562.
- Restaino, Lawrence; Frampton, Elon W.; Spitz, Hans (2001): Repair and growth of heat- and freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 in selective enrichment broths. In: *Food Microbiology* 18 (6), S. 617–629. DOI: 10.1006/fmic.2001.0427.
- Richter, Klaus; Haslbeck, Martin; Buchner, Johannes (2010): The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. In: *Molecular Cell* 40 (2), S. 253–266. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.10.006.
- Riedel, Kathrin; Lehner, Angelika (2007): Identification of proteins involved in osmotic stress response in *Enterobacter sakazakii* by proteomics. In: *Proteomics* 7 (8), S. 1217–1231. DOI: 10.1002/pmic.200600536.
- Ritz, M.; Garenaux, A.; Berge, M.; Federighi, M. (2009): Determination of rpoA as the most suitable internal control to study stress response in *C. jejuni* by RT-qPCR and application to oxidative stress. In: *Journal of Microbiological Methods* 76 (2), S. 196–200. DOI: 10.1016/j.mimet.2008.10.014.
- Robert Koch Institut (2006): *Epidemiologisches Bulletin - Listeriose* (Nr. 49).
- Rosenberg, Eugene; DeLong, Edward F.; Lory, Stephen; Stackebrandt, Erko; Thompson, Fabiano (Hg.) (2013): *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. ISBN: 978-3-642-30195-7
- Rosen, Ran; Ron, Eilora Z. (2002): Proteome analysis in the study of the bacterial heat-shock response. In: *Mass Spectrometry. Review* 21 (4), S. 244–265. DOI: 10.1002/mas.10031.
- Ruan, Lifang; Pleitner, Aaron; Gänzle, Michael G.; McMullen, Lynn M. (2011): Solute Transport Proteins and the Outer Membrane Protein NmpC Contribute to Heat Resistance of *Escherichia coli* AW1.7. In: *Applied Environmental Microbiology* 77 (9), S. 2961–2967. DOI: 10.1128/AEM.01930-10.
- Ruan, Luxi; Buchanan, Robert L. (2016): Modeling the Enhanced Thermal Inactivation of *Cronobacter sakazakii* by Inclusion of “Parabens”. In: *Procedia Food Science* 7, S. 145–148. DOI: 10.1016/j.profoo.2016.06.003.
- Rudolph, Christian J.; Upton, Amy L.; Briggs, Geoffrey S.; Lloyd, Robert G. (2010): Is RecG a general guardian of the bacterial genome? In: *DNA Repair* 9 (3), S. 210–223. DOI: 10.1016/j.dnarep.2009.12.014.
- Rui, Bin; Shen, Tie; Zhou, Hong; Liu, Jianping; Chen, Jiusheng; Pan, Xiaosong et al. (2010): A systematic investigation of *Escherichia coli* central carbon metabolism in response to superoxide stress. In: *BMC Systems Biology* 4 (1), S. 122. DOI: 10.1186/1752-0509-4-122.

- Russell, A. D. (2003): Lethal effects of heat on bacterial physiology and structure. In: *Science progress* 86 (Pt 1-2), S. 115–137.
- Samland, Anne K.; Baier, Shiromi; Schürmann, Melanie; Inoue, Tomoyuki; Huf, Sabine; Schneider, Gunter et al. (2012): Conservation of structure and mechanism within the transaldolase enzyme family. In: *FEBS Journal* 279 (5), S. 766–778. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08467.x.
- Sánchez-Maldonado, Alma Fernanda; Lee, Alvin; Farber, Jeffrey M. (2017): Methods for the Control of Foodborne Pathogens in Low-Moisture Foods. In: *Annual Review of Food Science and Technology* 9 (1). DOI: 10.1146/annurev-food-030117-012304.
- Santillana Farakos, S.M.; Frank, J.F.; Schaffner, D.W. (2013): Modeling the influence of temperature, water activity and water mobility on the persistence of *Salmonella* in low-moisture foods. In: *International Journal of Food Microbiology* 166 (2), S. 280–293. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.007.
- Savli, H. (2003): Expression stability of six housekeeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. In: *Journal of Medical Microbiology* 52 (5), S. 403–408. DOI: 10.1099/jmm.0.05132-0.
- Scherber, Cally M.; Schottel, Janet L.; Aksan, Alptekin (2009): Membrane phase behavior of *Escherichia coli* during desiccation, rehydration, and growth recovery. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788 (11), S. 2427–2435. DOI: 10.1016/j.bbamem.2009.08.011.
- Schlesinger, Milton J. (1994): How the Cell Copes with Stress and the Function of Heat Shock Proteins. In: *Pediatric Research* 36 (1), S. 1–6. DOI: 10.1203/00006450-199407001-00001.
- Schneider, Barbara L.; Hernandez, V. James; Reitzer, Larry (2013): Putrescine catabolism is a metabolic response to several stresses in *Escherichia coli*. In: *Molecular Microbiology* 88 (3), S. 537–550. DOI: 10.1111/mmi.12207.
- Schultz, Hank (zuletzt geupdated 2017): Dried surrogate bacteria could help with validation, FSMA compliance, zuletzt upgedated 16.03.2017. Online verfügbar unter <https://www.nutraingredients-usa.com/Article/2017/03/16/Dried-surrogate-bacteria-could-help-with-process-validation-FSMA-compliance>, zuletzt geprüft am 26.02.2018.
- Scigelova, Michaela; Makarov, Alexander (2006): Orbitrap Mass Analyzer – Overview and Applications in Proteomics. In: *Proteomics* 6, S. 16–21. DOI: 10.1002/pmic.200600528.
- Segal, G.; Ron, E. Z. (1998): Regulation of heat-shock response in bacteria. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 851, S. 147–151.
- Sherry, A.E.; Patterson, M.F.; Madden, R.H. (2004): Comparison of 40 *Salmonella* enterica serovars injured by thermal, high-pressure and irradiation stress. In: *Journal of Applied Microbiology* 96 (4), S. 887–893. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02211.x.
- Shrestha, Prashanta; Holland, Troy Michael; Bundy, Bradley Charles (2012): Streamlined extract preparation for *Escherichia coli*-based cell-free protein synthesis by sonication or bead vortex mixing. In: *BioTechniques* 53 (3), S. 163–174. DOI: 10.2144/0000113924.

- Silva, Joana; Carvalho, Ana Sofia; Vitorino, Rui; Domingues, Pedro; Teixeira, Paula; Gibbs, Paul (2004): Protein extraction and comparison of stain protocols for analysis of two-dimensional electrophoresis gels. In: *Protein and peptide letters* 11 (2), S. 189–194.
- Simran, Watts (2016): A mini review on technique of milk pasteurization. In: *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 5 (5), S. 99–101.
- Singh, Surendra; Brocker, Chad; Koppaka, Vindhya; Chen, Ying; Jackson, Brian C.; Matsumoto, Akiko et al. (2013): Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. In: *Free Radical Biology and Medicine* 56, S. 89–101. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.010.
- Sleator, Roy D.; Hill, Collin (2001): Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. In: *FEMS Microbiology Reviews* 26, S. 49–71.
- Sleight, Sean C.; Wigginton, Nicholas S.; Lenski, Richard E. (2006): Increased susceptibility to repeated freeze-thaw cycles in *Escherichia coli* following long-term evolution in a benign environment. In: *BMC Evolutionary Biology* 6 (1), S. 104. DOI: 10.1186/1471-2148-6-104.
- Sohier, Danièle; Pavan, Sonia; Riou, Armelle; Combrisson, Jérôme; Postollec, Florence (2014): Evolution of microbiological analytical methods for dairy industry needs. In: *Frontiers in Microbiology* 5. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00016.
- Sommer, Felix; Bäckhed, Fredrik (2013): The gut microbiota — masters of host development and physiology. In: *Nature Reviews Microbiology* 11 (4), S. 227–238. DOI: 10.1038/nrmicro2974.
- Souza Sant'Ana, Anderson de (2012): Introduction to the Special Issue: *Salmonella* in foods: Evolution, strategies and challenges. In: *Food Research International* 45 (2), S. 451–454. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.01.003.
- Spector, Michael P.; Kenyon, William J. (2012): Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. In: *Food Research International* 45 (2), S. 455–481. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.06.056.
- Stasyk, T.; Hellman, U.; Souchelnytskyi, S. (2001): Optimizing sample preparation for 2-D electrophoresis. In: *Ameersham Bioscience: Life Science News* 9.
- Suo, Biao; Shi, Chunlei; Shi, Xianming (2012): Inactivation and occurrence of sublethal injury of *Salmonella* Typhimurium under mild heat stress in broth. In: *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 7 (2), S. 125–131. DOI: 10.1007/s00003-012-0763-2.
- Takahashi, Hajime; Kuramoto, Shintaro; Miya, Satoko; Kimura, Bon (2011): Desiccation survival of *Listeria monocytogenes* and other potential foodborne pathogens on stainless steel surfaces is affected by different food soils. In: *Food Control* 22 (3-4), S. 633–637. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.09.003.
- Takle, Gunnhild W.; Toth, Ian K.; Brurberg, May B. (2007): Evaluation of reference genes for real-time RT-PCR expression studies in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. In: *BMC Plant Biology* 7 (1), S. 50. DOI: 10.1186/1471-2229-7-50.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2009): Tech Tip #49: Acetone precipitation of proteins (TR0049.1).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2016): Instructions - TMT Mass Tagging Kits and Reagents (Pub. No. MAN0011639) (Pub. Part No. 2162073.14; Rev B.0).

- Thompson, Andrew; Schäfer, Jürgen; Kuhn, Karsten; Kienle, Stefan; Schwarz, Josef; Schmidt, Günter et al. (2003): Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. In: *Analytical chemistry* 75 (8), S. 1895–1904.
- Thompson, K. M.; Gottesman, S. (2014): The MiaA tRNA Modification Enzyme Is Necessary for Robust RpoS Expression in *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 196 (4), S. 754–761. DOI: 10.1128/JB.01013-13.
- Trötschel, Christian; Albaum, Stefan P.; Poetsch, Ansgar (2013): Proteome turnover in bacteria: current status for *Corynebacterium glutamicum* and related bacteria. In: *Microbial Biotechnology* 5, S. n/a. DOI: 10.1111/1751-7915.12035.
- Truelstrup Hansen, Lisbeth; Vogel, Birte Fonnesbech (2011): Desiccation of adhering and biofilm *Listeria monocytogenes* on stainless steel: Survival and transfer to salmon products. In: *International Journal of Food Microbiology* 146 (1), S. 88–93. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.032.
- Tsuchido, T.; Katsui, N.; Takeuchi, A.; Takano, M.; Shibasaki, I. (1985): Destruction of the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* by heat treatment. In: *Applied and Environmental Microbiology* 30 (2), S. 298–303.
- Tucker, S. C.; Galan, J. E. (2000): Complex Function for SicA, a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Type III Secretion-Associated Chaperone. In: *Journal of Bacteriology* 182 (8), S. 2262–2268. DOI: 10.1128/JB.182.8.2262-2268.2000.
- Uesugi, Aaron R.; DANYLUK, MICHELLE D.; HARRIS, LINDA J. (2006): Survival of *Salmonella enteritidis* phage type 30 on inoculated almonds stored at -20, 4, 23, and 35 degrees C. In: *Journal of Food Protection* 69 (8), S. 1851–1857.
- Umoh, V. J.; Obawede, K. S.; Umoh, J. U. (1985): Contamination of infant powdered milk in use with enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*. In: *Food Microbiology* 2, S. 255–262.
- van Boekel, Martinus; Fogliano, Vincenzo; Pellegrini, Nicoletta; Stanton, Catherine; Scholz, Gabriele; Lalljie, Sam et al. (2010): A review on the beneficial aspects of food processing. In: *Molecular Nutrition & Food Research* 54 (9), S. 1215–1247. DOI: 10.1002/mnfr.200900608.
- Vandesompele, Jo; Preter, Katleen de; Pattyn, Filip; Poppe, Bruce; van Roy, Nadine; Paepe, Anne de; Speleman, Frank (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. In: *Genome biology* 3 (7), S. RESEARCH0034.
- van Elsas, Jan Dirk; Semenov, Alexander V.; Costa, Rodrigo; Trevors, Jack T. (2011): Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. In: *ISME Journal* 5 (2), S. 173–183. DOI: 10.1038/ismej.2010.80.
- Vazquez-Boland, J. A.; Kuhn, M.; Berche, P.; Chakraborty, T.; Dominguez-Bernal, G.; Goebel, W. et al. (2001): *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. In: *Clinical Microbiology Reviews* 14 (3), S. 584–640. DOI: 10.1128/CMR.14.3.584–640.2001.
- Velapatiño, Billie; Zlosnik, James E. A.; Hird, Trevor J.; Speert, David P. (2013): Total Protein Extraction and 2-D Gel Electrophoresis Methods for *Burkholderia* Species. In: *Journal of Visualized Experiments* (80). DOI: 10.3791/50730.

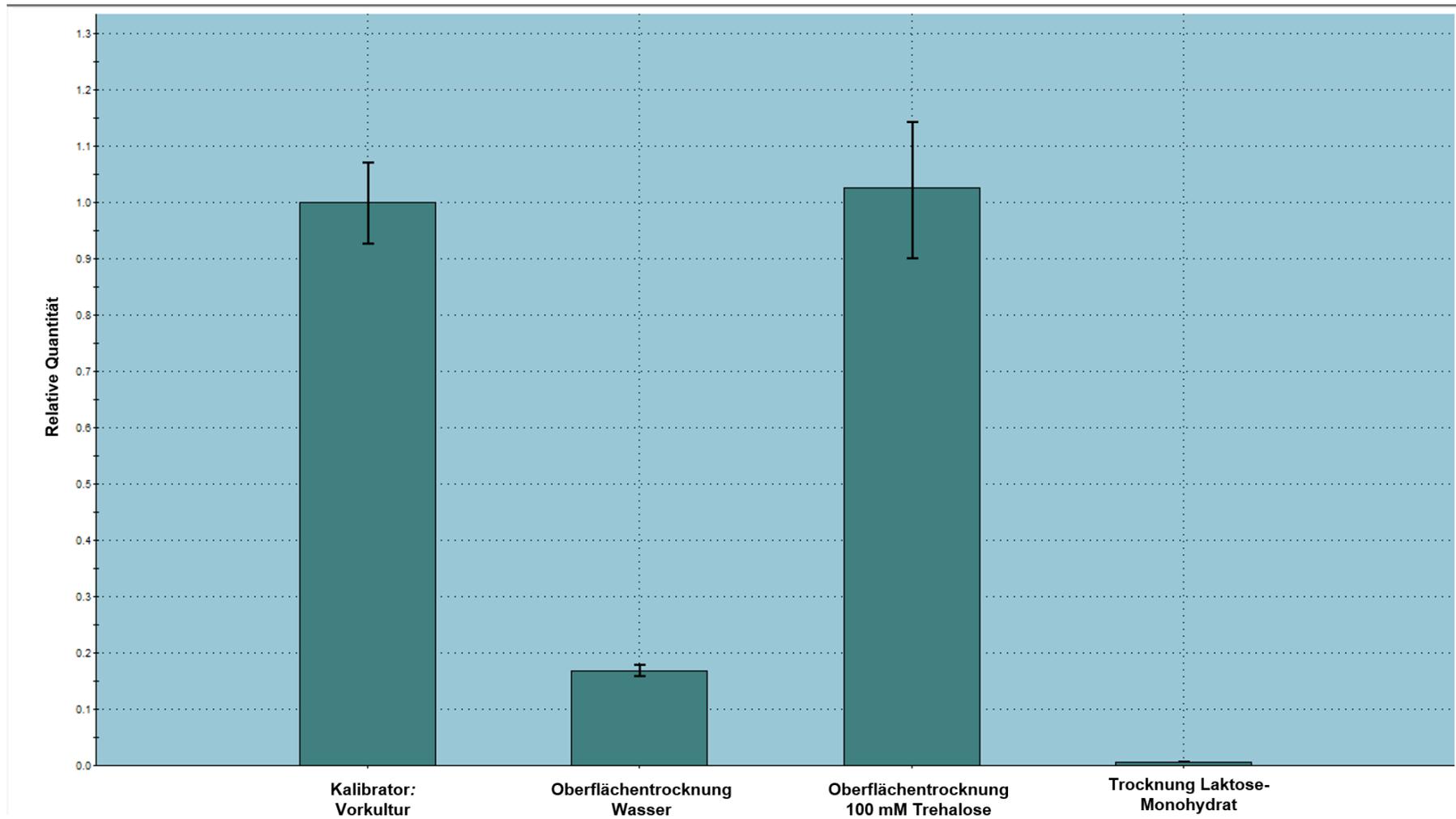
- Vijayakumar, S. R. V.; Kirchhof, M. G.; Patten, C. L.; Schellhorn, H. E. (2004): RpoS-Regulated Genes of *Escherichia coli* Identified by Random lacZ Fusion Mutagenesis. In: *Journal of Bacteriology* 186 (24), S. 8499–8507. DOI: 10.1128/JB.186.24.8499–8507.2004.
- Vila, J.; Sáez-López, E.; Johnson, J. R.; Römling, U.; Dobrindt, U.; Cantón, R. et al. (2016): *Escherichia coli*. An old friend with new tidings. In: *FEMS Microbiology Reviews* 40 (4), S. 437–463. DOI: 10.1093/femsre/fuw005.
- Wallen, Margaret R.; Perlin, Michael H. (2012): A Tale of 6 Sigmas: How Changing Partners Allows *Salmonella* to Thrive in the Best of Times and Survive the Worst of Times. In: Bassam Annous (Hg.): *Salmonella* - Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies: InTech Open. DOI: 10.5772/30853; ISBN: 978-953-51-0661-6
- Weber, A.; Kogl, S. A.; Jung, K. (2006): Time-Dependent Proteome Alterations under Osmotic Stress during Aerobic and Anaerobic Growth in *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 188 (20), S. 7165–7175. DOI: 10.1128/JB.00508-06.
- Weber, H.; Polen, T.; Heuveling, J.; Wendisch, V. F.; Hengge, R. (2005): Genome-Wide Analysis of the General Stress Response Network in *Escherichia coli*: S-Dependent Genes, Promoters, and Sigma Factor Selectivity. In: *Journal of bacteriology* 187 (5), S. 1591–1603. DOI: 10.1128/JB.187.5.1591–1603.2005.
- Wesche, Alissa M.; Gurtler, Joshua B.; Marks, Bradley P.; Ryser, Elliot T. (2009): Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. In: *Journal of food protection* 72 (5), S. 1121–1138.
- Winfield, M. D.; Groisman, E. A. (2003): Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. In: *Applied and environmental microbiology* 69 (7), S. 3687–3694. DOI: 10.1128/AEM.69.7.3687–3694.2003.
- Wolf, S. G.; Frenkiel, D.; Arad, T.; Finkel, S. E.; Kolter, R.; Minsky, A. (1999): DNA protection by stress-induced biocrystallization. In: *Nature* 400 (6739), S. 83–85. DOI: 10.1038/21918.
- Wu, V. (2008): A review of microbial injury and recovery methods in food. In: *Food Microbiology* 25 (6), S. 735–744. DOI: 10.1016/j.fm.2008.04.011.
- Xu, J.; Johnson, R. C. (1995): aldB, an RpoS-dependent gene in *Escherichia coli* encoding an aldehyde dehydrogenase that is repressed by Fis and activated by Crp. In: *Journal of bacteriology* 177 (11), S. 3166–3175.
- Yamanaka, K.; Zheng, W.; Croke, E.; Wang, Y. H.; Inouye, M. (2001): CspD, a novel DNA replication inhibitor induced during the stationary phase in *Escherichia coli*. In: *Molecular microbiology* 39 (6), S. 1572–1584.
- Yan, Q.Q.; Condell, O.; Power, K.; Butler, F.; Tall, B.D.; Fanning, S. (2012): *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium. In: *Journal of Applied Microbiology* 113 (1), S. 1–15. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05281.x.
- Yang, Shih-Chun; Lin, Chih-Hung; Aljuffali, Ibrahim A.; Fang, Jia-You (2017): Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. In: *Archives of Microbiology* 199 (6), S. 811–825. DOI: 10.1007/s00203-017-1393-y.

- Yeom, Jinki; Lee, Yunho; Park, Woojun (2012): ATP-dependent RecG Helicase Is Required for the Transcriptional Regulator OxyR Function in *Pseudomonas* species. In: *Journal of Biological Chemistry* 287 (29), S. 24492–24504. DOI: 10.1074/jbc.M112.356964.
- Yoo, Ah Young; Kim, Sam Woong; Yu, Jong Earn; Kim, Young Hee; Cha, Jaeho; Oh, Jeong-Il et al. (2007): Requirement of Fur for the full induction of Dps expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. In: *Journal of microbiology and biotechnology* 17 (9), S. 1452–1459.
- Yoon, Yohan; Lee, Heeyoung; Lee, Soomin; Kim, Sejeong; Choi, Kyoung-Hee (2015): Membrane fluidity-related adaptive response mechanisms of foodborne bacterial pathogens under environmental stresses. In: *Food Research International* 72, S. 25–36. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.03.016.
- Yoshida, H.; Maki, Y.; Furuike, S.; Sakai, A.; Ueta, M.; Wada, A. (2012): YqjD Is an Inner Membrane Protein Associated with Stationary-Phase Ribosomes in *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 194 (16), S. 4178–4183. DOI: 10.1128/JB.00396-12.
- Yuk, H.-G.; Marshall, D. L. (2003): Heat Adaptation Alters *Escherichia coli* O157:H7 Membrane Lipid Composition and Verotoxin Production. In: *Applied and Environmental Microbiology* 69 (9), S. 5115–5119. DOI: 10.1128/AEM.69.9.5115–5119.2003.
- Yura, T.; Nagai, H.; Mori, H. (1993): Regulation of the Heat-Shock Response in Bacteria. In: *Annual Review of Microbiology* 47 (1), S. 321–350. DOI: 10.1146/annurev.mi.47.100193.001541.
- Zhao, Guanghua; Ceci, Pierpaolo; Ilari, Andrea; Giangiacomo, Laura; Laue, Thomas M.; Chiancone, Emilia; Chasteen, N. Dennis (2002): Iron and Hydrogen Peroxide Detoxification Properties of DNA-binding Protein from Starved Cells. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (31), S. 27689–27696. DOI: 10.1074/jbc.M202094200.
- Zhao, Xihong; Zhong, Junliang; Wei, Caijiao; Lin, Chii-Wann; Ding, Tian (2017): Current Perspectives on Viable but Non-culturable State in Foodborne Pathogens. In: *Frontiers in Microbiology* 8 (580), S. 656. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00580.
- Zheng, Jimin; Singh, Vinay Kumar; Jia, Zongchao (2005): Identification of an ITPase/XTPase in *Escherichia coli* by Structural and Biochemical Analysis. In: *Structure* 13 (10), S. 1511–1520. DOI: 10.1016/j.str.2005.07.007.
- Zheng, Xufeng; Fu, Nan; Duan, Manlei; Woo, Meng Wai; Selomulya, Cordelia; Chen, Xiao Dong (2015): The mechanisms of the protective effects of reconstituted skim milk during convective droplet drying of lactic acid bacteria. In: *Food Research International* 76, S. 478–488. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.07.045.
- Zoz, Fiona; Grandvalet, Cosette; Lang, Emilie; Iaconelli, Cyril; Gervais, Patrick; Firmesse, Olivier et al. (2017): *Listeria monocytogenes* ability to survive desiccation: Influence of serotype, origin, virulence, and genotype. In: *International Journal of Food Microbiology* 248, S. 82–89. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.010.

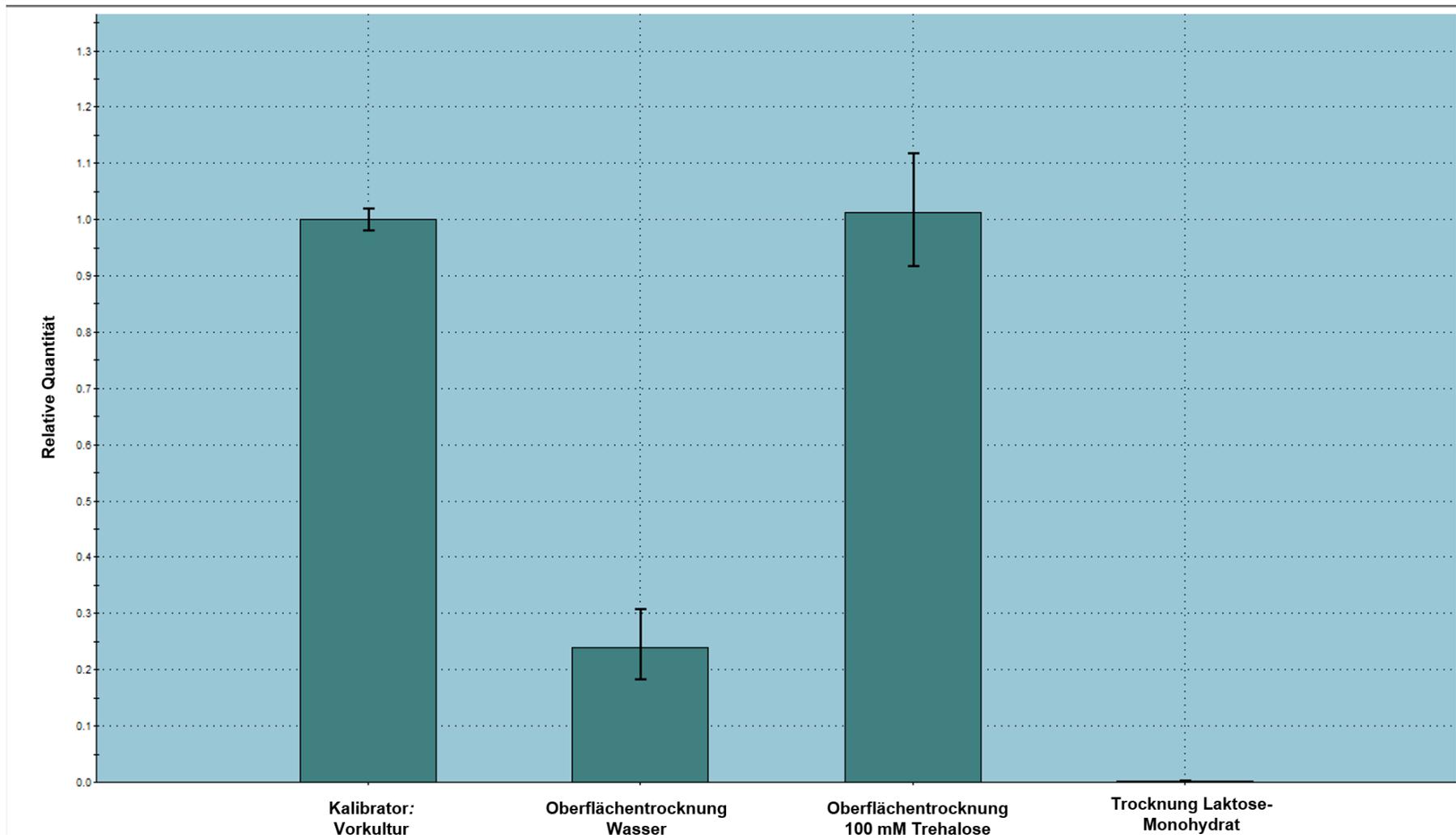
## 7 Anhang

### 7.1 Ergebnisse Normalisierungsversuche der Real-Time PCR

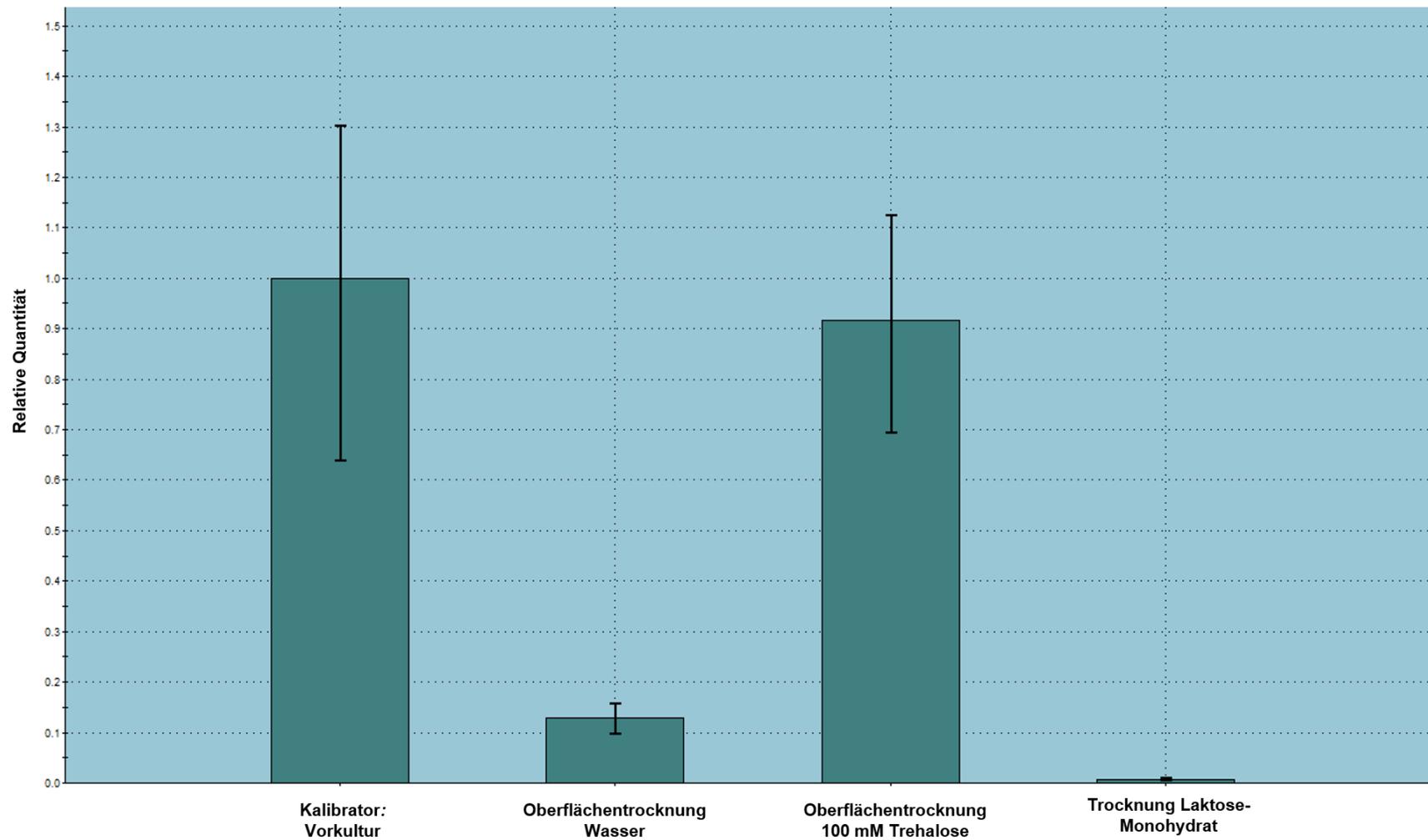
Für die vorliegende Arbeit sollten Untersuchungen zur Charakterisierung des bakteriellen Stresses durchgeführt werden. Als Ansatz hierfür wurde die Untersuchung von transkribierten Stressgenen anhand vorliegender mRNA in der Bakterienzelle ausgewählt. Hierfür wurde eine Extraktion der RNA aus den gestressten Bakterien durchgeführt, welche mittels Random Primer und Reverser Transkription in cDNA umgewandelt wurde. Durch den Vergleich der mRNA von gestressten und ungestressten Proben sollten Unterschiede in der Expression der gewählten Gene festgestellt werden. Für diese Untersuchungen musste eine Normalisierung mit stabilen Genen durchgeführt werden, welche auch unter Stressbedingungen eine stabile Expression zeigen (Huggett et al. 2005). Es wurden drei Gene zur Normalisierung ausgewählt. Zur Bestimmung der Stabilität der Expression dieser Gene, wurde eine relative Quantifikation der Menge an vorhandener cDNA in gestressten und ungestressten Proben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 bis 34 für die Gene *recA*, *gapA* und *rpoD* zu sehen. Es wurde eine vier Stunden Vorkultur Probe von *Salmonella* Typhimurium als Kalibrator und Vergleichsprobe verwendet. Anhand dieser Vorkultur wurde die Menge an vorhandener cDNA in den gestressten Proben relativ quantifiziert. Dabei konnten große Expressionsunterschiede der verwendeten Haushaltsgene in den verschiedenen Proben festgestellt werden. Es konnte keine Stabilität der Genexpression festgestellt werden, weshalb die Gene als ungeeignet für die Normalisierung betrachtet wurden. Für die vorliegende Arbeit wurden zur Charakterisierung des Stresses auf molekularer Ebene im Folgenden Proteomuntersuchungen mittels Massenspektrometrie durchgeführt.



**Abbildung 32: Relative Quantifizierung des Gens *recA* in verschiedenen Proben.** Die Menge an vorhandener mRNA einer Vorkultur-Probe (Kalibrator) wurde mit gestressten Proben der Oberflächentrocknung in Wasser und 100 mM Trehalose sowie der Trocknung in Laktose-Monohydrat von *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 verglichen.



**Abbildung 33: Relative Quantifizierung des Gens *gapA* in verschiedenen Proben.** Die Menge an vorhandener mRNA einer Vorkultur-Probe (Kalibrator) wurde mit gestressten Proben der Oberflächentrocknung in Wasser und 100 mM Trehalose sowie der Trocknung in Laktose-Monohydrat von *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 verglichen.

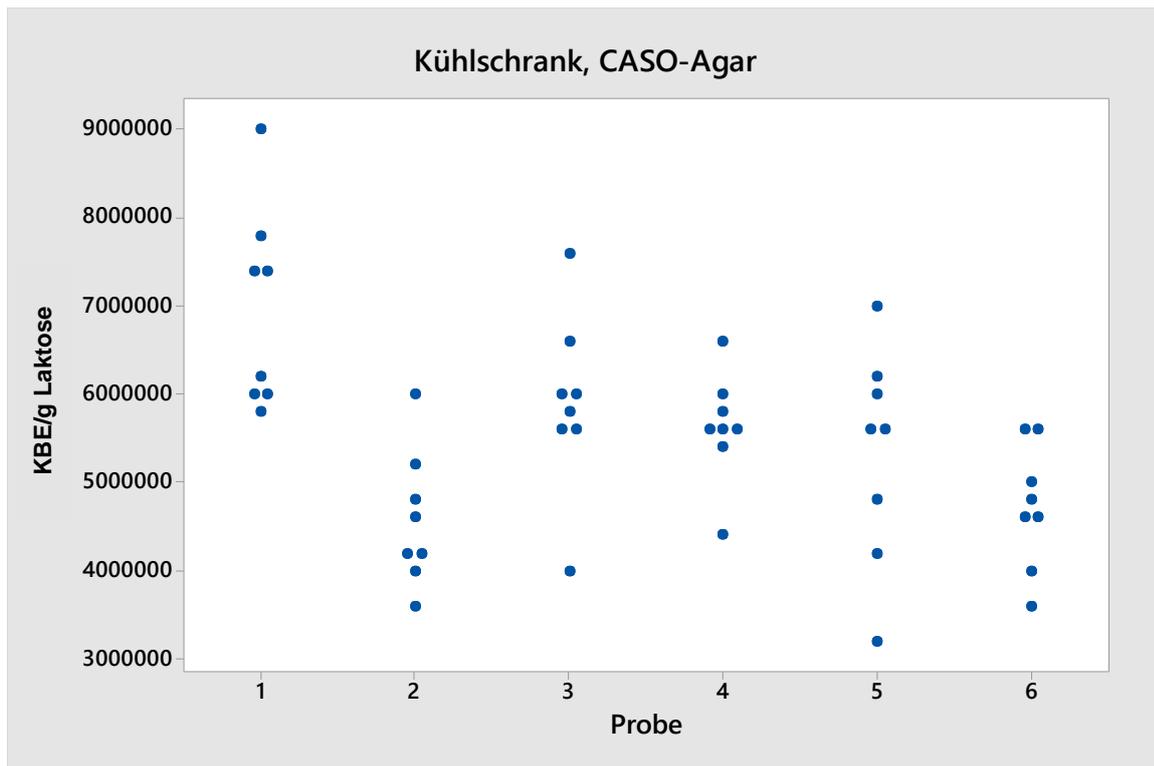


**Abbildung 34: Relative Quantifizierung des Gens *rpoD* in verschiedenen Proben.** Die Menge an vorhandener cDNA einer Vorkultur-Probe (Kalibrator) wurde mit gestressten Proben der Oberflächentrocknung in Wasser und 100 mM Trehalose sowie der Trocknung in Laktose-Monohydrat von *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028 verglichen.

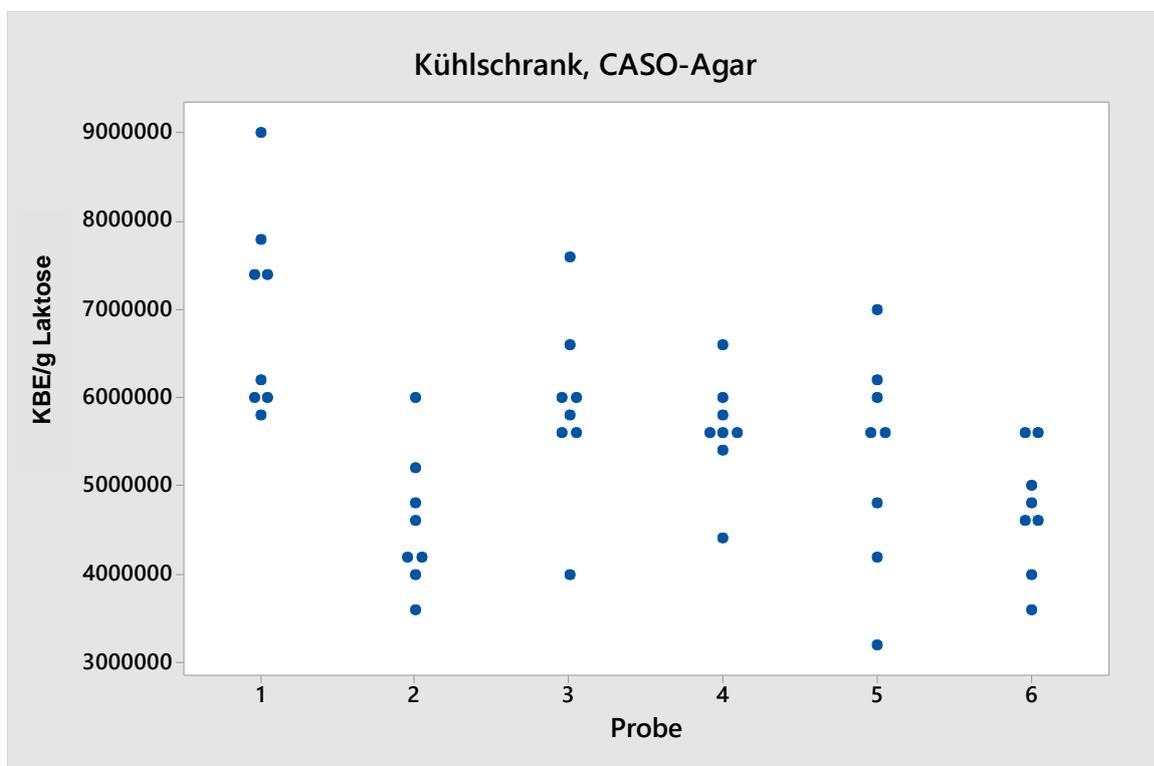
## 7.2 Homogene Durchmischung von Laktose-Proben

Bei den durchgeführten Versuchen zur Bestimmung Keimzahl der in Laktose getrockneten Bakterien, konnten Schwankungen der Keimzahl an verschiedenen Messtagen in einem bestimmten Bereich festgestellt werden. Bei Verwendung von selektiven Nährböden war eine höhere Schwankung zu beobachten als bei Verwendung nichtselektiver Nährböden. Trotz gründlicher Durchmischung der Laktose-Proben nach Ende des Trocknungsprozesses, wurden innerhalb der Laktose kleinere Klümpchen festgestellt. Diese können potenziell mehr Bakterien enthalten, welche entweder stärker oder schwächer geschädigt wurden und somit eine höhere oder niedrigere Keimzahl auf den Nährböden verursachen können. Ein weiterer Faktor sind verschiedene Chargen von Nährmedien, sowie verschiedene Ansätze desselben Nährmediums an unterschiedlichen Tagen. Auch dies kann einen Einfluss auf die Keimzahl haben (Nagel & Kunz 1973). Durch den vorliegenden Versuch sollte untersucht werden, inwieweit eine inhomogen durchmischte Probe einen Einfluss auf die Keimzahl hat. Um die Schwankungen durch unterschiedliche Ansätze der Nährmedien auszuschließen, wurden für alle Proben Medien derselben Charge verwendet, welche zur selben Zeit angesetzt wurden.

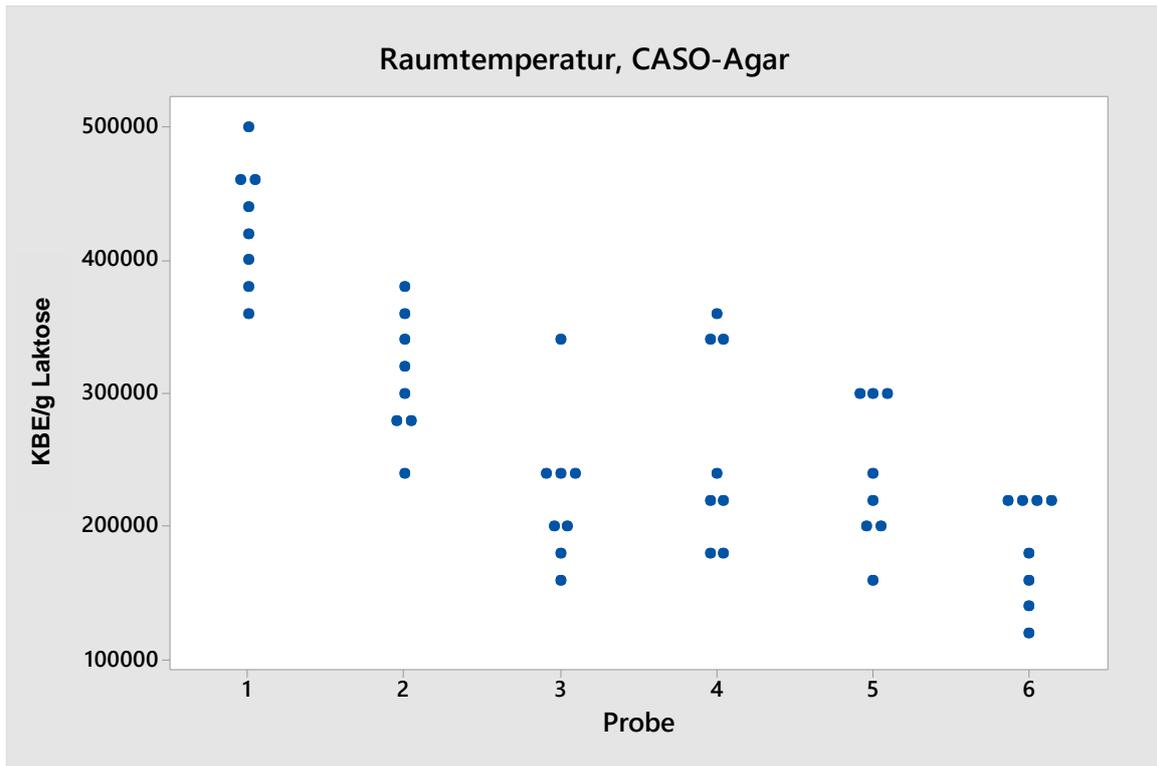
Es wurden zwei verschiedene Laktose-Ansätze untersucht. Ein Ansatz wurde bei Raumtemperatur auf Kieselgel gelagert, der zweite Ansatz im Kühlschrank ebenfalls auf Kieselgel. Pro Ansatz wurde je sechsmal 1 g Laktose abgewogen und eine Keimzahlbestimmung durchgeführt. Für die Keimzahlbestimmung wurden je achtmal 50 µl einer bestimmten Verdünnungsstufe auf Nährmedien ausgetropft. Um die Schwankungen der acht Einzel-Keimzahlen einer bestimmten Verdünnungsstufe jeder Probe darzustellen, wurden Streudiagramme dieser Einzel-Keimzahlen erstellt (siehe Abbildungen 35 - 39). Die Einzel-Keimzahlen wurden anhand der in Punkt 7.4 aufgeführten Berechnung kalkuliert und auf 1 g Laktose in der Anfangslösung hochgerechnet. Dabei kann festgestellt werden, dass es Schwankungen der Keimzahl eines Ansatzes von Probe zu Probe gibt und die Streuung der Werte innerhalb einer Probe ebenfalls variiert.



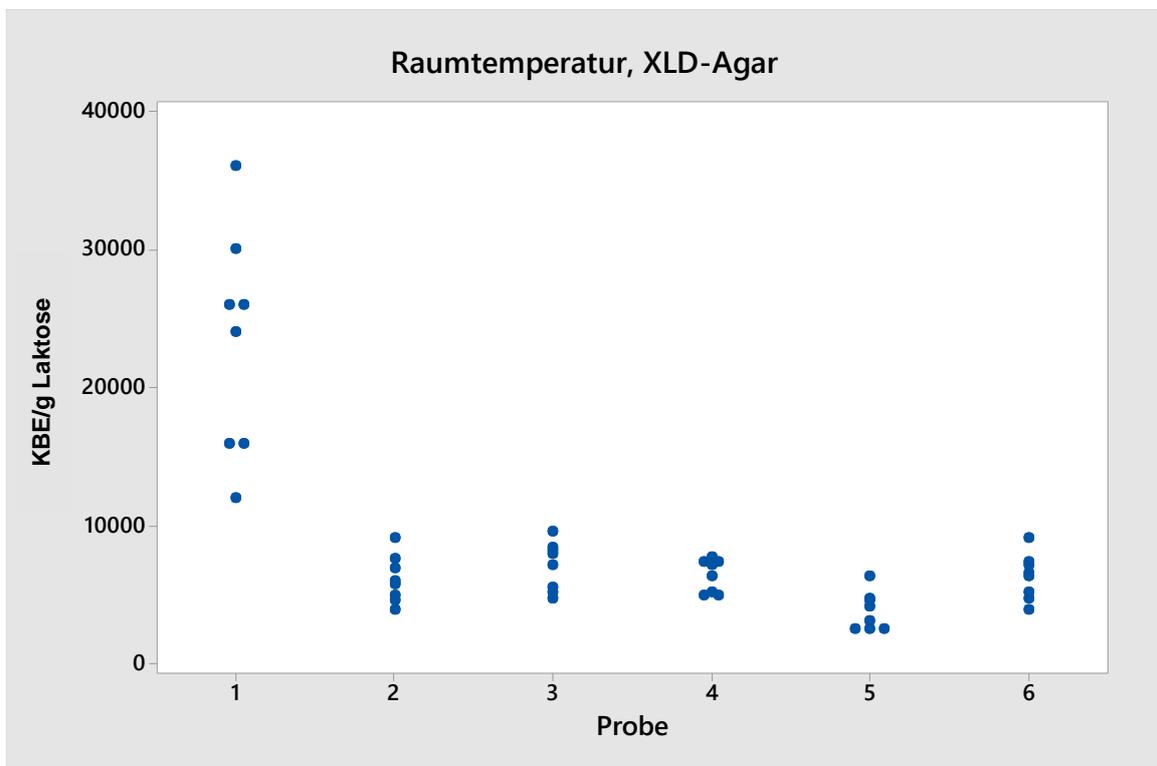
**Abbildung 35:** Keimzahlen auf CASO-Agar von *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028, getrocknet in Laktose-Monohydrat und gelagert auf Kieselgel bei 4°C. Aufgetragen wurden die Einzelkeimzahlen von sechs Laktose-Proben á 1 g.



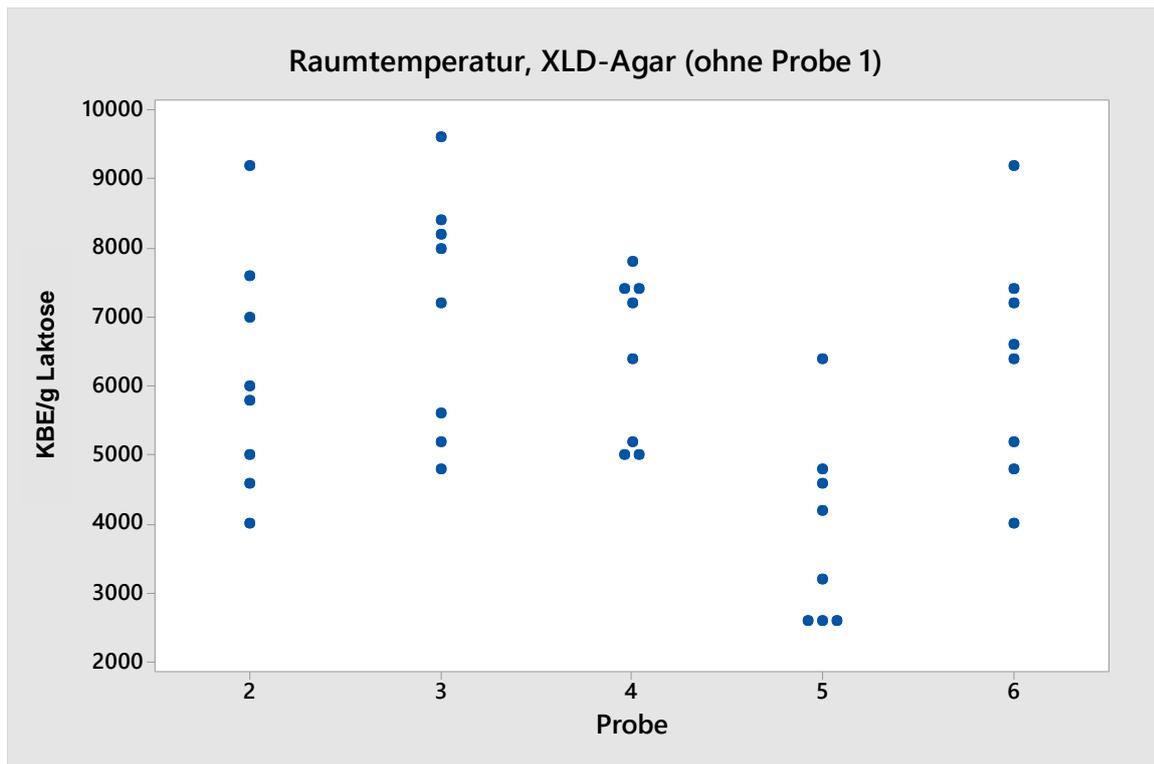
**Abbildung 36** Keimzahlen auf XLD-Agar von *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028, getrocknet in Laktose-Monohydrat und gelagert auf Kieselgel bei 4°C. Aufgetragen wurden die Einzelkeimzahlen von sechs Laktose-Proben á 1 g.



**Abbildung 37** Keimzahlen auf CASO-Agar von *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028, getrocknet in Laktose-Monohydrat und gelagert auf Kieselgel bei Raumtemperatur. Aufgetragen wurden die Einzelkeimzahlen von sechs Laktose-Proben á 1 g.



**Abbildung 38** Keimzahlen auf XLD-Agar von *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028, getrocknet in Laktose-Monohydrat und gelagert auf Kieselgel bei Raumtemperatur. Aufgetragen wurden die Einzelkeimzahlen von sechs Laktose-Proben á 1 g.



**Abbildung 39:** Keimzahlen auf XLD-Agar von *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028, getrocknet in Laktose-Monohydrat und gelagert auf Kieselgel bei Raumtemperatur. Aufgetragen wurden die Einzelkeimzahlen von sechs Laktose-Proben á 1 g, ohne Probe 1 aus Abbildung 38.

Für jede der sechs untersuchten 1 g Laktose-Proben wurde eine Gesamtkeimzahl pro Gramm Laktose nach Punkt 7.4 berechnet, sodass für die Raumtemperatur und KÜHLSCHRANK-Probe jeweils sechs Proben-Gesamtkeimzahlen für zwei unterschiedliche Nährmedien miteinander verglichen werden konnten. Für den im KÜHLSCHRANK gelagerten Ansatz lag die höchste bestimmte Gesamtkeimzahl auf CASO-Agar bei  $7 \times 10^6$  KBE/g und die niedrigste bestimmte Keimzahl bei  $4,6 \times 10^6$  KBE/g. Die berechnete Standardabweichung lag bei  $8,7 \times 10^5$  ( $n=6$ ). Mit Hilfe des Mittelwertes, sowie der Standardabweichung konnte der Varianzkoeffizient bestimmt werden. Dieser Koeffizient gibt die prozentuale Schwankung/Streuung der Keimzahlen an. Das 95%-Konfidenzintervall auf die Einzelkeimzahlen wurde anhand des Mittelwertes  $\pm 2,57 \cdot$  Standardabweichung berechnet. Innerhalb dieses Intervalls liegen 95% der Keimzahlen. Für die auf CASO-Agar bestimmte Keimzahl lag der Varianzkoeffizient bei 15,7%. Die untere Grenze lag hier bei  $3,3 \times 10^6$  KBE/g, die obere Grenze bei  $7,8 \times 10^6$  KBE/g. Alle ermittelten Gesamtkeimzahlen lagen in diesem Bereich. Die auf XLD-Agar höchste bestimmte Keimzahl für den im KÜHLSCHRANK gelagerten Ansatz lag bei  $8,2 \times 10^4$  KBE/g und die niedrigste bestimmte Keimzahl bei  $4,85 \times 10^4$  KBE/g. Die berechnete Standardabweichung liegt bei  $1,6 \times 10^4$  und der

Varianzkoeffizient betrug 25%. Als untere Grenze des 95%-Intervalls wurde  $2,3 \times 10^6$  KBE/g berechnet und als obere Grenze  $1,1 \times 10^7$  KBE/g.

Bei der zweiten Probe handelte es sich um eine Laktose-Probe, welche bei Raumtemperatur gelagert wurde. Die niedrigste bestimmte Keimzahl auf CASO-Agar lag bei  $1,85 \times 10^5$  KBE/g, die höchste ermittelte Keimzahl bei  $4,3 \times 10^5$  KBE/g. Aus den ermittelten Keimzahlen ergaben sich eine Standardabweichung von  $8,6 \times 10^4$  und ein Varianzkoeffizient von 31,2%. Das berechnete 95% Konfidenzintervall lag zwischen den Werten  $5,5 \times 10^4$  KBE/g und  $5 \times 10^5$  KBE/g. Für die bestimmten Keimzahlen auf XLD-Agar lag die niedrigste ermittelte Keimzahl bei  $3,9 \times 10^3$  KBE/g und die höchste ermittelte Keimzahl bei  $2,3 \times 10^4$  KBE/g. Die ermittelte Standardabweichung lag bei  $7,1 \times 10^3$  und der Varianzkoeffizient bei 81%. Die obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls liegt bei  $2,7 \times 10^4$  und die untere Grenze bei  $-9,5 \times 10^3$ .

Die Werte für den Varianzkoeffizienten waren innerhalb der beiden Einzelversuche auf CASO-Agar geringer, als auf XLD-Agar, was darauf schließen lässt, dass die Keimzahlen auf XLD-Agar größeren Schwankungen unterliegen, als auf CASO-Agar. Dabei konnte für die Raumtemperatur-Probe auf XLD-Agar eine Keimzahl festgestellt werden, welche sich deutlich von den anderen bestimmten Keimzahlen unterschied, wodurch sich mit 80,5% der höchste Varianzkoeffizient der gesamten Untersuchung ergab. Dabei handelte es sich um die Keimzahl  $2,3 \times 10^4$ . Die restlichen Keimzahlen dieser Gruppe zeigten geringere Schwankungen und lagen dichter beieinander.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die bestimmten Keimzahlen eines Trocknungs-Ansatzes deutlich schwanken. Dabei können Unterschiede von minimal 15,7% und maximal 81% festgestellt werden. Die Schwankungen auf CASO-Agar sind deutlich geringer, als auf XLD-Agar.

### 7.3 Keimzahlbestimmung auf Blutagar nach DIN 10161 (nach Lindner 2014)

Verdünnungsstufe		KBE	Anzahl ausgewertete Sektoren
$10^{-6}$		48, 35, 35, 49	8
$10^{-6}$		41, 41, 47, 34	
$10^{-7}$		9, 1, 5, 2	8
$10^{-7}$		6, 7, 3, 1	
$10^{-8}$		1, 0, 0, 0	3
$10^{-8}$		1, 1, 0, 0	
$10^{-9}$		0, 0, 0, 0	(nicht für die Berechnung verwendet)
$10^{-9}$		0, 0, 0, 0	
<b>Summe</b>		<b>367</b>	<b>-</b>

$\bar{c}$  = Mittelwert der Kolonienzahl

$\sum c$  = Summe der zur Berechnung verwendeten ausgezählten Kolonien

$n_1$  = Anzahl der auswertbaren Sektoren der niedrigsten Verdünnungsstufe

$n_2 + n_3$

= Anzahl auswertbarer Sektoren der beiden nächsthöheren Verdünnungsstufen

$$\bar{c} = \frac{\sum c}{n_1 \times 1 + n_2 \times 0,1 + n_3 \times 0,01}$$

$$\bar{c} = \frac{367}{8 \times 1 + 8 \times 0,1 + 3 \times 0,01}$$

$$\bar{c} = \frac{367}{8,83}$$

$$\bar{c} = 41,56$$

Die Impfmenge betrug 0,05 ml, was einer weiteren Verdünnung des Röhrcheninhaltes von 1:20 entspricht.  $\bar{c}$  muss mit 20 multipliziert werden, sowie mit der Zehnerpotenz der niedrigsten verwendeten Verdünnungsstufe.

$$\text{Keimzahl ml}^{-1} = (\bar{c} \times 20) \times 10^6$$

$$\text{Keimzahl ml}^{-1} = (41,56 \times 20) \times 10^6$$

$$\text{Keimzahl ml}^{-1} = 831,25 \times 10^6$$

$$\text{Keimzahl ml}^{-1} = 8,3 \times 10^8$$

Es befanden sich  $8,3 \times 10^8 \frac{\text{KBE}}{\text{ml}}$  in der Originalkultur.

## 7.4 Medien Zusammensetzung

Tabelle 46: Zusammensetzung der verwendeten Medien

Medium	Zusammensetzung	[g/l]
Maximale Wiederbelebungslösung	Peptischer Verdau von tierischem Gewebe Natriumchlorid pH 7 bei 25°C	1 8,5
Gepuffertes Peptonwasser	Pepton aus Casein Natriumchlorid Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat Kaliumdihydrogenphosphat pH 7 bei 25°C	10 5 9 1,5
CASO-Bouillon	Pepton aus Casein Pepton aus Sojamehl D(+)-Glukose Natriumchlorid di-Kaliumhydrogenphosphat pH 7,3 bei 25°C	18 3 g 2,5 5 2,5
XLD-Agar	Hefeextrakt Natriumchlorid D(+) Xylose Laktose Saccharose L(+) Lysin Natriumdeoxycholat Natriumthiosulfat Ammonium Eisen (III) –citrat Phenolrot Agar-Agar pH 7,4 bei 25°C	3 5 3,75 7,5 7,5 5 1 6,8 0,8 0,08 14,5
CASO-Agar	Pankreasverdauung von Casein Papainverdau von Sojabohnen Natriumchlorid Agar-Agar pH 7,3 bei 25°C	15 5 5 15
Baird Parker Agar	Pepton aus Casein Fleischextrakt Hefeextrakt Natriumpyruvat Glycin Lithiumchlorid Agar-Agar pH 6,8 bei 25°C	10 5 1 10 12 5 15
Eigelb-Tellurit Emulsion	Steriles Eigelb Natriumchlorid Kaliumtellurit	200 ml 4,25 2,1
SMAC Agar	Pepton Natriumchlorid	20 5

	Gallensalze Nr. 3 Sorbit Neutralrot Kristallviolett Agar-Agar pH 7,1 bei 25°C	1,5 10 0,03 0,001 15
PALCAM-Agar	Pepton Hefeextrakt Stärke Natriumchlorid Agar-Agar D(-)Mannitol Ammoniumeisen (III) –citrat Esculin Glukose Lithiumchlorid Phenolrot pH 7,2 bei 25°C	23 3 1 5 13 10 0,5 0,8 0,5 15 0,08
Columbia Blutagar Fertigplatten	Pepton Stärke Natriumchlorid Shafsblut Agar-Agar pH 7,1 – 7,5	23 1 5 50 ml 14
RVS-Bouillon	Pepton aus Sojamehl Magnesiumchloridhexahydrat Natriumchlorid Di-Kaliumhydrogenphosphat Kaliumdihydrogenphosphat Malachitgrün pH 5,2 bei 25°C	4,5 28,6 7,2 0,18 1,26 0,036
MKTTn-Bouillon	Fleischextrakt Pepton aus Casein Natriumchlorid Calciumcarbonat Wasserfreies Natriumthiosulfat Ochsengalle Brilliantgrün Novobiocin pH 8 bei 25°C	4,3 8,6 2,6 38,7 30,5 4,78 0,0096 0,040
Rambach-Agar Fertigplatten	Pepton Natriumchlorid Natriumdeoxychololat Chromogen-Mischung Propylenglycol Agar-Agar pH 7,3 bei 25°C	8 5 1 1,5 10,5 15
Chromocult Enterobacter Sakazakii Agar	Pepton Natriumchlorid Gallensalzmischung	6 5 1,5 0,1

	Brom-4-chlor-3-indolyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid Agar-Agar pH 7 bei 25°C	12
Mannit-Kochsolt-Penolrot Agar	Pepton aus Casein Peptischer Verdau von tierischem Gewebe Fleischextrakt Natriumchlorid D(-)Mannit Pehnlrot Agar-Agar pH 7,2 – 7,6 bei 25°C	5 5 1 75 10 0,025 12
Columbia Agar mit 5% Shafsblut	Pankreatisch abgebautes Casein Peptisch abgebautes Tiegewebe Hefeextrakt Rindfleischextrakt Maisstärke Natriumchlorid Agar Defibriniertes Schafblut pH 7,3	12 5 3 3 1 5 13,5 5%
Hirn-Herz-Bouillon	Enzymatischer Verdau von Tiergewebe Dehydrierte Kalbshirninfusion Dehydrierte Rinderherzinfusion Glukose NaCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , wasserfrei	10 12,5 5 2 5 2,5
CT-Supplement	Cefixim  Kaliumtellurit	0,025 mg/Phiole 1,25 mg/Phiole
PALCAM Selektivsupplement	Polymixin-B-Sulfat Ceftazidim Acriflavin	5 mg/Phiole 10 mg/Phiole 2,5 mg/Phiole