



Doctoral Thesis

Survival of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli during Production and Ripening of Raw Milk Cheese

Author(s):

Peng, Silvio

Publication Date:

2014

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010268556> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 22194

***SURVIVAL OF SHIGA TOXIN-PRODUCING
ESCHERICHIA COLI DURING PRODUCTION
AND RIPENING OF RAW MILK CHEESE***

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

SILVIO PENG

MSc, ETH Zürich

born on *21.05.1983*

citizen of *Vals*

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin Loessner, examiner

and

Prof. Dr. Roger Stephan, co-examiner

and

Dr. Jörg Hummerjohann, co-examiner

2014

ABSTRACT

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is a zoonotic foodborne pathogen, which can cause gastrointestinal disease in humans, including watery and bloody diarrhoea, haemorrhagic colitis, and haemolytic uraemic syndrome. The transmission of STEC is mainly linked to the consumption of contaminated food such as meat and meat products, sprouts, apple juice and cider. Several outbreaks were also associated with the consumption of raw milk or raw milk products. Raw milk is commonly used in traditional cheese making because the natural enzymes and flora contribute to the flavour of the final product. However, the use of unpasteurized milk also increases the risk of contamination by pathogens. In particular STEC are a risk in raw milk cheese as their survival until the end of cheese ripening was shown by several studies. During cheese-production, STEC encounter different stresses such as organic acid stress due to lactic acid production by the starter cultures, heat stress during cooking of the curd, and salt stress due to brine treatment. STEC can adapt to such stress by stress response mechanisms, which typically induce genes encoding proteins that counteract the stress, thus allowing STEC to potentially survive the conditions encountered. Knowledge on survival of STEC in cheese, including the involved stress response mechanisms, is therefore important and may assist to develop control measurements against STEC.

In this thesis different aspects of survival of STEC during the production and ripening of raw milk cheese were investigated.

The survival of bacteria in food mainly depends on their adaptation to the conditions present, e.g., by the induction of stress response mechanisms, why it is important to investigate and understand these mechanisms. In **chapter 1**, stress response mechanisms in *E. coli* and their implications for STEC survival during the cheese production process were reviewed, including the general stress response and the major single stress response systems against acid, osmotic and heat shock stress. The general stress response is mainly regulated by the sigma subunit of the RNA polymerase RpoS, which itself is controlled by different mechanisms, including transcriptional, translational and post-translational control. The induction of the general stress response can be triggered by various different stress conditions, altering the bacteria to become more resistant to stress in general. The acid stress response is based on five different enzyme-dependent systems. The glucose-repressed acid resistance system is under control of RpoS, but the mode of action is currently unknown. Four acid resistance systems are based on decarboxylase enzymes, which can diminish the cytoplasmic proton concentration by replacing carboxyl-groups in their substrates with protons. The initial osmotic stress response to an upshift in external salt concentration, such as during salting of the cheese, is the uptake and accumulation of potassium to adjust the intracellular ion concentration. Thereafter compatible

solutes such as glycine betaine and trehalose are accumulated by uptake or intracellular synthesis. Compatible solutes in contrast to potassium do not negatively interfere with cellular processes when they are present in high concentrations. The heat shock response is based on the induction of heat shock proteins, which are mainly chaperones and proteases involved in protein folding, repair and degradation, and in prevention of aggregations. In addition to the single stress response mechanisms described, further effects such as cross-protection and adaptive mutations were discussed in this review.

In **chapter 2**, a strain collection of 26 STEC and 15 generic *E. coli* strains isolated during the cheese production process and six STEC strains isolated from cattle faeces were *in vitro* characterized based on cheese production-relevant stresses. It was investigated whether the *E. coli* strains isolated from cheese share phenotypic features, e.g., in their stress resistance, which might be beneficial for *E. coli* survival in cheese. To analyse thermal inactivation, the 47 *E. coli* strains were exposed to 55 °C for 15 min, which resulted in an inactivation of at least 1 log₁₀ for 40 strains, while seven generic *E. coli* strains exhibited an increased heat resistance. The glucose-repressed oxidative acid resistance system was investigated by exposure to pH 2.5 for 2 h in a minimal medium with induced or repressed system, resulting in 20 strains, including STEC and generic *E. coli* strains, that showed survival of at least 10 % with induced oxidative acid resistance system. At typical cheese-relevant pH and water

activity (a_w) values of pH = 5.2 or $a_w = 0.970$ all *E. coli* strains exhibited similar growth, while at lower pH = 4.5 or $a_w = 0.942$, all strains showed a decrease of about 0.2 or 0.8 \log_{10} within 24 h, respectively. The *in vitro* characterization showed no general differences between STEC and generic *E. coli* strains, or between cheese and faecal isolates, respectively. The considerable strain variations in view of stress response including strains highly affected by the different stresses applied did not indicate a feature beneficial for *E. coli* survival in cheese that is shared among the strains, which were isolated from cheese.

Five *E. coli* strains, including three STEC strains, were selected based on the *in vitro* characterization data to investigate their fate during production and ripening of a semi-hard raw milk cheese, which is described in **chapter 3**. The five strains were selected to represent pathogenic (non-O157 STEC) and non-pathogenic *E. coli* strains as well as to represent strains that exhibited different stress resistance phenotypes. The *E. coli* strains were inoculated into raw milk at two different spiking levels (approximately 10 cfu/ml and 1'000 cfu/ml) before the milk was used for the production of two different cheese types differing only in cooking temperature (40 or 46 °C). A Swiss cheese recipe was used with some modifications required because of biosafety, including different size and form of the cheese as well as the use of wax coating instead of the typical red smear. The cheeses were subsequently sampled during production and the 16-week ripening period. Initially, an increase in *E. coli*

counts of about $3.5 \log_{10}$ cfu/g was observed from raw milk to the freshly produced cheese, which was attributed to a physical concentration effect and to growth of *E. coli* during the production process. Thereafter, in both cheese types a slow continuous decrease occurred for all strains during ripening, but with significant variations between the *E. coli* strains. For the two generic *E. coli* strains higher counts were observed than for the three STEC strains. However, the survival of only one of the three STEC strains was significantly weaker in all different cheese types. After the end of the 16-week ripening period, at least 10 cfu/g STEC were found in six of the 16 cheeses that were made from raw milk spiked at the lower level. After enrichment, the detection of STEC was possible in almost all cheeses made from the two different spiking levels. This study showed that the generic *E. coli* strains in tendency survived cheese production and ripening better than the STEC strains, and the potential of STEC to survive until the end of the ripening period in semi-hard raw milk cheese even from a low spiking level reflecting a realistic contamination of milk by STEC.

In **chapter 4**, the heat resistance of nine *E. coli* strains, including four STEC strains, was investigated at subpasteurization conditions in milk using a pilot-plant pasteurizer, which reflects typical commercial conditions. The finding of seven generic *E. coli* strains exhibiting an increased heat resistance during the *in vitro* characterization required further investigations under close-to-practice conditions in milk. An *E. coli* strain

exhibiting an increased heat resistance might better survive heat treatment of milk prior to cheese production as well as the cheese production process itself and in addition the heat resistance in different matrices may vary. The short-time application of subpasteurization heat on raw milk under continuous flow is generally referred to as thermisation. A thermisation treatment can reduce bacterial loads, while retaining some of the beneficial features of raw milk. In this study, nine *E. coli* strains were subjected to different time-temperature combinations to analyse their heat resistance parameters in milk. Six of the nine *E. coli* strains, including all STEC strains, showed a similar inactivation at 60, 62.5 and 65 °C, whereas three strains exhibited an increased heat resistance. The reduction of all *E. coli* strains was lower than 2 log₁₀ after 25 s at 60 and 62.5 °C. Six and eight *E. coli* strains, respectively, exhibited a reduction of at least 5 log₁₀ at 65 and 67.5 °C after 25 s. However, three strains were not reduced by more than 2 log₁₀ after 25 s at 65 °C and strain FAM21805 even at 67.5 °C was not reduced by more than 1 log₁₀ after 25 s thermisation treatment. These findings show that it should be considered that time-temperature combinations higher than 65°C are required to result a substantial reduction for some *E. coli* strains during a thermisation treatment.

In **chapter 5**, the survival of two generic *E. coli* strains was investigated during production and ripening of semi-hard and hard raw milk cheese, which were produced according to Swiss cheese recipes. In contrast to the previous challenge

study described in chapter 3, no biosafety-related modifications were required. The two *E. coli* strains were used as model organisms to analyse their potential to survive a commercial cheese production process as typically applied in Switzerland. Form and size of the cheese as well as the application of a wax coat might have affected *E. coli* survival in cheese why it was important to compare the previously observed survival with survival at close-to-reality conditions. The two *E. coli* strains of which one exhibits an increased heat resistance, were spiked into raw milk before the milk was used for production of semi-hard or hard raw milk cheese. During production of the semi-hard raw milk cheese, an increase in bacterial counts occurred from raw milk to the freshly produced cheese. Thereafter, the *E. coli* counts showed a log-linear decrease with a faster reduction rate in the core of the cheese than at the rind, and with a faster reduction rate of the strain, which does not exhibit an increased heat resistance, at the rind. *E. coli* were still observed in considerable numbers at the rind at the end of the 16-week ripening period of semi-hard raw milk cheese, and remained detectable by enrichment in the core of all cheeses. The faster reduction of *E. coli* in the core of the cheese might have resulted from a higher partial pressure of carbon dioxide in the core, and thus the outer-most edible part of the cheese might constitute the most favourable environment for the survival of *E. coli* in cheese. During the hard raw milk cheese production, an increase of approximately $1 \log_{10}$ in *E. coli* counts from raw milk to the curd before cooking was observed. After cooking of the curd, the

strain, which exhibits an increased heat resistance, was reduced by about $0.5 \log_{10}$, while the other strain was only detected in one of the eight curd samples. Thereafter, both *E. coli* strains were only detected after enrichment, which however included the detection of the more heat-resistant strain in one out of the eight spiked hard raw milk cheeses at the end of the 16-week ripening period, indicating the potential of such an *E. coli* strain to infrequently survive even in hard raw milk cheese.

The survival phenotypes observed during the cheese challenge test studies demanded further investigations on the differences observed between the *E. coli* strains in particular in view of their stress response. The analysis of stress response gene expression by reverse-transcription quantitative PCR requires the application of a reference gene for mRNA expression level normalization, which is stably expressed under the conditions investigated. In **chapter 6**, three potential *E. coli* reference genes were evaluated for their expression stability during cheese-related organic acid and salt stress exposure in order to select the most stably expressed gene under the conditions applied. The five *E. coli* strains, investigated in the cheese challenge test study (chapter 3), were exposed to control, sodium chloride stress or lactic acid stress conditions *in vitro*. Subsequently, RNA was isolated, reverse-transcribed and applied in quantitative real-time PCR targeting the three housekeeping genes *cysG*, *hcaT* and *rssA*. Overall, the *rssA* gene (16S ribosomal RNA gene of *E. coli*) exhibited the most stable expression during the stress exposure

experiments and is therefore recommended as the preferred reference gene for mRNA expression level normalization under the conditions applied. The expression of the *cysG* gene showed considerable variations and the least expression stability. For the *hcaT* gene similar interstrain variability as for *rssA* were observed, but the expression stability was lower than for *rssA* during both, organic acid and salt stress exposure.

In **chapter 7**, the relative mRNA expression of two acid (*cadA* and *speF*) and five salt stress (*kdpA*, *proP*, *proW*, *otsA* and *betA*) response genes of the five *E. coli* strains investigated in the cheese challenge test study (chapter 3), was analysed during cheese-related lactic acid and sodium chloride stress exposure. By application of reverse transcriptase real-time PCR the transcriptional fold induction of the stress response genes during stress exposure was examined relative to control conditions to compare the *E. coli* strains among each other. This may allow to link the mRNA expression of the stress response genes with the survival phenotypes observed during the cheese challenge test studies. The transcriptional induction upon lactic acid stress exposure was similar by four of the five *E. coli* strains that induced the lysine decarboxylase gene *cadA* significantly, while the fifth strain lacked this gene. The second acid stress response gene *speF* was not induced by any of the *E. coli* strains during lactic acid stress exposure. During sodium chloride stress exposure all *E. coli* strains did induce *proW* and *otsA* similarly, while the relative mRNA expression of *kdpA*, *proP* and *betA* was different between

the strains. One strain did not show an induction in these three stress response genes, while four and three strains, respectively, similarly induced *kdpA* and *betA*. The two generic *E. coli* strains were the only strains that showed an induction in the *proP* gene. The transcriptional induction differences observed for the five *E. coli* strains during sodium chloride stress exposure displayed a potential link to the survival phenotypes observed during the cheese challenge test study. The STEC strain that showed the weakest survival in cheese, was the only strain not inducing *kdpA* and did as well not induce *proP* and *betA*. In addition, the two generic *E. coli* strains, which survived rather better than the STEC strains in cheese, were the only strains inducing *proP*, indicating that increased production of compatible solutes might be beneficial for *E. coli* survival in cheese.

In conclusion, the research conducted in this thesis contributes to the knowledge on the reaction of different stress response mechanisms to stress in *E. coli* and their meaning for survival of STEC in raw milk cheese. The stress response of the *E. coli* strains was investigated by different *in vitro* experiments, which revealed that the strains isolated from cheese did not share a common feature beneficial for survival in cheese, as well as some *E. coli* strains that were highly affected by certain stresses. Thereafter, the dynamics of (non-O157) STEC and generic *E. coli* strains to survive until the end of ripening of semi-hard raw milk cheese as typically produced in Switzerland was shown and included significant variations between the *E. coli* strains. Finally, the

transcriptional induction of different stress response genes was to a part associated with the survival phenotypes observed during the cheese challenge studies. Altogether, the findings indicate that an impaired salt stress response as observed for one STEC strain could have caused its weaker survival during the raw milk cheese production and ripening process. The heat stress response is thought to be mainly important if the cooking temperature becomes higher such as for a hard cheese or during thermisation of milk. Onwards investigations are still required to analyse the contribution of the different salt and acid stress response genes on survival of STEC during cheese production and ripening. Additional research could include further factors that may affect survival of *E. coli* in cheese or feasible modifications that could impede *E. coli* survival during the cheese production process.

ZUSAMMENFASSUNG

Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli* (STEC) sind Zoonoseerreger, die oft durch Lebensmittel übertragen werden. Beim Menschen können durch STEC verschiedene gastrointestinale Symptome verursacht werden einschliesslich wässriger und blutiger Diarrhö, hämorrhagische Koliken und des hämolytisch urämischen Syndroms. STEC werden häufig durch den Verzehr von kontaminiertem Fleisch und Fleischprodukten übertragen, können aber auch durch den Verzehr von anderen Nahrungsmitteln wie Sprossen, Obst und Gemüse, oder Apfelsaft und –wein übertragen werden. Einige STEC-Ausbrüche wurden zudem mit dem Konsum von Rohmilch oder Rohmilchprodukten assoziiert. Bei der traditionellen Käseherstellung wird häufig Rohmilch verwendet wegen der darin enthaltenen natürlichen Enzymen und der bakteriellen Flora, welche den Geschmack des fertigen Produktes positiv beeinflussen können. Die Verwendung von nicht pasteurisierter Milch birgt jedoch ein erhöhtes Risiko, dass diese mit Krankheitserregern kontaminiert ist. Insbesondere STEC stellen hier ein Risiko dar, da STEC, wie von mehreren Studien gezeigt wurde, die Reifung eines Rohmilchkäses überleben können. Während der Käseproduktion sind STEC verschiedenen Stressoren ausgesetzt. Dazu gehören u.a. die Milchsäure, welche von den Starterkulturen produziert wird, der Hitzestress durch das Erwärmen des Bruchs und der Salzstress durch das Einlegen des Käses in Salzlake. Zur Anpassung an

solche Stressfaktoren können STEC verschiedene Stressantwortmechanismen induzieren. Dabei werden häufig Gene induziert, welche Proteine codieren, die dem Stress entgegenwirken und somit STEC das Überleben ermöglichen können. Deshalb ist es wichtig das Überlebensverhalten von STEC in Käse und insbesondere die zugrundeliegenden Stressantwortmechanismen zu erforschen und zu verstehen, weil das beispielsweise dazu beitragen könnte, Massnahmen gegen das Überleben von STEC während des Käseherstellungsprozesses zu entwickeln. In dieser Doktorarbeit wurden verschiedenen Aspekte zum Überleben von STEC während der Rohmilchkäseproduktion und -reifung untersucht.

Um in Nahrungsmitteln überleben zu können, müssen Bakterien sich den dort herrschenden Konditionen anpassen. Das geschieht primär durch die Induktion von verschiedenen Stressantwortmechanismen, weshalb es von Interesse ist, solche Mechanismen zu untersuchen und zu verstehen. In **Kapitel 1** wurden verschiedene *E. coli*-Stressantwortmechanismen und deren Bedeutung für das Überleben von STEC während des Käseherstellungsprozesses besprochen. Dabei wurden sowohl die generelle Stressantwort als auch die Stressantworten gegen die wichtigsten einzelnen Stressfaktoren berücksichtigt. Der wichtigste Regulator der generellen Stressantwort ist der Sigmafaktor RpoS, welcher selbst durch verschiedene Mechanismen reguliert wird, einschliesslich der Kontrolle der Transkription und der Translation sowie der Kontrolle der Aktivität des Sigmafaktors. Verschiedene Stressoren können die generelle Stressantwort

induzieren und so physiologische Anpassungen der Bakterien bewirken, wodurch die Stressresistenz gegen diesen und andere Stressoren erhöht wird. Die Säurestressantwort schliesst fünf Enzym-abhängige Systeme mit ein. Das oxidative Säureresistenzsystem wird durch den Sigmafaktor RpoS kontrolliert, jedoch ist die Funktionsweise aktuell nicht näher bekannt. Vier weitere Säureresistenzsysteme können die intrazelluläre Protonenkonzentration verringern, indem ein Dekarboxylase-Enzym bei ihrem jeweiligen Substrat eine Carboxy-Gruppe durch ein Proton ersetzt, während Kohlendioxid abgespalten wird. Die osmotische Stressantwort, welche von einem Anstieg in der externen Salzkonzentration, wie zum Beispiel während des Salzens des Käses, ausgelöst wird, beginnt mit der Aufnahme und Akkumulierung von Kalium, um die intrazelluläre Salzkonzentration anzupassen. Anschliessend werden kompatible Soluten, wie Glycinbetain und Trehalose angesammelt, indem diese aus der Umgebung aufgenommen oder intrazellulär hergestellt werden. Kompatible Soluten können im Gegensatz zu Kalium in hoher Konzentration vorliegen, ohne dass zelluläre Prozesse gestört werden. Bei der Hitzestressantwort werden verschiedene Hitzeschockproteine induziert, welches vorwiegend Chaperone und Proteasen sind, die an der Proteinfaltung, -reparatur und -degradation beteiligt sind und zusätzlich Aggregationen verhindern können. Neben den einzelnen Stressantwortmechanismen wurden weitere Effekte, wie die Kreuzimmunität gegen unterschiedliche Stressoren und das Auftreten adaptiver Mutationen, besprochen.

In **Kapitel 2** wird die *in vitro* Charakterisierung einer *E. coli* Stammkollektion beschrieben. Diese Kollektion bestand aus 26 STEC und 15 generischen *E. coli* Stämmen, welche aus Käse, sowie aus sechs STEC Stämmen, welche aus Rinderfäzes isoliert wurden. Bei der Charakterisierung wurden die *E. coli* Stämme verschiedenen Stressoren ausgesetzt, welche die Konditionen in Rohmilchkäse simulierten, um zu untersuchen, ob die Stämme gemeinsame Eigenschaften in der Stressresistenz besitzen, die das Überleben der *E. coli* in Käse begünstigen könnten. Die Inaktivierung durch erhöhte Temperatur wurde untersucht, indem die Reduktion der Bakterienzahl innerhalb von 15 min bei 55 °C ermittelt wurde. Dabei wiesen sieben generische *E. coli* Stämme eine erhöhte Hitzeresistenz auf, während die restlichen 40 Stämme alle um mindestens eine \log_{10} -Stufe reduziert wurden. Zur Untersuchung des oxidativen Säureresistenzsystems wurden die *E. coli* Stämme in Minimalmedium bei pH 2.5 inokuliert, um die Inaktivierung nach 2 h bei Konditionen, welche das Säureresistenzsystem entweder induzierten oder reprimierten, zu ermitteln. Bei induzierenden Konditionen zeigten 20 Stämme, sowohl STEC als auch generischen *E. coli*, ein Überleben von mindestens 10 %. Alle *E. coli* Stämme wiesen ein ähnliches Wachstum bei Käse-relevanten Bedingungen (pH = 5.2 oder Wasseraktivität (a_w) = 0.970) auf, während bei tieferen Werten (pH = 4.5 oder a_w = 0.942) alle Stämme durchschnittlich etwa 0.2 respektive 0.8 \log_{10} innerhalb von 24 h reduziert wurden. Die *in vitro* Charakterisierung zeigte keine generellen Unterschiede zwischen STEC und den generischen *E. coli* Stämmen

oder zwischen den Käse- und den Fäzes-Isolaten. Die *E. coli* Stämme wiesen eine beträchtliche Variation in ihrer Stressresistenz auf einschliesslich einiger Stämme, welche stark durch die verschiedenen untersuchten Stressoren inaktiviert wurden. Insgesamt konnten keine gemeinsamen Eigenschaften der aus Käse isolierten *E. coli* gefunden werden, die das Überleben im Käse begünstigt haben könnten.

In **Kapitel 3** wurde das Überlebensverhalten von fünf *E. coli* Stämmen - davon drei STEC Stämme - während der Produktion und Reifung von Halbhart-Rohmilchkäse untersucht. Die Stämme wurden, basierend auf den Ergebnissen der *in vitro* Charakterisierung, ausgesucht, um sowohl pathogene (nicht Serogruppe O157), als auch nicht-pathogene *E. coli* und Stämme mit unterschiedlicher Stressresistenz zu repräsentieren. Die *E. coli* Stämme wurden zu Beginn in Rohmilch inokuliert, welche dann für die Produktion von Käse verwendet wurde. Es wurden zwei verschiedene Kontaminationsstufen simuliert, welche einer realistischen (10 cfu/g) oder hohen (1'000 cfu/g) Belastung der Milch durch *E. coli* entsprachen. Für die Produktion des Käses wurden zwei Varianten eines Schweizer Käse Rezepts verwendet, welche sich nur in der unterschiedlichen Brenntemperatur unterschieden (40 oder 46 °C). Wegen Biosicherheits-Bestimmungen wurde das Rezept angepasst, weshalb die Käse in einer untypischen und kleineren Form hergestellt wurden und ein Wachsüberzug anstelle der typischen roten Schmiere verwendet wurde. Während der Produktion und

der 16-wöchigen Reifungszeit wurden von den Käsen daraufhin Proben genommen, um die *E. coli* zu quantifizieren. Ein Anstieg der *E. coli* um etwa $3.5 \log_{10}$ cfu/g wurde von der Rohmilch zum frisch-produzierten Käse beobachtet. Dieser Anstieg wurde einem physikalischen Konzentrationseffekt und dem Wachstum der *E. coli* während der Käseproduktion zugeschrieben. Während der Reifung wurde in allen Käsen eine langsame, kontinuierliche Reduktion der *E. coli* Stämme, mit signifikanten Unterschieden zwischen den Stämmen, beobachtet. Die beiden generischen *E. coli* Stämme wiesen dabei höhere Keimzahlen auf als die drei STEC Stämme. Allerdings wurde nur bei einem der drei STEC Stämme ein signifikant schwächeres Überleben in allen Käsetypen beobachtet. In sechs der 16 Käse, welche mit einer realistischen *E. coli* Kontamination der Milch hergestellt wurden, konnten am Ende der 16-wöchigen Reifungszeit noch mindestens 10 cfu/g STEC gezählt werden. Die Detektion der STEC nach Anreicherung war in beinahe allen Käsen möglich. Diese Studie zeigte, dass die generischen *E. coli* die Käseproduktion und -reifung tendenziell besser überlebten als die STEC Stämme und dass STEC das Potential besitzen, ausgehend von einer realistischen Kontamination der Milch, bis zum Ende der Reifung eines Halbhart-Rohmilchkäses zu überleben.

In **Kapitel 4** wurde die Hitzeresistenz von neun *E. coli* Stämmen - davon vier STEC Stämme - während einer praxisnahen Thermisation untersucht. Da, während der *in vitro* Charakterisierung, sieben *E. coli* Stämme mit einer erhöhten

Hitzeresistenz gefunden wurden, lag es nahe, weitere Untersuchungen bei realitätsnahen Bedingungen in Milch vorzunehmen. Zum Einen können *E. coli* Stämme mit einer erhöhten Hitzeresistenz sowohl die Hitzebehandlung vor dem Käsen als auch den Käsereiprozess selbst potentiell besser überleben und zum Anderen kann sich die Hitzeresistenz in unterschiedlichen Matrices verändern. Eine Thermisation ist die Applikation von Hitze bei tieferen Temperaturen als bei einer Pasteurisation für kurze Zeit in kontinuierlich fließender Milch. Dabei kann die bakterielle Keimzahl reduziert werden, während einige der positiven Eigenschaften der Rohmilch erhalten bleiben. In dieser Studie wurde die Hitzeresistenz von neun *E. coli* Stämmen bei verschiedenen Temperatur-Zeit-Kombinationen untersucht. Dazu wurde eine Versuchspasteurisationsanlage verwendet, um eine typische kommerzielle Anwendung zu repräsentieren. Sechs der neun *E. coli* Stämme zeigten dabei eine vergleichbare Inaktivierung bei 60, 62.5 und 65 °C. Bei den anderen drei Stämmen konnte eine erhöhte Hitzeresistenz beobachtet werden. Die Reduktion aller *E. coli* Stämme war geringer als $2 \log_{10}$ nach 25 s bei 60 oder 62.5 °C. Sechs respektive acht *E. coli* Stämme wurden bei 65 und 67.5 °C um mindestens $5 \log_{10}$ reduziert. Allerdings war die Reduktion bei drei Stämmen nach 25 s bei 65 °C geringer als $2 \log_{10}$. Der Stamm FAM21805 wurde sogar nach 25 s Thermisation bei 67.5 °C immer noch weniger als $1 \log_{10}$ reduziert. Diese Untersuchungen zeigten, dass bei manchen *E. coli* Stämmen Zeit-Temperatur-Kombinationen von mindestens 65 °C notwendig waren, um eine wesentliche

Reduktion der Bakterienzahl während einer Thermisation zu erreichen.

In **Kapitel 5** wurde das Überlebensverhalten von zwei generischen *E. coli* Stämmen während der Produktion und Reifung von Halbhart- und Hartrohmlchkäse untersucht. Die Käse wurden jeweils nach einem typischen Schweizer Käserezept produziert und, im Gegensatz zu dem in Kapitel 3 beschriebenen Überlebensversuch, waren keine Modifikationen durch Biosicherheitsbestimmungen notwendig. Die Grösse und die Form des Käses sowie das Verwenden der Wachsschicht könnten das Überleben der *E. coli* beeinflusst haben, weshalb es wichtig war, das in Kapitel 3 beobachtete Überlebensverhalten mit dem Überleben der *E. coli* in einer realitätsnahen Käseproduktion zu vergleichen. Die zwei *E. coli* Stämme, von denen einer eine erhöhte Hitzeresistenz aufweist, wurden in Milch inokuliert, welche anschliessend zur Käseproduktion verwendet wurde. Während der Produktion des Halbhartrohmlchkäses wurde eine Zunahme der *E. coli* von der Milch zum frischen Käse beobachtet. Danach nahm die Keimzahl kontinuierlich mit einem log-linearen Verlauf ab, wobei die Reduktion zum Einen schneller im Kern als am Rand des Käses stattfand, und zum Anderen die Inaktivierung des hitzeresistenteren *E. coli* Stammes in der Randzone langsamer stattfand als für den zweiten *E. coli* Stamm. Die *E. coli* wurden am Ende der Reifungszeit noch in beträchtlicher Zahl in der Randzone des Halbhartkäses gefunden und wurden, nach Anreicherung, auch im Kern von allen Käsen detektiert.

Die schnellere Reduktion der *E. coli* im Kern des Käses könnte eine Folge des höheren Kohlendioxid-Partialdrucks im Kern sein. Das wäre zudem ein Hinweis darauf, dass die äusserste essbare Zone nahe dem Käserand das bestmögliche Umfeld für das Überleben der *E. coli* in Käse sein könnte. Die *E. coli* Keimzahl stieg während der Hartkäse-Produktion von Milch zum Bruch vor dem Brennen um etwa $1 \log_{10}$ an. Der hitzeresistentere *E. coli* Stamm wurde, während des Brennens des Bruchs, um etwa $0.5 \log_{10}$ reduziert, während der zweite Stamm im Bruch nach dem Brennen nur noch in einem der acht Käse detektiert wurde. Beide *E. coli* Stämme konnten danach in einigen Proben, nach Anreicherung, nachgewiesen werden, einschliesslich der Detektion des hitzeresistenten Stammes in einem der acht Käse am Ende der Reifungszeit. Diese Ergebnisse zeigen das Potential eines hitzeresistenten *E. coli* Stammes, dass er selten auch die Produktion und Reifung eines Hartrohmlchkäses überleben kann.

Während den Käseversuchen wurden Unterschiede im Überlebensverhalten zwischen den fünf *E. coli* Stämmen beobachtet. Deswegen lagen weitere Untersuchungen in Bezug auf die Stressantwort dieser Stämme nahe. Zur Untersuchung der transkriptionellen Induktion der Stressantwortgene mittels Reverse-Transkriptase quantitativer PCR (RT-qPCR) ist die Normalisierung der Daten notwendig und benötigt die Verwendung eines stabil-exprimierten Referenzgens. Deshalb wurden in **Kapitel 6** drei potentielle *E. coli* Referenzgene bezüglich

ihrer Expressionsstabilität während organischem Säure- oder Salzstress evaluiert, um das am stabilsten exprimierte Gen unter den verwendeten Konditionen zu ermitteln. Dazu wurden die fünf *E. coli* Stämme *in vitro* entweder Kontroll- oder Stressbedingungen ausgesetzt, um die Haushaltsgene *cysG*, *hcaT* und *rssA* mittels RT-qPCR zu untersuchen. Dabei zeigte das *rssA* Gen (16S ribosomale RNA in *E. coli*) insgesamt die stabilste Expression, während der Stressexposition und ist deshalb das bevorzugte Gen für die mRNA Expressions-Normalisierung bei den verwendeten Konditionen. Die Expression von *cysG* zeigte deutliche Variationen und die geringste Expressionsstabilität. Beim *hcaT* Gen wurde eine ähnliche Variation zwischen den Stämmen wie für *rssA* gefunden, aber die Expressionsstabilität während der Säure- oder Salz-Stressexposition war geringer als beim *rssA*-Gen.

In **Kapitel 7** wurde die transkriptionelle Induktion von zwei Säure- (*cadA* und *speF*) und fünf Salz- (*kdpA*, *proP*, *proW*, *otsA* und *betA*) Stressantwortgenen während der Stressexposition zu Milchsäure- oder Natriumchlorid-Stress in den fünf *E. coli* Stämmen analysiert, welche zuvor in den Käseversuchen untersucht wurden (Kapitel 3). Die transkriptionelle Induktion der sieben Stressantwortgene wurde mittels RT-qPCR während der Stressexposition relativ zu Kontrollbedingungen ohne Stressapplikation untersucht, um die *E. coli* Stämme miteinander vergleichen zu können. Dadurch können möglicherweise Verbindungen zwischen der Stressgenexpression und

dem Überlebensverhalten der *E. coli* Stämme im Käse hergestellt werden. Die transkriptionelle Induktion während der Milchsäurestress-Exposition war bei vier der fünf *E. coli* Stämme ähnlich, die alle das Lysin-Decarboxylase-Gen *cadA* signifikant induzierten. Beim fünften Stamm wurde gezeigt, dass dieses Gen fehlte. Das zweite Säure-Resistenzgen *speF* wurde von den *E. coli* Stämmen während der Milchsäure-Exposition nicht induziert. Die Salz-Stressantwortgene *proW* und *otsA* wurden während der Natriumchlorid-Stress-Exposition in ähnlicher Weise von allen fünf *E. coli* Stämmen induziert. Bei der transkriptionellen Induktion der Gene *kdpA*, *proP* und *betA* traten hingegen Unterschiede zwischen den Stämmen auf. Ein Stamm induzierte keines dieser drei Stressantwortgene, während vier respektive drei Stämme das *kdpA* sowie das *betA* Gen signifikant induzierten. Das *proP* Gen wurde nur von den beiden generischen *E. coli* Stämme induziert. Die Unterschiede, welche bei der transkriptionellen Induktion der fünf *E. coli* Stämme während der Natriumchlorid-Stress-Exposition beobachtet wurden, stellen eine mögliche Verbindung zu den Überlebensphänotypen, welche während der Käsereiversuche beobachtet wurden, dar. Der STEC-Stamm, welcher das geringste Überleben im Käse aufwies, war der einzige Stamm, welcher das *kdpA* Gen nicht induzierte und zudem sowohl das *proP* als auch das *betA* Gen nicht induzierte. Ansonsten wurde beobachtet, dass die beiden generischen *E. coli* Stämme, welche in Käse eher besser überlebten als die STEC Stämme, die Einzigen waren, welche das *proP* Gen induzierten. Das weist darauf hin, dass eine erhöhte Produktion von kompati-

blen Soluten ein Vorteil für das Überleben der *E. coli* in Käse sein könnte.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit tragen zum Wissen zu den verschiedenen Stressantwortmechanismen in *E. coli* und deren Bedeutung für das Überleben von STEC in Rohmilchkäse bei. Die Stressantwort der *E. coli* Stämme wurde zuerst in verschiedenen *in vitro* Experimenten untersucht, wobei keine gemeinsamen Eigenschaften, der aus Käse isolierten Stämme, gefunden wurden, welche das Überleben in Käse erleichtern könnten. Im Gegenteil wurden zuvor auch Stämme aus Käse isoliert, die stark empfindlich gegen die untersuchten Stressbedingungen waren. Danach wurde das Potential von (nicht O157 Serogruppe) STEC und generischen *E. coli* gezeigt, die Produktion und Reifung eines Halbhartrohmilchkäses zu überleben. Dabei wurden signifikante Unterschiede zwischen den *E. coli* Stämmen beobachtet. Anschliessend wurde die transkriptionelle Induktion von zwei Säure- und fünf Salzstressantwortgenen untersucht. Die Expression der Salzstressantwortgene war dabei zu einem Teil mit dem in Käse beobachteten Überlebensverhalten assoziiert. Schlussendlich weisen die Ergebnisse darauf hin, dass eine verminderte Salzstressantwort, wie sie bei einem der STEC Stämme beobachtet wurde, der Grund für dessen schwächeres Überleben während der Rohmilchkäseproduktion und -reifung sein könnte. Die Hitzestressantwort ist voraussichtlich primär dann entscheidend, wenn die Brenntemperatur höher wird, wie beispielsweise bei der Hartkäseproduktion oder

während einer Thermisation. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die jeweilige Bedeutung der verschiedenen Salz- und Säurestressantwortgene für das Überleben von STEC während der Käseproduktion und -reifung zu analysieren. Zusätzlich wäre auch das Untersuchen weiterer Faktoren, die das Überleben von *E. coli* in Käse beeinflussen können oder von möglichen Modifikationen des Käsereiprozesses, welche das Überleben von *E. coli* erschweren könnten, von Interesse.