

**VOEDSELPATHOGENEN,
NIETS MENSELIJKS IS ZE VREEMD**

door prof.dr. T. Abec



WAGENINGEN UNIVERSITEIT

WAGENINGENUR

Inaugurele rede uitgesproken op 30 november 2006 aan de
Wageningen Universiteit.

Voedselpathogenen, niets menselijks is ze vreemd

Mijnheer de Rector Magnificus, collega's, familie en vrienden, grote en kleine dames en heren,

Inleiding

De komende 45 minuten wil ik u een beeld schetsen van het interessante en uitdagende vakgebied van de Levensmiddelenmicrobiologie. Dit vakgebied richt zich niet alleen op gunstige effecten van micro-organismen, maar onderzoekt ook het gedrag van micro-organismen die ons ziek kunnen maken via de consumptie van voedsel; de zogenaamde voedselpathogenen. In deze rede wil ik met name ingaan op het aspect van de voedselveiligheid, en meer in het bijzonder het gedrag van voedselpathogenen.

Voedselpathogenen is niets menselijks vreemd; ten eerste omdat ze het menselijk lichaam door en door kennen, ze slaan niet alleen hun slag in het maagdarmkanaal, maar kunnen ook terecht komen in andere delen van het menselijk lichaam waaronder verschillende organen; en ten tweede, omdat hun gedrag menselijke trekjes vertoont; ze eten en groeien, ze reizen, ze raken gestresst, ze passen zich aan, ze wonen samen, ze werken samen, ze communiceren met elkaar, ze bespioneren elkaar, ze hebben sex, ze voeren oorlog, en uiteindelijk sterven ze.

Ik zal u proberen duidelijk te maken dat het belangrijk is om een zeer goed inzicht te krijgen in het gedrag van voedselpathogenen om zodoende met de verkregen kennis een

bijdrage te kunnen leveren aan de microbiële voedselveiligheid; een onderwerp dat uitstekend past binnen de missie van deze universiteit.

Mijn rede is opgebouwd uit drie onderdelen. Allereerst zal ik een korte inleiding geven over voedselinfecties en laten zien hoe voedselpathogenen ons ziek maken en hoe ze bij het begin van dit proces de gastheer of gastvrouw voor de gek houden, zodat deze zelf meewerkt aan het infectieproces.

Vervolgens zal ik kort ingaan op recente maatschappelijke en technologische ontwikkelingen in de industrie die van belang zijn voor de voedselveiligheid.

Daarna zal ik ingaan op het onderzoek naar het gedrag van voedselpathogenen en laten zien hoe ze zich wapenen tegen stress tijdens voedselproductie en hoe ze samenwerken om te overleven, en daarbij zal ik tevens aangeven hoe deze kennis kan worden gebruikt voor de productie van veilig voedsel van hoge kwaliteit. Ik zal deze rede besluiten met een dankwoord.

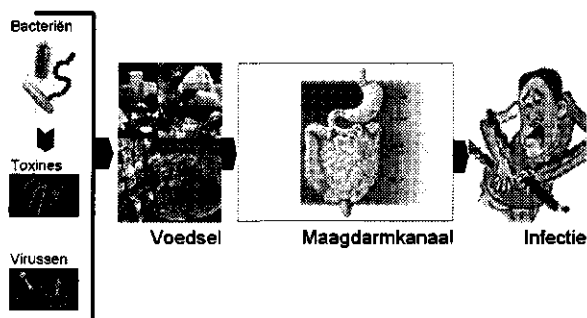
Deel 1 - Voedselpathogenen en voedselveiligheid

Microbiële voedselveiligheid raakt ons allemaal, en is een belangrijk aandachtsgebied van de overheid, van controlerende instanties zoals de Voedsel en Waren Autoriteit (VWA), en van de levensmiddelindustrie, en mag rekenen op een zeer grote aandacht van consumentenorganisaties. Een breed scala aan micro-organismen, waaronder bacteriën en virussen, is verantwoordelijk voor voedselinfecties resulterend in symptomen die variëren van mild, veelal darmklachten, tot zeer ernstig, in sommige gevallen leidend tot de dood.

Niet alleen worden voedselpathogenen blootgesteld aan stress tijdens voedselproductie doordat er bijvoorbeeld een

verhittingsstap plaats vindt, maar ook tijdens de passage van de maag, waar ze worden blootgesteld aan zure condities. Voedselpathogenen moeten dus goed om kunnen gaan met stress om bij een gastheer op bezoek te kunnen gaan.

Microbiële voedselinfecties en -vergiftigingen



Bacteriën kunnen op allerlei manieren in ons voedsel terecht komen, ondermeer via lucht, water, bodem, planten, insecten en dieren, en door besmetting tijdens de productie. De meeste mensen schrijven voedselvergiftigingen toe aan het eten van eieren en vlees, maar uit recent EU-breed onderzoek van de Europese Voedselveiligheid Autoriteit ('European Food Safety Authority') is gebleken dat bij voedselgerelateerde uitbraken veroorzaakt door *Salmonella*, *Campylobacter* en virussen, in 25% van de gevallen groente en fruit de bron was van de infectie. Daarnaast is door verschillende onderzoeksgroepen, waaronder die van prof. Ariena van Bruggen verbonden aan Wageningen Universiteit, aangetoond dat sommige pathogenen ook in het gewas kunnen doordringen.

In Nederland vinden naar schatting een miljoen gevallen van voedselinfecties plaats per jaar, waarbij virussen en bacteriën een gelijk aandeel hebben. Belangrijke pathogenen zijn *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* (*E.coli*), *Listeria* en *Bacillus*. Recentelijk zijn er nog grote uitbraken geweest waarbij met *Salmonella* besmette vleesproducten en boerenkaas waren betrokken. In beide gevallen waren enkele honderden mensen getroffen, in het laatste geval vooral jonge kinderen.

Naast *Salmonella* richt ons onderzoek zich met name op *Listeria monocytogenes* en *Bacillus cereus*, en gedurende de rest van mijn betoog zal ik in meer detail ingaan op deze pathogenen.

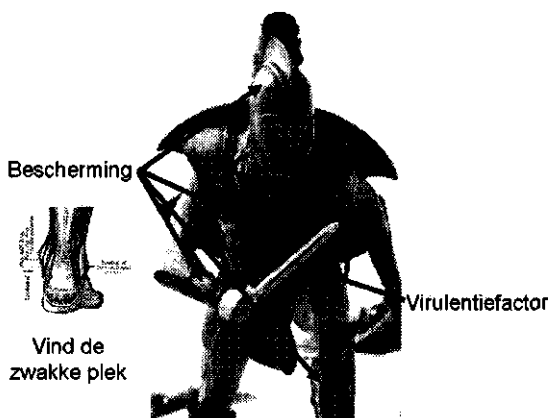
Listeria monocytogenes is een belangrijke pathogeen aangezien deze listeriose, een zeer ernstige infectie, kan veroorzaken bij risicogroepen zoals jonge kinderen, zwangere vrouwen, ouderen en mensen met verminderde weerstand. Deze ziekte kan onder andere leiden tot hersenvliesontsteking met een dodelijke afloop in circa 30% van de gevallen. De consequentie van listeriose bij zwangere vrouwen is vaak een spontane abortus.

B. cereus is de veroorzaker van een groot aantal voedselinfecties in Nederland die veelal worden gekarakteriseerd door milde symptomen zoals overgeven en diarree. Recentelijk zijn ook enkele gevallen van *B. cereus* voedselvergiftiging beschreven waarbij zich ernstige complicaties voordeden, die uiteindelijk zelfs de dood tot gevolg hadden. *Salmonella* is ook betrokken bij een groot aantal infecties welke tot complicaties kunnen leiden in risicogroepen, in het bijzonder jonge kinderen, ouderen en mensen met verminderde weerstand.

Voedselpathogenen

Voedselpathogenen kunnen ons op verschillende manieren ziek maken. Ik zal nu kort de eerste stappen in het proces bespreken.

Ik zal de rol van beschermende factoren en virulentiefactoren in dit proces bespreken door Achilles, een figuur uit de Griekse Mythologie, als model te gebruiken. Achilles speelt de hoofdrol in het eerste grote epos van Homerus, de Ilias. Hij was sterfelijk, maar door zijn moeder onkwetsbaar gemaakt met uitzondering van een klein stukje van zijn lichaam, namelijk zijn hiel waaraan ze hem vasthield toen ze hem onderdompelde in de Styx, een rivier in Hades, de onderwereld. Achilles was een belangrijke strijder in de Trojaanse oorlog, maar zijn hiel werd hem uiteindelijk noodlottig toen deze geraakt werd door een pijl van de held Paris.



Achilles; model voor een pathogeen

Het door Achilles gehanteerde zwaard staat model voor de virulentiefactoren die dienen om de vijand, dat wil zeggen in het

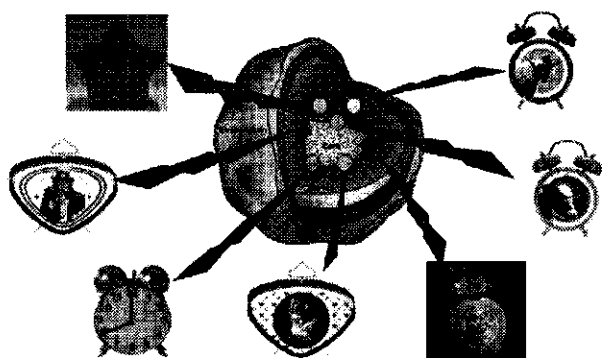
geval van pathogene bacteriën de gastheer, aan te vallen. De achillespees is vernoemd naar Achilles vanwege zijn kwetsbare hiel. Dit facet komt aan de orde in een later deel van mijn re-
de waarin ik een beschrijving geef van de zoektocht naar kwetsbare plekken van voedselpathogenen om ze onschadelijk te kunnen maken.

Voedselpathogenen maken gebruik van virulentiefactoren om de interactie aan te gaan met de gastheer. *Salmonella* kan bij aankomst in het darmkanaal een injectiesysteem activeren waarmee bepaalde signaaleiwitten in de buitenste darmcellen worden gespoten. Vervolgens gaan de darmcellen er actief voor zorgen dat de bacteriën worden opgenomen waarmee de infectie een feit is. Deze ontstekingsreactie wordt gastro-enteritis genoemd en leidt tot diarree en gaat na een aantal dagen meestal vanzelf over. Bij mensen met een minder goed functionerend immuunsysteem kan infectie leiden tot ernstige ziekte (Sansonetti 2004).

L. monocytogenes zorgt er ook voor dat het actief wordt opgenomen door de darmcellen. *Listeria* produceert een beperkt aantal zogenaamde virulentiefactoren die er niet alleen voor zorgen dat de bacteriën worden opgenomen in het darmepitheel, maar ook dat ze in de darmcellen kunnen bewegen en groeien en weer andere darmcellen kunnen infecteren. Via het lymfesysteem en de bloedbaan kunnen andere delen van het lichaam worden bereikt en geïnfecteerd, wat kan resulteren in de eerder genoemde complicaties (Hamon *et al* 2006).

Kenmerkend voor *Bacillus cereus* is dat het organisme behoort tot de zogenaamde sporenvormers. Sporen zijn overlevingscapsules die ontstaan uit zogenaamde moedercellen

onder condities waarbij groei niet meer mogelijk is, bijvoorbeeld door gebrek aan voedsel. Tijdens de sporulatie worden alle componenten van de spore geproduceerd en geassembleerd totdat de spore rijp is, waarna de cel waarin de spore werd gevormd afsterft. Door de speciale structuur is het DNA samen met belangrijke enzymen beschermd tegen extreme stress condities, waaronder uitdroging en hitte. Dergelijke sporen verkeren in een slaaptoestand, maar kunnen na lange tijd nog weer geactiveerd worden door ontwaaksignalen. Hierbij zijn de zogenaamde ontkiemingsreceptoren van groot belang. Deze herkennen de aanwezigheid van voedingsstoffen en maken de sporen wakker zodat deze kunnen uitgroeien tot cellen en zich weer kunnen vermeerderen; *B. cereus* beschikt over zeven verschillende wekkers (Hornstra *et al* 2006). Onder deze omstandigheden kan *B. cereus* toxinen produceren die de mens ziek kunnen maken, resulterend in diarree, braken en lichte koorts (Schoeni and Wong 2005).



Ontkiemingsreceptoren fungeren als wekker

Diarreëtoxinen worden door *B. cereus* cellen in de darm geproduceerd, en dit gebeurt door cellen die de maagpassage hebben overleefd en door ter plekke ontkiemde sporen. Braaktoxine, ook wel cereulide genoemd, wordt in het voedsel zelf geproduceerd en is zeer resistent tegen zuur en eiwitafbrekende enzymen. Het gif blijft dus actief, ook al worden de bacteriën gedood. In de darm aangekomen veroorzaakt het zeer waarschijnlijk via een bepaalde receptor een braakreactie en in extreme gevallen kan het leveruitval veroorzaken (Schoeni and Wong 2005). Cereulide kan de lever uitschakelen doordat het de activiteit van mitochondriën, de energiefabriekjes in eukaryote cellen, kan remmen. Op basis van de activiteit tegen mitochondriën is onlangs een computerondersteunde bioassay ontwikkeld waarbij de beweeglijkheid van varkenssperma wordt geanalyseerd. Cereulide remt de beweeglijkheid van sperma en dit maakt een kwantitatieve bepaling van de concentratie van het gif mogelijk. De activiteit van de spermacellen wordt al stilgelegd bij een concentratie van 20 ng cereulide per ml. Deze methode is daarmee net zo gevoelig als een onlangs ontwikkelde chemische analysemethode. De beschikbare methoden kunnen in de toekomst meer licht werpen op de rol van cereulide en cereulide-producerende stammen in voedselvergiftigingen (Rajković 2006).

Dit overzicht maakt duidelijk dat voedselpathogenen verschillende methoden gebruiken om de interactie, dat wil zeggen de oorlog, met de gastheer aan te gaan.

Deel 2 - Maatschappelijke en industriële ontwikkelingen; impact op voedselveiligheid

Hoewel de kwaliteit en veiligheid van ons voedsel enorm is toegenomen, is er geen reden om achterover te leunen, zoals uit recente uitbraken is gebleken, en dienen we in te spelen op een aantal ontwikkelingen die de microbiële voedselveiligheid kunnen beïnvloeden. Belangrijke factoren zijn de mondialisering van de handel en het daaraan gekoppelde transport, de introductie van nieuwe ingrediënten en levensmiddelen, en de schaalvergroting van de levensmiddelenproductie. Daarnaast speelt de toename van (de grootte van) risicogroepen waaronder ouderen en mensen met verminderde weerstand een belangrijke rol. Zo laat een recent rapport zien, dat in Duitsland het aantal gevallen van infecties veroorzaakt door *L. monocytogenes* sterk is toegenomen in de periode 2001-2005; de grootste toename vond plaats in de groep ouder dan 60 jaar (Eurosurveillance Monthly Releases, 2006, volume 11/issue 6).

Andere factoren zijn veranderingen in levensstijl (verschuiving van de voorkeur naar verse producten) en de introductie van nieuwe, milde conserveringsmethoden en technologieën.

De basis voor de huidige voedselconserveringstechnieken is gelegd door Nicolas Appert, die in 1805 een door Napoleon uitgeschreven prijsvraag won over voedselconservering. Deze innovatieve technoloog wist voedsel lang houdbaar te maken door het in gesloten potten enkele uren te koken. De reden dat Napoleon deze prijsvraag uitschreef was een minder fraaie; hij zocht een manier om zijn troepen over grote afstanden te kunnen voorzien van voedsel met name om Rusland te veroveren.

Heden ten dage streeft de voedingsindustrie vooral naar de productie van gezonde en veilige voeding, daarbij inspeland op wensen van de consument. Deze verlangt 'natuurlijke' producten; een minimale behandeling door de producent, geen (chemische) conserveringsmiddelen, makkelijke bereiding en (microbiologische) veiligheid. Er worden steeds meer voorbewerkte en kant-en-klare voedingsmiddelen aangeboden die koelvers dienen te worden bewaard. In deze gevallen worden de stabiliteit en houdbaarheid verlengd door een combinatie van bacteriegroei-remmende factoren, zogenaamde horden, waaronder een verlaagde pH, verlaagde wateractiviteit en gekoelde opslag. Daarnaast wordt veel aandacht besteed aan de ontwikkeling van milde behandelingsmethoden zoals hoge druk, pulserende elektrische velden en stoominjectie.

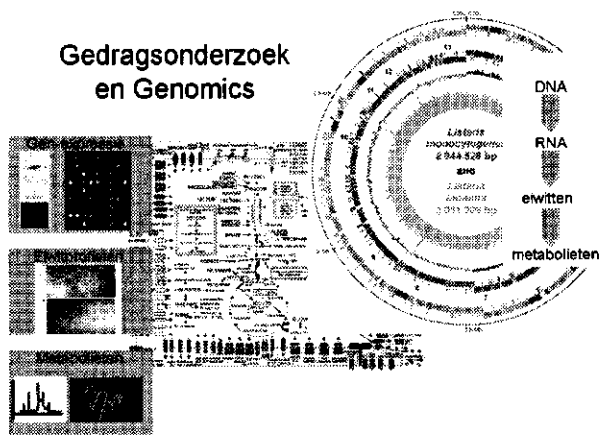
Hoge-drukbehandeling is uitermate geschikt voor het produceren van minimaal bewerkte voedingsmiddelen waarbij smaak, vitamines, en textuur worden gehandhaafd. De gehanteerde milde drukken (tussen 200 en 600 MPa) inactiveren vrijwel alle aanwezige bacteriën, maar eventuele sporen overleven. Dergelijke producten moeten dan ook gekoeld worden bewaard. Ter indicatie, een druk van 1000 MPa kan worden bereikt door een gewicht van 10.000 kg te centreren op 1 cm².

Milde behandelingen hebben met elkaar gemeen dat eventueel aanwezige micro-organismen, inclusief pathogenen, worden blootgesteld aan sublethale condities hetgeen kan resulteren in de inductie van stress resistentiemechanismen. Op deze manier kunnen pathogenen zich wapenen tegen stress. Inzicht in het gedrag van voedselpathogenen is daarom essentieel voor de ontwikkeling van veilige nieuwe con-

serveringsmethoden.

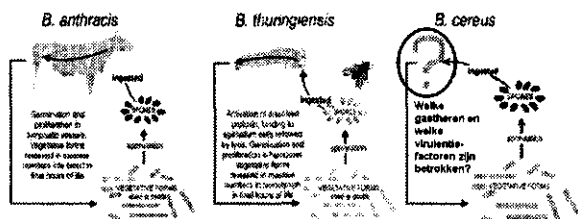
De speurtocht naar de zwakke plek, de achilleshiel van pathogenen, wordt gefaciliteerd door de snelle vooruitgang op het gebied van de genomics (Abee *et al* 2004). Het vakgebied van de genomics en de daarbij ontwikkelde technieken bieden nieuwe, ongekennde mogelijkheden om inzicht te krijgen in de capaciteiten en het gedrag van organismen die in lengte gemeten 100 miljoen keer kleiner zijn dan de mens.

Gedragsonderzoek en Genomics



Genomics omvat het in kaart brengen van genomen (sequentieanalyses van het DNA), het onderzoek naar de werking van genen, en de manier waarop erfelijke eigenschappen zoals vastgelegd in genen, zich via RNA, eiwitten en metabolieten vertalen naar het functioneren van het organisme. Het genotype bepaalt de blauwdruk van het organisme, het vermogen van de bacterie om bepaalde celstructuren, eiwitten en enzymen aan te maken, terwijl het fenotype laat zien hoe de bacterie functioneert onder de verschillende omstan-

digheden. Om optimaal gebruik te kunnen maken van de mogelijkheden die genomics biedt, is efficiënte dataverwerking gekoppeld aan visualisatie van de resultaten essentieel. Duidelijke meerwaarde wordt hierbij verkregen door de inzet van specialisten op dit gebied, de BIO-ITers, oftewel informatietechnologen die de verwerking verzorgen van data verkregen over biologische systemen.



Gastheerspecificiteit van *Bacillus* soorten

Dergelijke informatie kan ook inzicht bieden in de verwantschappen tussen pathogenen en hun gastheren. *B. cereus* bijvoorbeeld, maakt deel uit van een grotere groep bacteriën die gezamenlijk de *Bacillus cereus* groep wordt genoemd. Naast *B. cereus* omvat deze groep ook *Bacillus anthracis*, de veroorzaker van miltvuur in dieren en in de mens, en waarvan de sporen in zogenaamde poederbrieven zijn verstuurd in de periode na 11 september 2001, en *Bacillus thuringiensis* die gifstoffen maakt die dodelijk zijn voor insecten. Deze bacterie wordt dan ook als biopesticide gebruikt bij insectenplagen. Aangezien *B. cereus* stammen zijn geïsoleerd uit insecten, dieren en mensen, is het be-

langrijk om een beter beeld te krijgen van de gastheerspecificiteit en het arsenaal aan virulentiefactoren waarover de verschillende varianten van *B. cereus* mogelijk beschikken (Waterfield *et al* 2004). Hierbij is verder onderzoek naar de rol en functie van plasmiden, mobiele genetische elementen, van groot belang, aangezien is gebleken dat deze binnen de *Bacillus cereus* groep veelal de dragers zijn van de genetische informatie die codeert voor gifstoffen en andere virulentiefactoren (Ivanova *et al* 2003; Rasko *et al* 2004).

Het genomics onderzoek staat in Nederland inmiddels letterlijk en figuurlijk goed op de kaart, gezien het grote aantal 'genomics' centra. Een prominente plaats wordt daarbij ingenomen door het "Wageningen Centre for Food Sciences" (WCFS), dat in de nabije toekomst overgaat in het Top Instituut "Food and Nutrition". Het betreft een unieke alliantie tussen overheid, kennisinstellingen en industrie die zich richt op précompetitief fundamenteel onderzoek ten behoeve van de innovatiekracht van de voedingsindustrie. Eén van de aandachtspunten betreft voedselveiligheid, en het onderzoek aan de overlevingsmechanismen van pathogenen dat hierna wordt besproken is grotendeels uitgevoerd binnen WCFS.

Deel 3 – Overlevingsmechanismen van pathogenen

Door het combineren van microbiële ecologie en fysiologie met op genomics gebaseerde benaderingen kan meer inzicht worden verkregen in de functionele eigenschappen van micro-organismen. In dit deel wil ik een tweetal strategieën bespreken die micro-organismen kunnen aanwenden onder stress condities en waarmee ze zich kunnen wapenen

tegen aanvallen. De ene strategie is gebaseerd op de zogenaamde stressrespons, en de andere strategie op een gecoördineerde respons waarbij cellen samenwerken om een verdedigingssysteem op te bouwen, een zogenaamde biofilm. Een biofilm bestaat uit cellen die in een zelfgeproduceerde slijm laag hechten aan een oppervlak.

De stressrespons – hoe bacteriën zich wapenen tegen aanvallen

De stressrespons is een belangrijk overlevingsmechanisme dat wordt geactiveerd als de omstandigheden in de omgeving van de bacterie veranderen. In het geval van voedsel pathogenen valt te denken aan de blootstelling aan remmende factoren of een combinatie van remmende factoren tijdens voedsel conservering en tijdens blootstelling aan milde behandelingsmethoden zoals hoge druk (Abee and Wouters 1999). Hierbij zijn twee factoren belangrijk, namelijk het aanpassingsvermogen van bacteriën en de heterogeniteit, dat wil zeggen de verschillen tussen bacteriën in een populatie.

Bacteriën moeten snel reageren om (verdere) beschadiging te voorkomen en/of om de aangerichte schade te herstellen. Daartoe zijn bacteriën uitgerust met systemen die continue de condities in en buiten de cel monitoren. Verstoring onder stress-situaties wordt waargenomen door specifieke sensoren die vervolgens regulatoren activeren die op hun beurt de transcriptie, de RNA synthese, activeren van genen of groepen van genen. De geactiveerde genen coderen voor eiwitten en enzymen die zorg dragen voor de verdediging, herstel van schade en het opruimen van beschadigde eiwitten en enzymen. Door tijdig en nauwgezet te registreren, te reageren, te pareren en te repareren, kan de cel weer goed

presteren en triomferen, dat wil zeggen de stressconditie overwinnen. In een dergelijke situatie kan deze getrainde bacterie wellicht ook beter standhouden onder nieuwe stresscondities, en zo kan blootstelling aan de ene stress de bacterie wapenen tegen andere stresscondities.

Zo nemen de aantallen *B. cereus* snel af, als cellen gekweekt bij een temperatuur van 30°C worden blootgesteld aan verhitte bij 50°C. Indien *B. cereus* cellen eerst kort worden blootgesteld aan zure condities (pH 5) of aan een milde verhitte bij 42°C, neemt de overlevingscapaciteit duidelijk toe (Periago et al 2002). Dergelijke informatie kan bijvoorbeeld worden gebruikt om te bepalen welke volgorde en welke combinatie van horden het beste gebruikt kan worden om overleving en groei van bederf-organismen en pathogenen beter te beheersen.

Door de genotypische en fenotypische karakteristieken met elkaar te combineren kan een verder inzicht worden verkregen in de stressrespons van pathogenen. Beschikbare genomen kunnen worden gescreend op de aanwezigheid van sensoren en regulatoren en zo kan bijvoorbeeld een overzicht worden verkregen van zogenaamde twee-componentssystemen. Hierbij wordt een sensor geactiveerd door een bepaalde stress, die vervolgens een regulator activeert, die op zijn beurt de transcriptie activeert van bepaalde genen zodat de cel een specifieke respons op de stress kan uitvoeren.

B. cereus blijkt samen met andere organismen uit de *Bacillus cereus* groep over een zeer groot aantal van dergelijke systemen te beschikken welke het organisme in staat stellen om zeer precies en gedoseerd te reageren op stresscondities. Hierbij valt op dat de meeste van deze systemen zijn gelegen in het celmembraan, dat onderdeel waarmee de bacterie in contact staat met de buitenwereld (Been et al 2006).

Samen met een groot pakket aan andere regulatoren, waaronder sigmafactoren, bezitten bacteriën dus een doorwrocht “zenuwstelsel” dat ze in staat stelt om adequaat in te spelen op snel wisselende omstandigheden.

Op de verdere zoektocht naar de achilleshiel van pathogenen kan verder inzicht in de stressrespons worden verkregen door RNA-profielen te bepalen van cellen die worden blootgesteld aan verschillende voedselrelevante stresscondities, waaronder lage pH, zuren, hoge zout concentraties en verhitting. Hierbij kan tevens de mate van stress worden gevarieerd zodat de groei gedeeltelijk of zelfs geheel kan worden geremd. In dit geval worden de bacteriën dus meer of minder ziek.

Deze opzet vertoont overeenkomsten met die zoals beschreven in een zeer recent artikel in “Science”, waarin een zoektocht naar grootschalige verbanden tussen humane genen en ziektes werd gepresenteerd. In het artikel bespreken de onderzoekers hun zogenaamde ‘connectivity map’, een databank waarin het effect van 167 biologisch actieve moleculen op de genexpressie van een 4-tal menselijke cellijnen is vastgelegd. Aan de hand van deze databank kon de activiteit van een aantal potentiële nieuwe medicijnen worden voorspeld, de werking van sommige medicijnen worden verklaard, en nieuwe werkingsmechanismen worden geïdentificeerd (Lamb *et al* 2006).

Inmiddels zijn met name voor *B. cereus* een groot aantal stress expressieprofielen bepaald die kunnen worden geanalyseerd. We hebben gezien dat verschillende stressen een verschillende respons kunnen geven. Sommige expressiepatronen zijn zeer specifiek, terwijl andere in meer of minde-

re mate overlap laten zien. Binnenkort kunnen DNA array data van andere *B. cereus* stammen worden toegevoegd aan de databank.

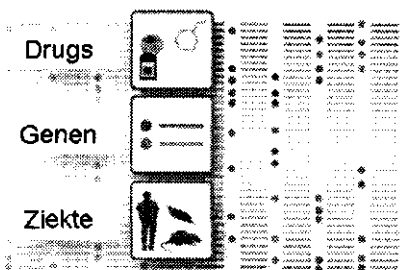
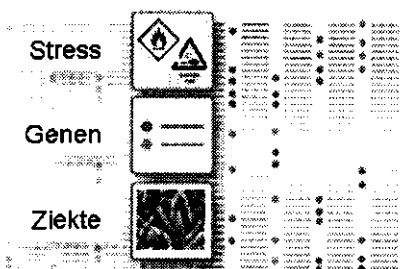


Image adapted from
an illustration by Bang Wong



Zieke bacteriën

'Connectivity Map' voor gestressede pathogenen (naar Lamb *et al* 2006)

Een 'connectivity map' voor gestressede pathogenen zal inzichten kunnen opleveren betreffende stressseffecten, werkingmechanismen, activiteit en specificiteit van (nieuwe) conserveringsmiddelen. De verkregen informatie kan ver-

der worden gebruikt voor de selectie van indicatoren (*bio-markers*) en het voorspellen van stresseffecten.

Blootstelling aan stress kan ook systemen activeren die de mutatiefrequentie, dat wil zeggen het ontstaan van varianten, kunnen beïnvloeden. Recent onderzoek aan genexpressie in *L. monocytogenes* heeft laten zien dat een blootstelling aan hitte resulteert in activatie van een groep van enzymen die onderdeel zijn van de zogenaamde bacteriële SOS respons. De SOS respons wordt geactiveerd als er schade is opgetreden aan het DNA van de cel. De geactiveerde enzymen werken minder nauwkeurig en zo ontstaan er fouten, dat wil zeggen variaties in het RNA, die zich kunnen vertalen in varianten van eiwitten en/of enzymen. In het geval van blootstelling aan stress zou dit kunnen resulteren in de selectie van varianten van pathogenen die beter bestand zijn tegen stress (Tenaillon *et al* 2004).

De SOS respons kan worden geactiveerd door verschillende stressen waaronder Ultra Violet licht, blootstelling aan hitte, hoge druk, oxiderende stoffen, antimicrobiële peptiden en antibiotica (Aertsen and Michiels 2005, Cirz *et al* 2005). Dit zou ook betekenen dat resistentieontwikkeling tegen antibiotica door dezelfde antibiotica kan worden gestimuleerd, zonder dat er sprake is van overdracht van antibiotica-resistentie genen.

Wij willen graag antwoord op de vraag of en in hoeverre de SOS respons bijdraagt aan het ontstaan van stressresistente varianten van pathogenen bij het gebruik van (milde) voedselconserveringsmethoden.

Onderzoek aan hoge druk behandeling van *Listeria* heeft laten zien dat er tijdens de behandeling eerst een snelle inac-

tivatie van bacteriën optreedt gevolgd door een tweede traject waarin deze inactivatie veel trager verloopt. Analyse van dit fenomeen laat zien dat er twee populaties bacteriën zijn, waarvan de ene snel wordt afgedood, terwijl de andere populatie de behandeling veel beter doorstaat. Verder onderzoek toonde aan dat het hier stabiele stressresistente varianten betrof. Opmerkelijk is, dat de varianten kunnen worden ingedeeld in verschillende klassen, afhankelijk van ondermeer hun groeigedrag en de verhoogde resistentie tegen andere voedselrelevante stressen zoals lage pH en hitte. Dit betekent dat sommige varianten resistent zijn geworden tegen een groot aantal stressen zodat ze moeilijker zijn te beheersen en te inactiveren en zodoende de stabiliteit en de veiligheid van de betrokken levensmiddelen nadelig kunnen beïnvloeden.

Eerder onderzoek binnen Wageningen Centre for Food Sciences (WCFS) heeft aangetoond dat een bepaald type stressresistente varianten gemuteerd is in een regulatoreiwit (CtsR). Daardoor vertoont deze variant continue gestresst gedrag, en is zodoende goed voorbereid op blootstelling aan stress condities (Karatzas et al. 2003).

Het toekomstig onderzoek zal zich verder richten op het achterhalen van de stress-resistentiemechanismen en het vaststellen van de ziekmakende eigenschappen van varianten. Daarnaast wordt aandacht besteed aan het kwantificeren en modelleren van deze processen. Een eerste publicatie van onze groep op het gebied van het kwantificeren van de stressresponse is onlangs verschenen in het Amerikaanse tijdschrift 'Applied and Environmental Microbiology' (Den Besten et al, 2006). Een beter begrip van de mechanismen betrokken bij verhoogde stresstolerantie kan een bijdrage

leveren aan de verdere ontwikkeling van veilige milde (combinaties van) conserveringstechnologieën.

Biofilms – hoe bacteriën zich verdedigen door samen te werken

In het eerste deel over de stress respons, heb ik vooral het reactie- en aanpassingsvermogen van bacteriën als overlevingsstrategie besproken, in het tweede deel wil ik met name ingaan op een overlevingsstrategie die gebaseerd is op communicatie en samenwerking, dat wil zeggen onder condities dat bacteriën elkaar zien en door samen te werken voordeel behalen.

Dit brengt mij op een kort intermezzo dat ik wil wijden aan de in 2002 overleden professor Hans Veldkamp die, in het 3^e jaar van mijn biologiestudie aan de Rijksuniversiteit Groningen, mijn nieuwsgierigheid wist te wekken en mijn gedrevenheid wist te activeren waarna ik mij ben gaan specialiseren in de Microbiologie. Standaardvragen die hij stelde waren 'wat ziet zo'n bacterie' en 'wat heeft zo'n bacterie eraan', en soms ook 'wat vliegt daar?', uit het vaam kijkend tijdens een practicum of mondeling examen, want hij wist ook veel van vogels.

Als je dan kijkt wat daar in de Spaanse Pyreneeën vliegt, zie je als je heel goed oplet, soms een grote gier voor een bergwand zeven. Het is geen vale gier, want die werkt bij voorkeur samen en nestelt in groepen. Het is een zeer zeldzame lammergier die beenmerg als voornaamste voedsel gebruikt, waartoe hij de botten van dode dieren breekt door ze van grote hoogte te laten vallen. In Spanje wordt hij dan ook 'Quebrantahuesos' ofwel bottenbreker genoemd.

Motto: Stel de goede vragen en blijft alert om zodoende geen mooie dingen te missen.

Terugkomend op wat zo'n bacterie ziet, zijn dat vooral andere bacteriën, vooral als het gaat om biofilms. Wat zo'n bacterie daaraan heeft, zal ik u duidelijk maken in de rest van mijn betoog.

Veel bacteriën kunnen zich prima aan oppervlakken hechten en daar zogenaamde biofilms vormen. Dergelijke biofilms bestaan uit cellen in een matrix, een soort slijmlaag, die is opgebouwd uit lange ketens van suikers waarvan sommige vrijwel identiek zijn aan de plakmiddelen in behanglijm. Biofilms vind je eigenlijk overal; op scheepswanden, op medische implantaten, in drinkwaterleidingen, en op tanden, waarbij tandplak zich kan ontwikkelen indien er niet goed wordt gepoetst.

Vandaag wil ik het hebben over biofilms in de voedingsindustrie. De vorming van biofilms in productielijnen kan grote economische schade veroorzaken en de voedselkwaliteit en -veiligheid nadelig beïnvloeden. Omdat bacteriën kunnen loslaten uit een biofilm kan herbesmetting van voedsel plaatsvinden met als gevolg verhoogde kans op microbiel bederf en in het geval van pathogenen, een verhoogde kans op voedselinfecties. Dit loslaten uit de biofilm kan gebeuren door de kracht van de langstromende vloeistof en/of door mechanismen geactiveerd door de bacteriën zelf, waaronder de productie van oppervlakte-actieve stoffen die de bacteriën vervolgens losweken uit de slijmlaag.

Ons onderzoek aan biofilms richt zich op de karakterisering van de onderliggende mechanismen van dit proces.

Gecombineerd met de eerder genoemde genomics aanpak, kan de constructie en karakterisering van mutanten die bepaalde eigenschappen missen, informatie opleveren over de rol van bepaalde functies en processen in de vorming van biofilms.

Zo is gebleken dat *B. cereus* biofilms kan ontwikkelen op roestvrij staal, het materiaal dat bij voorkeur in de industrie wordt toegepast in leidingen en in apparatuur. Vervolgens heeft analyse van een reeks mutanten laten zien dat het zwemvermogen, waarbij de bacterie wordt voortgestuwd door flagellen die functioneren als een soort buitenboordmotor, de biofilmvorming beïnvloedt. Een mutant die geen flagellen kan maken en niet kan zwemmen, kan ook geen biofilm meer vormen. Er zijn verschillende *B. cereus* mutanten beschikbaar die nog verder moeten worden onderzocht, en die een nieuw licht kunnen werpen op belangrijke mechanismen in het proces van biofilmvorming.

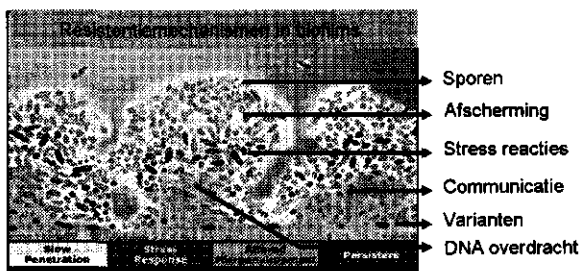
Naast *B. cereus*, kunnen ook andere voedselpathogenen zoals *L. monocytogenes* en *Salmonella* soorten worden betrokken in het onderzoek. Ook zal de vorming van zogenaamde gemengde biofilms, waarbij meerdere soorten organismen een rol spelen, worden geanalyseerd. Hierbij zal aandacht worden besteed aan de rol van communicatie tussen bacteriën van dezelfde soort en de communicatie tussen bacteriën van verschillende soorten in het biofilmvormingsproces.

Bacteriën kunnen een grote verscheidenheid aan signaalstoffen produceren welke alleen door de eigen soort worden herkend, maar er zijn inmiddels ook een groot aantal bacteriesoorten bekend die de signaalstof AI-2 produceren, die door al deze soorten wordt herkend. AI-2 wordt geprodu-

ceerd door het enzym LuxS dat in al deze bacteriën aanwezig is. Daarnaast zijn er bacteriën die geen AI-2 produceren, maar die deze signaalstof wel kunnen opnemen in hun cellen; zo bespioneren ze in feite hun burens en verstoren ze de communicatie.

Bacteriën kunnen dus twee talen spreken, één voor communicatie binnen de soort en één voor communicatie tussen soorten. Deze communicatie zorgt ervoor dat bacteriën verschillende processen gaan uitvoeren die het gedrag aan en op oppervlakken beïnvloeden (Parsek and Greenberg 2005; Kolter and Greenberg 2006). Zo is zeer onlangs aangetoond, dat AI-2 een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van biofilm-achtige structuren door de sporenvormende bacterie *Bacillus subtilis* (Lombardi *et al* 2006). Dankzij de productie van AI-2 kan deze bacterie structuren bouwen waarbij qua aantal net zoveel cellen zijn betrokken als dat er mensen op aarde wonen, en de bereikte hoogte is te vergelijken met die van de hoogste berg op aarde, de Mount Everest, indien mensen in plaats van bacteriën dit bouwwerk hadden gevormd. Het is daarom zeer interessant om uit te zoeken of en hoe soortspecifieke signaalstoffen en stoffen zoals AI-2 de biofilmvorming beïnvloeden in gemengde culturen waarbij meerdere bacteriesoorten betrokken zijn.

In het onderzoek zullen ondermeer de volgende parameters worden geanalyseerd: de efficiëntie van biofilmvorming, de samenstelling van de (s)lijm laag en de biofilm, de resistentiemechanismen, en in het geval van *B. cereus* ook de productie van sporen en toxinen.



Het is duidelijk dat samenwerking zorgt voor verhoogde resistentie van cellen in biofilms. Naast afscherming en het wegvangen van bijvoorbeeld desinfectiemiddelen, kunnen stressresistente sporen en varianten er voor zorgen dat een biofilm blijft gehandhaafd, die zodoende een blijvende, met andere woorden, chronische bron van besmetting kan vormen in de productielijn.

Bij het ontstaan van stressresistente varianten kan DNA overdracht een belangrijke rol spelen. Overdracht van genetische informatie kan plaatsvinden door opname van vrij DNA, door opname van plasmiden, door bacteriofagen en door conjugatie, ook wel bacteriesex genoemd, waarbij grote stukken DNA via zogenaamde sexpili worden overgebracht van de ene naar de andere bacterie. Deze nieuw verkregen eigenschappen kunnen een bijdrage leveren aan het overleven en eventueel domineren in een biofilm.

Dat biofilms mogelijk een rol spelen in het ontstaan van voedselinfecties mag blijken uit het volgende voorbeeld, waarin boter besmet met *L. monocytogenes* een grote uitbraak veroorzaakte in een ziekenhuis in Finland. Hierbij

werd *Listeria* aangetroffen in de productielijn en met name in een aantal verpakkingsmachines. De geïsoleerde bacterie bleek identiek te zijn aan een drie jaar eerder geïsoleerde bacterie hetgeen kan duiden op een chronische besmetting van de productielijn met deze specifieke bacterie. Een dergelijke situatie vertoont parallellen met die in de medische wereld waar steeds meer informatie wordt verkregen die laat zien dat biofilms een bron kunnen zijn van chronische infecties. Zo is onlangs aangetoond dat bepaalde pathogenen biofilms kunnen vormen in het middenoor, welke de bron vormen voor steeds terugkerende oorontstekingen bij patiënten met een verminderde weerstand. Het is zeer wel mogelijk dat speciale varianten, de zogenaamde 'small colony variants' (SCVs) hierbij een rol spelen. Dergelijke varianten groeien slechts langzaam en vormen zodoende kleine kolonies op voedingsplaten. Dergelijke varianten zijn beschreven voor een groot aantal bacteriesoorten waaronder *Staphylococcus aureus*; de eerste beschrijving dateert van 1910 en betrof SCVs van *Salmonella*. Opvallend is, dat deze varianten een verhoogde resistentie tegen antibiotica bezitten en een verhoogde virulentie vertonen, dat wil zeggen een verhoogde invasiecapaciteit om de gastheer binnen te dringen. Door hun langzame groei en afwijkend gedrag zijn ze tevens moeilijk te detecteren (Proctor *et al* 2006).

Identificatie en karakterisering van uit biofilms geïsoleerde varianten kan licht werpen op mogelijke oorzaken van chronische besmetting van productielijnen in de voedingsindustrie. De verkregen informatie kan leiden tot een verbeterde aanpak van de biofilm problematiek.

Ik hoop u aan de hand van mijn betoog te hebben duidelijk gemaakt dat niets menselijks voedselpathogenen

vreemd is. Daarnaast zijn verschillende fenomenen die ik heb besproken ook terug te vinden in thema's van boeken en films. Om al deze fenomenen echt te bestuderen zal men zich toch moeten storten in de fascinerende en uitdagende wereld van de micro-organismen.

Dankwoord

Ik wil deze rede besluiten met een woord van dank.

In de eerste plaats dank ik de Raad van Bestuur, het College voor Promoties en de leden van de toetsingscommissie Persoonlijke hoogleraren voor het in mij gestelde vertrouwen.

Hooggeleerde Konings, beste Wil, ik wil je bedanken voor je promotor- en mentorschap en voor alle wijze woorden. Als jij mij destijds niet als langharige microbiële ecooloog had binnengehaald op een promotieplaats in de Moleculaire Microbiologie groep had mijn leven er heel anders uit gezien.

Hooggeleerde Rombouts, beste Frans, het was voor deze Groninger wel even wennen in het Wageningse, maar jouw support en de ruimte die je me hebt gegeven, hebben er voor gezorgd dat ik me zowel op het wetenschappelijke als op het persoonlijke vlak heb kunnen ontwikkelen; daarvoor mijn grote dank.

Hooggeleerde de Vos, beste Willem, je bent een man met visie en een uitstekend manager, namelijk een manager die zijn mensen laat excelleren en ze daarna los laat. In mijn tijd

als projectleider bij WCFS heb ik veel van jou geleerd.

Graag wil ik alle studenten bedanken die een afstudeervak volgen of hebben gevolgd in onze groep, en zodoende hebben bijgedragen aan het onderzoek van menige aio en postdoc. Als coördinator van de MSc cursussen 'Advanced Food Microbiology' en 'Food Safety', en als medebegeleider bij afstudeervakken maak ik veel studenten van dichtbij mee. Aan Wageningen Universiteit studeren mensen van 100 verschillende nationaliteiten, en ik wil aan de hand van Georgios Nikitas en George Abouagye deze groep in het voetlicht zetten, om op deze manier te illustreren waar je zoal terecht kunt komen, en om aan te geven dat ik veel bewondering heb voor de gedrevenheid en ondernemingszin van onze studenten. George is na zijn studie aan de slag gegaan als aio in Dublin (Ierland), en Georgios is na zijn studie aan de slag gegaan als aio bij het Pasteur Instituut te Parijs (Frankrijk), voorwaar een zeer goed resultaat.

Collega's van de leerstoelgroep Levensmiddelenmicrobiologie, Zoals onze nieuwe leerstoelhouder Marcel Zwietering onlangs opmerkte, pakken wij met zijn allen het hele gebied van de Levensmiddelenmicrobiologie van A tot Z aan, waarbij de samenbundeling van expertises als drijvende kracht fungeert. Ik wil jullie allemaal bedanken voor de goede samenwerking.

Verder dank ik alle oud-aio's en postdocs voor hun bijdragen aan het onderzoek en het onderwijs en de 13 reeds afgeleverde proefschriften waar ik als (co)promotor heb mogen bijdragen.

De huidige analisten, aio's, postdocs en overige weten-

schappers dank ik voor hun goede samenwerking en ik wens alle aio's veel succes met de afronding van hun promotie. Ik wil met name Dr. Roy Moezelaar bedanken voor zijn inzet als WCFS projectleider 'Food Safety and Preservation', en ik hoop de goede samenwerking in de toekomst voort te zetten.

Dear Colin, great that you and Dymphna have come to participate in this event. I am looking forward to prolong our scientific cooperation and our friendship.

Tot slot familie en vrienden,
Gelske, Hannah, Jarik en Tymen,
IK HOU VAN JULLIE.

Ik dank u voor uw aandacht.
Ik heb gezegd.

Referenties

Abee, T., van Schaik, W., Siezen, R.J. (2004) Impact of genomics on microbial food safety. Trends in Biotechnology 22, 265-269

Abee, T., Wouters, J.A. (1999). Microbial stress response in minimal processing. Int. J. Food Microbiol. 50, 65-91

Aertsen, A., Michiels, C.W. (2005) Mrr instigates the SOS response after high pressure stress in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 58, 1381-1391

Been, de M., Francke, C., Moezelaar, R., Abee, T., Siezen, R.J. (2006) Comparative analysis of two-component signal transduction systems of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. Microbiology 152, 3035-3048

Besten, den, H. M.W., Mataragas, M., Moezelaar, R., Abee, T., Zwietering, M.H. (2006) Quantification of the Effects of Salt Stress and Physiological State on Thermotolerance of *Bacillus cereus* ATCC 10987 and ATCC 14579. Appl. and Environ. Microbiol. 72, 5884-5894

Cirz, R.T., Chin, J.K., de Crécy-Lagond, V., Craig, W.A., Romesberg, F.E. (2005) Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. PLoS Biol. 3, 1024-1033

Hamon, M., Bierne, H., Cossart, P. (2006) *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. Nature Reviews Microbiology 4, 423-434

Hornstra, L.M., Vries, Y.P., Wells-Bennik, M.H.J., de Vos, W.M., Abee, T. (2006) Characterization of germination receptors in *Bacillus cereus* ATCC 14579. Appl. Environ. Microbiol. 72, 44-53

Ivanova *et al.* (2003). Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. 2003. Nature 423, 87-91

Karatzas, K.A.G., Wouters, J.A., Gahan, C.G.M., Hill, C., Abee, T., Bennik, M.H.J. (2003) The CtsR regulator of *Listeria monocytogenes* contains a variant glycine repeat region that affects piezotolerance, stress resistance, motility and virulence. *Mol. Microbiol.* 49,1227-1238

Kolter, R., Greenberg, E.P. (2006) The superficial life of microbes. *Nature* 441, 300-302

Lamb, J. et al. (2006) The connectivity map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes and disease. *Science* 313, 1929-1935

Lombardi, E., Rovotto, A.J., Arabolaza, A.L., Grau, R.R. (2006) A LuxS-dependent cell-to-cell language regulates social behavior and development in *Bacillus subtilis*. *J. bacteriol.* 188, 4442-4452

Parsek, M.R., Greenberg, E.P. (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology* 13, 27-33

Periago, P.M., van Schaik, W., Abee, T., Wouters, J.A. (2002) Identification of Proteins Involved in the Heat Stress Response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3486-3495

Proctor, R., von Eiff, C., Kahl, B.C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M., Peters, G. (2006) Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature Reviews Microbiology* 4, 295-305

Rajković, A. (2006) Biologische en immuno-moleculaire methoden voor monitoring van het emetisch toxine van *Bacillus cereus* en het enterotoxine van *Staphylococcus aureus*. (Engelstalig). Universiteit van Gent, België. ISBN 90-5989-125-2

Rasko et al. (2004). The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1. *Nucleic Acids Research* 3, 977-988

Sansonetti, P.J. 2004. War and peace at mucosal surfaces. *Nature Reviews Immunology* 4, 953-964

Schoeni, J.L., Wong A.C.L. (2005) *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J. Food Protection* 68, 636-648.

Tenaillon, O., Denamur, E., Matic, I. (2004) Evolutionary significance of stress-induced mutagenesis in bacteria. *Trends in Microbiology* 12, 264-270

Waterfield, N.R., Wren, B.W., French-Constant, R.H. (2004). Invertebrates as a source of emerging human pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 2, 833-841

Websites

<http://nl.wikipedia.org/wiki/Achilles>

<http://nl.wikipedia.org/wiki/Middenoorontsteking>