

Abschlussbericht

Antimikrobielle Wirkung von Lebensmittel-Kulturen auf *Campylobacter*

Dr. vet. med. Sophie Kittler

Projektbeteiligte: Dr. vet. med. S. Kittler, PD Dr. vet. med. F. Reich, Prof. Dr. M. Plötz,
Prof. Dr. C. Kehrenberg, TÄ L. Bungenstock

Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit, Stiftung Tierärztliche Hochschule
Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover

Inhaltsverzeichnis

Antimikrobielle Wirkung von Lebensmittel-Kulturen auf <i>Campylobacter</i>	1
1. Zusammenfassung.....	3
2. Hintergrund	3
3. Zielsetzung.....	5
4. Ergebnisse, Schlussfolgerung und Diskussion	5
5. Verwertung der Ergebnisse	6
6. Ausblick	6
7. Literaturverzeichnis.....	7

1. Zusammenfassung

Campylobacter ist ein bedeutender Infektionserreger des Menschen. Der Einsatz antimikrobiell wirksamer Kulturen gehört zu den biologischen Verfahren, die zur Bekämpfung von *Campylobacter* auf allen Produktionsstufen eingesetzt werden können. Eine weitere Möglichkeit zur Bekämpfung von *Campylobacter* ist der Einsatz von Bakteriophagen. Der Einsatz von Bakteriophagen und/oder antimikrobiellen Kulturen als Alternative zur Antibiotikaaanwendung wird auch für andere bakterielle Erreger diskutiert. In diesem Projekt wurden Bakteriophagen und Bakteriozine zur Bekämpfung von *Campylobacter jejuni* und *coli* isoliert und untersucht. Für die Auswahl antimikrobiell wirksamer Bakterienkulturen wurden Bakterien von Wurstprodukten sowie aus Darminhalt vom Huhn auf ihre Hemmwirkung untersucht. Die bisher bekannten Labormethoden für die Auswahl wurden weiterentwickelt, um zukünftig effektiver nach antimikrobiellen Kulturen gegen *Campylobacter* suchen zu können. Um die ausgewählten, wirksamen Kulturen und Bakteriophagen zukünftig in der Lebensmittelkette anwenden zu können, sind weitere Forschungsarbeiten notwendig.

2. Hintergrund

Campylobacter ist ein bedeutender Infektionserreger des Menschen. In Deutschland ist der Nachweis des Krankheitserregers in Stuhlproben nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) meldepflichtig. Mit mehr als 60.000 übermittelten Erkrankungen im Jahr 2018 ist die *Campylobacter*-Enteritis zweithäufigste meldepflichtige Durchfallerkrankung in Deutschland. Geflügel und Hähnchenfleisch gelten als die wichtigsten Infektionsquellen (RKI 2019). Die Bekämpfungsansätze zielen daher auf eine Bekämpfung der *Campylobacter*-Belastung in der Lebensmittelkette ab (EFSA 2011). Durch Aufnahme von *Campylobacter* als mikrobiologisches Prozesshygienekriterium in die Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 gibt es nun auch rechtliche Vorgaben zur zulässigen Konzentration in der Produktion von Hähnchenfleisch. Seit Januar 2018 sind alle Produzenten von Hähnchenfleisch verpflichtet, am Ende der Schlachtung Nackenhaut-Proben auf *Campylobacter* untersuchen zu lassen. Bei wiederholter Überschreitung einer Konzentration von 1000 KbE/g Nackenhaut sind Maßnahmen zur Verbesserung der Schlachthygiene, bis hin zu Überprüfungen in den Herkunftsbetrieben, erforderlich (EG 2017).

Die Möglichkeiten der Bekämpfung von *Campylobacter* im Schlachtprozess sind begrenzt. Eine Entfernung am Ende des Schlachtprozesses ist schwierig, weil chemische Verfahren in der Broiler-Schlachtung in Europa nicht zugelassen sind und physikalische Maßnahmen im Schlachtprozess häufig die Eigenschaften der Lebensmittel so verändern, dass diese vom Verbraucher abgelehnt werden. Daher wird versucht, vor der Schlachtung die Konzentrationen von *Campylobacter* gering zu halten (Lin 2009).

Antibakteriell wirksame Kulturen werden bereits in der Lebensmittelindustrie eingesetzt (Messaoudi et al. 2013). Für die Minimierung von *Campylobacter* wurden bereits einige Studien durchgeführt, die wirksame Bakterienstämme identifizieren konnten (Svetoch and Stern 2010; Messaoudi et al. 2011; Messaoudi et al. 2012). Insbesondere Svetoch und Stern untersuchten verschiedene Bakterienkulturen auf ihre Wirksamkeit zur Bekämpfung von *Campylobacter* (Svetoch et al. 2005). Das Stoffwechselprodukt (Bakteriozin) eines Bakterienstammes der Gattung *Paenibacillus* wurde in Tierversuchen mit sehr guten Ergebnissen zur Bekämpfung von *Campylobacter* eingesetzt (Stern et al. 2005). Darüber hinaus liegen Untersuchungsergebnisse zum Einsatz von einem *Lactobacillus salivarius*-Stamm vor, der erfolgreich als Probiotikum zur Bekämpfung von *Campylobacter* im Broilerdarm eingesetzt wurde (Messaoudi et al. 2011; Messaoudi et al. 2012). Der Einsatz von Kulturen als Probiotika oder im Sinne einer „Competitive Exclusion“, also dem Verdrängen unerwünschter Bakteriengruppen durch erwünschte, zur Reduzierung von *Campylobacter* sowie der direkte Nutzen gegen *Campylobacter* gerichteter antibakterieller Substanzen (z.B. Bakteriozine) sind vielversprechende Ansätze, die weiter untersucht werden sollten (Meunier et al. 2016)

Eine weitere, viel diskutierte Möglichkeit zur Bekämpfung von *Campylobacter* in der Lebensmittelkette ist der Einsatz von Bakteriophagen. Bakteriophagen sind im biologischen Sinne Viren, die sehr spezifisch Bakterienzellen infizieren, mit Hilfe des Bakterienstoffwechsels ihre Nachkommen produzieren und diese durch Lyse der infizierten Zelle freisetzen. Zur Anwendung von Bakteriophagen gegen *Campylobacter* in Hähnchen wurden bereits vielversprechende Versuche durchgeführt (Kittler et al. 2013). Auch auf Geflügelfleisch und zur Bekämpfung von *Campylobacter* in Biofilmen wurden Versuche durchgeführt (Siringan et al. 2011).

Studien zur Kombination von Bakteriophagen mit anderen Maßnahmen zur Bekämpfung von *Campylobacter*, wie dem Einsatz antimikrobieller Kulturen, fehlen bisher weitgehend (Brussow 2017). Beide Stoffe bekämpfen sehr zielgerichtet bestimmte Bakterienstämme und haben auf die normale Darmflora darüber hinaus kaum Auswirkungen (Balandin et al. 2019; Richards et al. 2019). Eine Kombination dieser Wirkstoffe, wie sie in der natürlichen Darmflora vorkommt, wurde nach unserem Wissen bisher nicht untersucht.

3. Zielsetzung

Ziel des Projektes war es, Bakterienkulturen und Bakteriophagen auszuwählen, die sich zur Bekämpfung von *Campylobacter* eignen.

4. Ergebnisse, Schlussfolgerung und Diskussion

Für die Untersuchung der Wirkung von den Bakterien aus Wurst und Blinddarm gegen *Campylobacter* wurden die Bakterien angezüchtet und dann durch Filtration aus der Flüssigkultur entfernt. Damit verblieben nur ihre Stoffwechselprodukte in dem Wachstumsmedium und wurden auf ihre Wirkung gegen *Campylobacter* getestet. Fast alle getesteten Bakterien aus den Gruppen der Milchsäurebildner und einige der sporenbildenden Bakterien zeigten eine Hemmwirkung gegen *Campylobacter*-Isolate. Dagegen zeigte nur eines der *E. coli*-Isolate eine Wirkung gegen die verwendeten *Campylobacter*-Stämme. Alle Bakterien-Filtrate, die in diesen Tests eine Wirkung gegenüber *Campylobacter* zeigten, wurden mit verschiedenen Substanzen versetzt und erneut getestet, um genauer einzugrenzen, welche Stoffwechselprodukte der Bakterien gegen *Campylobacter* gewirkt hatten. Die meisten Bakterienfiltrate aus der Gruppe der Milchsäurebildner wirkten nicht mehr gegen *Campylobacter*, wenn der pH-Wert des Filtrates vor der Testung in den neutralen Bereich verschoben wurde. Dies deutet darauf hin, dass die Wirkung der milchsäurebildenden Bakterien meist ausschließlich auf der Säurebildung basierte. Bei Sporenbildnern konnte man diesen Effekt seltener beobachten.

Da bei mehrmaliger Anzucht der Bakterien sehr unterschiedliche Hemmwirkungen der Filtrate beobachtet wurden, versuchten wir anschließend herauszufinden, unter welchen Bedingungen die Bildung der hemmenden Substanzen am größten war. Für diese Untersuchung wurden acht Isolate ausgewählt, deren Wirkung nicht auf Säurebildung basierte.

Ein hoher Proteingehalt im Anzuchtmedium steigerte die antibakterielle Wirksamkeit bei den sporenbildenden Bakterien und teilweise hatten auch die Anzuchttemperatur und –dauer einen großen Einfluss auf die beobachtete Wirkung gegen *Campylobacter*.

Zusammenfassend wurden in diesem Projekt die bisher bekannten Methoden zur Gewinnung und Prüfung antimikrobiell wirksamer Kulturen gegen *Campylobacter* spp. weiterentwickelt, um zukünftig schneller nach neuen antimikrobiellen Wirkstoffen suchen zu können. Es wurden acht vielversprechende Bakterienisolate für die Bekämpfung von *Campylobacter* identifiziert und die Anzucht wurde so angepasst, dass die Wirkung des Filtrats einiger Bakterienisolate deutlich verbessert werden konnte. Die ausgewählten Bakterien müssen in zukünftigen Arbeiten vor der Anwendung auf ihre Sicherheit überprüft werden. Hierbei müsste insbesondere sichergestellt werden, dass sie keine Stoffe bilden, die auf Lebensmitteln unerwünscht sind oder den Tieren schaden können. Diese Arbeiten sollen in einem Folgeprojekt durchgeführt werden.

5. Verwertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse sollen als wissenschaftlicher Artikel in einer internationalen Fachzeitschrift veröffentlicht werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in die Anträge für weitere Forschungsvorhaben eingeflossen. Die Anwendung von antimikrobiellen Kulturen und Bakteriophagen sollen im Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit auch über das Projektende hinaus weiterentwickelt und –untersucht werden.

6. Ausblick

Durch das gewonnene Wissen kann zukünftig schneller nach antimikrobiellen Kulturen zur Bekämpfung von *Campylobacter* gesucht werden. Die in diesem Projekt ausgewählten Bakterien müssen noch weiter untersucht werden, könnten aber in Zukunft auch in Geflügelställen zum Einsatz kommen. Hierfür sind insbesondere weitere Arbeiten zur Sicherheit ihres Einsatzes und der Wirksamkeit unter Praxisbedingungen im Stall oder auf Lebensmitteln von Bedeutung. Die Stabilität auf Lebensmitteln und im Tier sowie die Wirksamkeit unter den dort herrschenden Bedingungen müssen weiter untersucht werden.

7. Literaturverzeichnis

- Balandin, S. V., E. V. Sheremeteva and T. V. Ovchinnikova (2019). "Pediocin-Like Antimicrobial Peptides of Bacteria." Biochemistry (Mosc) **84**(5): 464-478.
- Blaszczyk, U. and J. Moczarny (2016). "Bacteriocins of Gram-negative bacteria - structure, mode of action and potential applications." Postepy Mikrobiologii **55**(2): 157-171.
- Brussow, H. (2017). "Infection therapy: the problem of drug resistance - and possible solutions." Microbial biotechnology **10**(5): 1041-1046.
- EFSA (2011). "Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain." EFSA Journal **9**(4): 2105.
- EG (2017). Commission Regulation (EU) 2017/1495 E. Commission.
- Embaby, A. M., Y. Heshmat, A. Hussein and H. S. Marey (2014). "A sequential statistical approach towards an optimized production of a broad spectrum bacteriocin substance from a soil bacterium *Bacillus* sp. YAS 1 strain." ScientificWorldJournal **2014**: 396304.
- Gencay, Y. E., T. Birk, M. C. Sorensen and L. Brondsted (2017). "Methods for Isolation, Purification, and Propagation of Bacteriophages of *Campylobacter jejuni*." Methods Mol Biol **1512**: 19-28.
- Kittler, S., S. Fischer, A. Abdulmawjood, G. Glunder and G. Klein (2013). "Effect of bacteriophage application on *Campylobacter jejuni* loads in commercial broiler flocks." Applied and Environmental Microbiology **79**(23): 7525-7533.
- Klein, G., W. Jansen, S. Kittler and F. Reich (2015). "Mitigation strategies for *Campylobacter* spp. in broiler at pre-harvest and harvest level." Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift **128**(3-4): 132-140.
- Lin, J. (2009). "Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry." Foodborne pathogens and disease **6**(7): 755-765.
- Messaoudi, S., G. Kergourlay, M. Dalgalarondo, Y. Choiset, M. Ferchichi, H. Prevost, M. F. Pilet, J. M. Chobert, M. Manai and X. Dousset (2012). "Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51." Food Microbiology **32**(1): 129-134.
- Messaoudi, S., G. Kergourlay, A. Rossero, M. Ferchichi, H. Prevost, D. Drider, M. Manai and X. Dousset (2011). "Identification of lactobacilli residing in chicken ceca with antagonism against *Campylobacter*." International Microbiology **14**(2): 103-110.
- Messaoudi, S., M. Manai, G. Kergourlay, H. Prevost, N. Connil, J. M. Chobert and X. Dousset (2013). "Lactobacillus salivarius: Bacteriocin and probiotic activity." Food Microbiology **36**(2): 296-304.
- Meunier, M., M. Guyard-Nicodeme, D. Dory and M. Chemaly (2016). "Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: biosecurity measures, feed additives and vaccination." Journal of Applied Microbiology **120**(5): 1139-1173.
- Noonpakdee, W., C. Santivarangkna, P. Jumriangrit, K. Sonomoto and S. Panyim (2003). "Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage." International Journal of Food Microbiology **81**(2): 137-145.
- Parente, E., C. Brienza, M. Moles and A. Ricciardi (1995). "A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity." Journal of Microbiological Methods **22**(1): 95-108.
- Rea, M. C., D. Alemayehu, R. P. Ross and C. Hill (2013). "Gut solutions to a gut problem: bacteriocins, probiotics and bacteriophage for control of *Clostridium difficile* infection." Journal of medical microbiology **62**(Pt 9): 1369-1378.
- Richards, P. J., P. L. Connerton and I. F. Connerton (2019). "Phage Biocontrol of *Campylobacter jejuni* in Chickens Does Not Produce Collateral Effects on the Gut Microbiota." Frontiers in Microbiology **10**: 476.
- RKI (2019). "*Campylobacter*-Enteritis." Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Infektionskrankheiten 2018.
- Siringan, P., P. L. Connerton, R. J. Payne and I. F. Connerton (2011). "Bacteriophage-Mediated Dispersal of *Campylobacter jejuni* Biofilms." Applied and Environmental Microbiology **77**(10): 3320-3326.

- Stern, N. J., E. A. Svetoch, B. V. Eruslanov, Y. N. Kovalev, L. I. Volodina, V. V. Perelygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich and V. P. Levchuk (2005). "*Paenibacillus polymyxa* purified bacteriocin to control *Campylobacter jejuni* in chickens." Journal of Food Protection **68**(7): 1450-1453.
- Svetoch, E. A. and N. J. Stern (2010). "Bacteriocins to control *Campylobacter* spp. in poultry - A review." Poultry Science **89**(8): 1763-1768.
- Svetoch, E. A., N. J. Stern, B. V. Eruslanov, Y. N. Kovalev, L. I. Volodina, V. V. Perelygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, V. D. Pokhilenko, V. N. Borzenkov, V. P. Levchuk, O. E. Svetoch and T. Y. Kudriavtseva (2005). "Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* strains inhibitory to *Campylobacter jejuni* and characterization of associated bacteriocins." J Food Prot **68**(1): 11-17.