

## Schnellnachweis von *Escherichia coli* in der Lebensmittelproduktion durch Biochips auf 16S ribosomaler RNA-Basis

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle I:</b>	Universität Bayreuth, Laboratorium für Biochemie Prof. Dr. M. Sprinzl
<b>Forschungsstelle II:</b>	Max-Rubner-Institut (MRI) Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Kulmbach Prof. Dr. Dr. M. Gareis
<b>Industriegruppe:</b>	Bundesverband der Deutschen Fleischwarenindustrie e.V., Bonn
	Projektkoordinator: W. Frey, Raps GmbH & Co. KG, Kulmbach
<b>Laufzeit:</b>	2007 – 2009
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 462.200,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Lebensmittelsicherheit und Prozesshygiene sind zentrale Anliegen der Lebensmittelwirtschaft. Seit dem 01.01.2006 gelten innerhalb der Europäischen Union mikrobiologische Kriterien (Verordnung (EG) Nr. 2073/2006). Eines der wichtigsten Prozesshygienekriterien dieser Verordnung ist das Vorkommen von *E. coli* als Indikatororganismus für eine fäkale Kontamination. Hierbei werden, in Abhängigkeit von der Lebensmittelmatrix, *E. coli*-Keimzahlen zwischen 0 – 5 x 10<sup>3</sup> Kolonie-bildenden Einheiten (KBE)/g bzw. ml als Grenzwerte für eine Überprüfung des Herstellungsprozesses gefordert. Die Anwendung dieser Verordnung stellt besonders kleine und mittlere Unternehmen vor neue Herausforderungen: Denn konventionelle mikrobiologische Methoden (z.B. die meisten ISO- und DIN-Methoden oder die Methoden nach der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB) sind zeit- und kostenaufwändig. Weiterhin benötigen alternative molekularbiologische Methoden einen hohen technischen Aufwand und spezialisiertes Personal. Die Mehrheit der kleineren Unternehmen verfügt nicht über Laborräume und die erforderliche Ausstattung. Daher ist es notwendig, molekularbiologische Biosensoren zu entwickeln, die auch

außerhalb eines Labors eingesetzt werden können.

Ziel des Forschungsvorhabens war der Schnellnachweis von *Escherichia coli* auf allen Stufen der Lebensmittelproduktion über die direkte und spezifische Detektion bakterieller 16S rRNA mittels eines Biosensorssystems auf Basis eines elektrisch auslesbaren DNA-Chips. Kernidee hierbei ist der direkte Nachweis ribosomaler Ribonukleinsäuren (rRNA). Hierdurch sollen Amplifikationsschritte, wie die Polymerasekettenreaktion (PCR), vermieden werden, was eine Zeitersparnis, eine einfache Automatisierbarkeit mit dem Einsatz vor Ort und vor allem aber eine zuverlässige Quantifizierbarkeit ermöglicht.

### Forschungsergebnis:

Ein Arbeitsschwerpunkt konzentrierte sich zunächst auf die Etablierung und Optimierung der elektronisch auslesbaren Biochip-Plattform (Forschungsstelle I), ein zweiter beschäftigte sich mit der Extraktion ribosomaler RNA aus Bakterienkulturen und Probenmatrices, speziell Fleisch und Fleischerzeugnissen (Forschungsstelle II).

Das im Vorhaben etablierte innovative Nachweissystem beruht auf einer Ein-Schritt-Hybridisierung zwischen immobilisierten Fänger-Oligonukleotiden (ODN), Helfer-ODN, EST2-Detektor-ODN und 16S rRNA (Sandwich-Hybridisierung). Die Adaption der elektrochemischen Biochiptechnologie zur Detektion von 16S rRNA und die Optimierung der einzelnen Parameter (Oberflächenbeschaffenheit, Immobilisierung, Mikrofluidik der Hybridisierungskammer, Hybridisierungs- und Waschbedingungen) der Biochipmessung resultierte in einem Detektionssystem, das sich durch hohe Spezifität, Sensitivität und Stabilität auszeichnet. Das Detektionslimit des Biochips wurde anhand von *E. coli*-Reinkultur in der exponentiellen Wachstumsphase mit 500-1.000 KbE bestimmt. Für den Nachweis von *E. coli* in den Lebensmittelmatrices Fleisch-Tropfsaft und Milch wurden als untere Grenze 7.000 bzw. 5.000 KbE/ml ermittelt. Da nur 10 % der isolierten RNA für die Analyse am Biochip verwendet wird, stimmen die Nachweisgrenzen sehr gut überein.

Da die Sensitivität und Stabilität der gesamten Nachweisprozedur wesentlich von einer quantitativen RNA-Isolierung abhängt, wurden unterschiedliche Methoden verglichen und beste Ergebnisse mit einer Dreischritt-Lyse, bestehend aus Lysozym-, Proteinase K- und Ultraschallbehandlung, und Verwendung des Qiagen-Rneasy-Kits erzielt. Diese Kombination führte zu einer erheblichen Steigerung der RNA-Ausbeute für *E. coli* in der Lebensmittelmatrix.

Mit ca. 5.000 KbE *E. coli* stellte sich aber die Sensitivität des direkten Nachweises aus einer Probe als zu gering dar, um die in der Verordnung EG 2073/2005 definierten unteren Grenzwerte von 50 KbE/g zu detektieren. Zudem variiert der 16S rRNA-Gehalt von *E. coli*, der in der exponentiellen Wachstumsphase am höchsten ist, in Abhängigkeit des physiologischen Zustandes um das bis zu 10-fache. Da *E. coli* in der Lebensmittelmatrix während der Prozessierung eher suboptimale Bedingungen vorfindet, ist die Sensitivität des 16S rRNA-Direktnachweises aufgrund des vermutlich geringeren Ribosomengehaltes gegenüber exponentiell wachsenden Bakterien reduziert. Aus diesem Grund wurde ein auf 5 Stunden optimierter Anreicherungsschritt in gepuffertem Peptonwasser in das Verfahren integriert, um *E. coli* in die exponentielle Wachstumsphase zu versetzen und die 16S rRNA-Konzentration zu erhöhen.

Der etablierte Gesamtnachweis von *E. coli* wurde abschließend in einem Serienexperiment zur Qualitätskontrolle von 25 Fleischproben verwendet. Die Ergebnisse belegten den gesicherten Nachweis von 2.000 KbE/ml Anreicherung sowie die hohe Sensitivität der entwickelten Nachweisprozedur für *E. coli* von  $\leq 1$  KbE/ml Tropfsaft nach einer Anreicherung von 5 Stunden. Mit Hilfe der entwickelten Methode war ein Nachweis innerhalb von 7 Stunden von der Probenaufbereitung bis zum Ergebnis, also innerhalb eines Zeitraumes von einem Arbeitstag, möglich.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Die angestrebten Forschungsergebnisse sind interdisziplinär und branchenübergreifend für alle Unternehmen nutzbar, die mikrobiologisch/hygienische Kriterien zu berücksichtigen haben. Neben der wirtschaftlichen Bedeutung für unterschiedliche Sparten der Lebensmittelindustrie (Fleischwaren, Milchprodukte, Feinkostartikel, Getreideprodukte, Gewürze u.a.) sind die Ergebnisse des Vorhabens nutzbar für Unternehmen der Mikrosystemtechnik, Biotechnologie, Wasser-, Umwelt- und Pharmaanalytik und Medizintechnik sowie Diagnostikhersteller und das Dienstleistungsgewerbe.

Anwendungen ergeben sich im Rahmen des Hygienemonitorings primär im Bereich des Ernährungsgewerbes, dessen Betriebe überwiegend kmU sind. Das schnelle Biochip-System wird, eine weitere Automatisierung vorausgesetzt, die in einem nächsten Schritt folgen muss, zu einer Steigerung der Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit von kmU beitragen können. Daneben lassen sich die Projektergebnisse für folgende Industriesparten verwenden: Biotechnologie, Medizintechnik, Mikrosystemtechnologie, Mess- und Regeltechnik, Mikrofluidik, Elektrotechnik, Softwareentwicklung und Geräte- und Apparatebau. Diese wachstumsorientierten Industriebranchen werden in Europa ebenfalls vorwiegend von kmU repräsentiert. Innovative Biosensoren sind wegen der komplexen und interdisziplinären Forschung vor allem für Biotechnologie- und Medizintechnik-Firmen von Interesse. Das Biosensor-Nachweissystem für *E. coli* ist darüber hinaus leicht übertragbar auf den Pathogennachweis und somit auf den medizinischen Bereich.

**Publikationen (Auswahl):**

1. FEI-Schlussbericht 2009.
2. Gareis, M.: Schnelldachweis von *Escherichia coli* in der Lebensmittelproduktion mittels Biochips. Tagungsband 68. FEI-Jahrestagung 2010, 91-107 (2010).
3. Heidenreich, B., Pöhlmann, C., Sprinzl, M. und Gareis, M.: Detection of *Escherichia coli* in meat with an electrochemical biochip. J. Food Prot. 73 (11), (2010).
4. Heidenreich, B., Pöhlmann, C., Sprinzl, M. und Gareis, M.: Schnelldachweis unerwünschter Keime in der Lebensmittelproduktion mittels Biochip. Fleischwirtschaft 90 (7), 96-99 (2010).
5. Heidenreich, B., Pöhlmann, C., Sprinzl, M. und Gareis, M.: Schnelldachweis von unerwünschten Keimen in der Lebensmittelproduktion mittels Biochips. Mitt. Fleischforschung Kulmbach 48 (184), 77-84 (2009).
6. Pöhlmann, C., Wang, Y., Humenik, M., Heidenreich, B., Gareis, M., und Sprinzl, M.: Rapid, specific and sensitive electrochemical detection of foodborne bacteria. Biosens. Bioelectron. 24, 2766-2771 (2009).
7. Humenik, M., Pöhlmann, C., Wang, Y. und Sprinzl, M.: Enhancement of Electrochemical Signal on Gold Electrodes by Polyvalent Esterase-Dendrimer Clusters. Bioconjug. Chem. 19, 2456-2461 (2008).
8. Pöhlmann, C., Wang, Y. und Sprinzl, M.: Detection of nucleic acid: Electronic DNA chips [Nukleinsäuredetektion: Elektronische DNA-chips]. Biospektrum 13, 159-161 (2007).

**Weiteres Informationsmaterial:**

Universität Bayreuth  
Laboratorium für Biochemie  
Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth  
Tel.: 0921/55-2420, Fax: 0921/55-2432  
E-Mail: mathias.sprinzl@uni-bayreuth.de

Max-Rubner-Institut (MRI)  
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel  
Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie  
E.-C.-Baumann-Straße 20, 95326 Kulmbach  
Tel.: 09221/803-220, Fax: 09221/803-331  
E-Mail: manfred.gareis@mri.bund.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn  
Tel.: 0228/372031, Fax: 0228/376150  
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via:

