

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer

Angefertigt am Lehrstuhl für Tierhygiene
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
der Technischen Universität München
(Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Johann Bauer)

Untersuchungen zur Rekonstruktion der ursprünglichen Pilzflora
hitzebehandelter Lebensmittel mittels qPCR und PCR-SSCP

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Samart Dorn-In
aus Mahasarakham (Thailand)

München 2012

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Märtlbauer

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Rinder

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
II	LITERATURÜBERSICHT	3
1	Pilze in Fleisch und Fleischwaren	3
1.1	Rohes Fleisch	7
1.2	Hackfleisch.....	7
1.3	Gefrorenes Fleisch.....	8
1.4	Fleischprodukte	8
2	Kontaminationsquellen.....	9
3	Mykotoxine bildende Pilze in Lebensmitteln tierischen Ursprungs....	10
4	Nachweis und Quantifizierung von Pilzen	12
4.1	Kulturelles Nachweisverfahren	12
4.2	Grenzwert für kontaminierende Pilze in Fleischwaren	13
4.3	Nachweis der pilzlichen Biomasse.....	14
4.4	Polymerase Chain Reaction	14
4.5	DNA-Extraktionsverfahren für Pilze	16
4.6	Primer zur Amplifizierung von Pilz-DNA	17
III	MATERIAL UND METHODEN	19
1	Materialien und technische Geräte.....	19
1.1	Verwendete technische Geräte	19
1.2	Chemikalien	20
1.3	Verbrauchsmaterialien.	22
1.4	Reagenzien und Herstellung von Gebrauchslösungen	23
1.5	Test-Primer.....	24
1.6	Design des Primers ITS5.8R	27
1.7	Proben zur Validierung	29
1.7.1	Pilze aus Reinkultur	29
1.7.2	Gewürze	30
1.7.3	Fleisch und Fleischprodukte.....	31
2	Methoden.....	33
2.1	Kulturelles Nachweisverfahren	33

2.1.1	Pilz-Kulturen aus Fleischproben	33
2.1.2	Pilzkulturen aus Reinkultur und KbE-Bestimmung.....	34
2.2	Behandlung der Proben zur Validierung der Methode.....	35
2.2.1	Erhitzung von Fleischproben	35
2.2.2	Verderb von Fleischproben	36
2.2.3	Bestrahlung von Fleischproben	36
2.2.4	Künstliche Kontaminierung von Fleischproben mit Pilzsporen	37
2.3	Molekularbiologische Methoden	37
2.3.1	DNA-Extraktionsmethoden.....	37
2.3.2	PCR (Polymerase Chain Reaction)	42
2.3.3	SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)	42
2.3.4	Agarosegelelektrophorese	44
2.3.5	Aufreinigung der DNA aus Agarosegel	44
2.3.6	Zweite PCR für die gereinigte DNA aus Agarosegel	45
2.3.7	Aufreinigung der PCR-Produkte	45
2.3.8	Quantifizierung der DNA Konzentration	46
2.3.9	Lambda-Exonuclease-Verdau	47
2.3.10	Aufreinigung der einzelsträngigen DNA	47
2.3.11	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
2.3.12	Silbernitratfärbung	49
2.3.13	Elution der DNA aus dem Polyacrylamidgel	50
2.3.14	Ablauf der PCR-SSCP-Methode	51
2.3.15	Real-Time-PCR (qPCR) mit SYBR-Green-I	52
2.3.16	Untersuchung der Korrelation von per Kultur ermittelter KbE-Anzahl und den mittels qPCR gemessenen CP-Werten	53
IV	ERGEBNISSE	55
1	Auswahl der DNA-Extraktionsmethode	55
2	Überprüfung von Primerpaaren und Primerauswahl.....	57
2.1	PCR-Amplifikation im Thermocycler.....	57
2.2	Auftrennung von Pilz-DNA im SSCP-Gel.....	60
3	Entwicklung quantitativer Standards für die qPCR	63
3.1	Vorversuche	63
3.2	Hauptversuch.....	65

4	Quantifizierung pflanzlicher DNA	68
5	Optimierung der Methoden	69
5.1	qPCR	69
5.1.1	Aufbereitung des Probenmaterials	69
5.2	PCR-SSCP.....	71
5.2.1	Annealing-Temperatur	71
5.2.2	Vorbereitung des Probenmaterials	72
6	Validierung der Methoden	74
6.1	Ergebnisse der qPCR.....	74
6.1.1	Kulturell bestimmte Keimgehalte vs. qPCR-Werte	74
6.1.2	Einfluss der thermischen Behandlung auf den quantitativen Nachweis von Pilzen	76
6.2	PCR-SSCP-Ergebnisse.....	80
6.2.1	Frisches vs. hitzebehandeltes Fleisch.....	80
6.2.2	Frisches vs. verdorbenes Fleisch.....	81
7	Untersuchung der Feldproben	83
7.1	Ergebnisse der qPCR.....	83
7.2	Ergebnisse der PCR-SSCP-Analyse	85
7.2.1	Sequenzierungsergebnisse der DNA-Banden	87
7.2.2	Orientierende Daten zur Prävalenz von Pilzen in Feldproben	90
V	DISKUSSION	94
1	DNA-Extraktionsmethode.....	94
2	Primerauswahl.....	96
3	Optimierung der qPCR	98
4	Standard-Spezies für die qPCR	100
5	Optimierung der Annealing-Temperatur	101
6	Validierung der Methode.....	102
6.1	Fleisch, Fleischsuspension und KbE-Anzahl.....	102
6.2	Frisches vs. erhitztes Fleisch, naive vs. erhitzte Sporen,	103
6.3	Frisches vs. verdorbenes Fleisch.....	104
7	Feldproben	106

7.1	Pilz-DNA-Quantifizierung mittels qPCR.....	106
7.2	PCR-SSCP und Sequenzierung.....	108
8	Schlussfolgerungen.....	111
VI	ZUSAMMENFASSUNG	112
VII	SUMMARY.....	114
VIII	LITERATURVERZEICHNIS	116
IX	ANHANG	134
X	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	155
XI	TABELLENVERZEICHNIS	158

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent	DSM/DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
%iger	Prozentiger	<i>E.</i>	<i>Eurotium</i>
%igem	Prozentigem	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
°C	Grad Celsius	<i>F.</i>	<i>Fusarium</i>
µl	Mikroliter	FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
µM	Mikromolar	Forw.	Forward
&	und	g	Gramm
γ	Gamma	ggf.	Gegebenenfalls
λ	Lambda	H ₂ O	chemische Summenformel von Wasser
~	circa	h	Stunde
Δ	Delta : Symbol für die Differenz	Hz	Hertz (Einheit für Frequenz)
x g	Times Gravity (Relative Centrifugal Force: RCF)	Iden.	Identität
<i>A.</i>	<i>Aspergillus</i>	IE	International Einheit (= International Unit: IU)
AgNO ₃	Silbernitrat	IGS	Intergenic Spacer
<i>Alt.</i>	<i>Alternaria</i>	ITS	Internal Transcribed Spacer
APS	Ammonium Persulfat	KbE	Kolonie bildende Einheit
Art.	Artikel	kg	Kilogramm
a _w	Wasseraktivität	kGy	Kilogray
bidest.	bidestiliert	l	Liter
bp	Basenpaare	log	Logarithmus
bzw.	beziehungsweise	LSU	Large Subunit-Coding Sequence
<i>C.</i>	<i>Candida</i>	<i>M.</i>	<i>Mucor</i>
ca.	circa	M	Molar
CFU	Colony Forming Unit	mA	Milliampere
<i>Cl.</i>	<i>Cladosporium</i>	mAU	Milli-absorbance unit
CP	Crossing-Point	MDE [®]	Mutation Detection Enhancement (Lösung: enthält 2X Acrylamid)
d. h.	das heißt		
dest.	destilliert		
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)		
DNA-Ext.	DNA-Extraktion		
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphate		

mg	Milligram	S	Svedberg Unit (Sedimentationskoeffizient) für Ribosomen z. B. 18S rDNA, 28S rDNA von Pilzen
MgCl ₂	Magnesium Chlorid	S.	<i>Saccharomyces</i>
min	Minute	SAB	Sabouraud Dextrose Agar
ml	Milliliter	SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfate)
mM	Millimolar	sec	Sekunde
MW	Mittelwert	Seq.	Sequenz
<i>n</i>	Probenanzahl	sp.	Spezies (singular)
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat	spp.	Spezies (plural)
Na ₂ EDTA	Dinatrium- Ethylendiamintetraacetat	SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
NaCl	Natriumchlorid	SSU	Small Subunit-Coding Sequence
NaOH	Natriumhydroxid	Std	Standard
NCBI	National Center for Biotechnology Information	SYBR- Green-I	ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff
neg.	Negativ	Ta	Annealing-Temperatur
ng	Nanogramm	TBE Puffer	Tris-Borate-EDTA-Puffer
nm	Nanometer	TE Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Nr.	Nummer	TEMED	Tetraethylethylenediamine
<i>P.</i>	<i>Penicillium</i>	Temp.	Temperatur
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered Saline)	U	Units
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)	u. a.	unter anderem
pH	potentia hydrogenii	UV	Ultraviolettstrahlung
Pr.	Probe	V	Volt
qPCR	Quantitative PCR	vgl.	vergleiche
<i>r</i>	Correlation coefficient	vs.	versus
rDNA	Ribosomale DNA	W	Watt
Rev.	Reverse	Y.	<i>Yarrowia</i>
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)	z. B.	zum Beispiel

I EINLEITUNG

Der Verzehr von Fleisch und Fleischprodukten nimmt stetig zu. Für den Zeitraum von 2002 bis 2010 prognostizierte die FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) weltweit ein Wachstum von Produktion und Verbrauch von jährlich 2,2 %. Ebenfalls nach Erhebungen der FAO ist der durchschnittliche jährliche pro-Kopf-Verbrauch weltweit von 24 kg (1966) über 36 kg (1999) auf 41 kg (2005) gestiegen, bis 2050 werden 52 kg prognostiziert (FAO, 2010). Die Frage nach der Sicherheit dieser Produkte erfährt zunehmende Aufmerksamkeit: sowohl die Frage nach der Kontaminierung durch chemische Substanzen als auch die nach der Belastung durch Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze und Viren. Um die Vermehrung von Mikroorganismen zu unterbinden und das Lebensmittel zu konservieren werden manche Produkte erhitzt, chemisch behandelt oder bestrahlt.

Die traditionelle Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von Mikroorganismen ist der kulturelle Nachweis. Diese Methode ist geeignet, sofern die Mikroorganismen nicht inaktiviert sind. Wird jedoch mikrobiell verdorbenes Fleisch als Ausgangsprodukt zur Herstellung hitzebehandelter Fleischwaren verwendet, so ist dies mit kulturellen Methoden kaum nachweisbar. Die meisten vegetativen Bakterien sowie Pilzhyphen und Pilzsporen sind so hitzeempfindlich, dass sie bei der Pasteurisation mit 70-80 °C inaktiviert werden (Samson et al., 2000). Auch wenn die inaktivierten Mikroorganismen selbst nicht gesundheitsschädlich sind, ist die Verwendung von verdorbenem Fleisch nach § 3 der Lebensmittelhygieneverordnung verboten (LMHV, 2010). Außerdem verbindet sich mit dem Vorkommen inaktivierter Mikroorganismen das Risiko einer Kontaminierung durch hitzestabile mikrobielle Stoffwechselprodukte, z. B. Mykotoxine. Solche Toxine können Herstellungsprozess (Bullerman und Bianchini, 2007) und Hitzebehandlung wie Pasteurisierung oder Sterilisierung (Samson et al., 2000) intakt oder nur in Teilen abgebaut überstehen und in Einzelfällen zu Gesundheitsschäden führen. Wegen dieser giftigen Stoffwechselprodukte wird die Kontaminierung von Lebensmitteln durch Pilze seit Jahrzehnten erforscht (Filtenborg et al., 1996). Außerdem wurden weltweit standardisierte Kontrollen zur entsprechenden Überwachung von Lebensmitteln im Handel eingeführt (Edwards et al., 2002).

Vor diesem Hintergrund sind Untersuchungsmethoden gefragt, die auch inaktivierte Mikroorganismen in hitzebehandelten Produkten nachweisen können. Ziel dieses Forschungsvorhabens war es, ein molekularbiologisches Verfahren zum Nachweis, zur Identifizierung und zur Quantifizierung von inaktivierten Pilzen in hitzebehandelten Lebensmitteln tierischen Ursprungs zu entwickeln.

Die „Polymerase-Kettenreaktion“ (PCR) ermöglicht den Nachweis mikrobieller DNA-Fragmente und hat sich als eine der effektivsten Methoden zum Nachweis und – in Form der Real-Time-PCR – auch zur Quantifizierung von DNA bewährt. Die SSCP-Methode (Single Strand Conformation Polymorphism) und die Sequenzierung der nachgewiesenen DNA ermöglichen die Identifizierung der Pilze.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Pilze in Fleisch und Fleischwaren

Studien thematisieren seltener die Kontaminierung von Fleisch durch Pilze als jene durch Bakterien. Das mag unter anderem daran liegen, dass Bakterien bei normalen Bedingungen die Pilze immer dominieren. Nur unter Bedingungen, die das Wachstum der Bakterien beschränken, können Pilze besser wachsen, z. B. bei Temperaturen unter 0 °C, einem pH-Wert unter 5 oder wenn das Fleisch außen sehr trocken ist (Deak und Beuchat, 1996; Gill und Lowry, 1982).

Die Untersuchung von Fleisch und Fleischwaren auf Kontamination durch Pilze erfolgte bislang mit kulturellen Methoden, die aber nur lebende Pilze nachweisen können. Deshalb beziehen sich die meisten veröffentlichten Untersuchungsergebnisse auf Fleischwaren, die nicht thermisch behandelt oder die erst nach der Herstellung kontaminiert wurden. Doch lässt sich aus der Literatur eine Übersicht darüber gewinnen, welche Pilzarten häufig in Fleisch und Fleischwaren vorkommen (**Tabelle 1** und **Tabelle 2**).

Tabelle 1: Schimmelpilz-Spezies in Fleisch und Fleischwaren

Schimmelpilz-Spezies	Produkte	Literatur
<i>Absidia</i> spp.	Würste	Matos et al., 2007
<i>Acremonium</i> spp.	Fleisch, gefrorenes Fleisch	Lowry & Gill, 1984; Mižáková et al., 2002; Weidenbörner, 1999
<i>Alternaria alternata</i>	Fleisch, Hackfleisch, gefrorenes Fleisch, Schinken, Geflügelfleisch	Ismail & Zaky, 1999; Mahmoud et al., 2001; Reiß, 1986; Weidenbörner, 1999
<i>Aspergillus</i> spp.	Fleisch, Schinken, Würste	Comi et al., 2004; Matos et al., 2007; Mižáková et al., 2002; Rojas et al., 1991; Reiß, 1986; Weber, 2003
<i>Aspergillus flavus</i>	Fleisch, Rindfleisch, Hackfleisch, Schinken	Ismail & Zaky, 1999; Ismail et al., 1995; Mahmoud et al., 2001; Rojas et al., 1991; Weidenbörner, 1999
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Rindfleisch, Geflügelfleisch, Hackfleisch, Schinken	Mahmoud et al., 2001; Rojas et al., 1991; Weidenbörner, 1999
<i>Aspergillus glaucus</i>	Schinken, Würste	Matos et al., 2007; Rojas et al., 1991
<i>Aspergillus niger</i>	Fleisch, Rindfleisch, Hackfleisch, Schinken	Ismail & Zaky, 1999; Ismail et al., 1995; Mahmoud et al., 2001; Rojas et al., 1991; Weidenbörner, 1999

Fortsetzung Tabelle 1: Schimmelpilz-Spezies in Fleisch und Fleischwaren

Schimmelpilz-Spezies	Produkte	Literatur
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Hackfleisch, Schweinefleischprodukte	Edwards et al., 2002; Mahmoud et al., 2001
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Speck	Weidenbörner, 1999
<i>Aspergillus terreus</i>	Hackfleisch, gefrorenes Rindfleisch	Mahmoud et al., 2001; Weidenbörner, 1999
<i>Aspergillus versicolor</i>	Hackfleisch, Würste, gefrorenes Rindfleisch	Iacumin et al., 2009; Mahmoud et al., 2001; Matos et al., 2007; Weidenbörner, 1999
<i>Aureobasidium pullulans</i>	gekühltes Fleisch	Weidenbörner, 1999
<i>Chrysosporium</i> spp.	Fleisch, gekühltes Fleisch	Lowry & Gill, 1984; Weidenbörner, 1999
<i>Cladosporium</i> spp.	Fleisch, Schinken, Würste	Ismail et al., 1995; Mansour, 1986; Mízáková et al., 2002; Rojas et al., 1991; Weber, 2003
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Rindfleisch, Hackfleisch	Ismail et al., 1995; Mahmoud et al., 2001; Mansour, 1986; Weidenbörner, 1999
<i>Cladosporium herbarum</i>	Hackfleisch, gefrorenes/ gekühltes Fleisch	Brooks & Hansford, 1923; Mahmoud et al., 2001; Mansour, 1986; Weidenbörner, 1999
<i>Eurotium</i> spp.	Schinken	Comi et al., 2004; Weidenbörner, 1999
<i>Eurotium amstelodami</i>	Würste, Schinken, Salami	Iacumin et al., 2009; Reiß, 1986
<i>Eurotium rubrum (repens)</i>	Hackfleisch, Schinken, Speck	Comi et al., 2004 ; 2001; Núñez et al., 1996 ; Peintner et al., 2000
<i>Fusarium</i> spp.	Schinken, Würste	Matos et al., 2007; Reiß, 1986
<i>Fusarium oxysporum</i>	Hackfleisch, gefrorenes Rindfleisch	Mahmoud et al., 2001; Weidenbörner, 1999
<i>Mucor circinelloides</i>	Fleisch, Rindfleisch, Hackfleisch	Ismail & Zaky, 1999; Mahmoud et al., 2001
<i>Mucor hiemalis</i>	Hackfleisch	Mahmoud et al., 2001
<i>Mucor racemosus</i>	Fleisch, gefrorenes/gekühltes Fleisch	Brooks & Hansford, 1923; Lowry & Gill, 1984; Weidenbörner, 1999
<i>Penicillium</i> spp.	Fleisch, Schinken, Würste	Comi et al., 2004; Filtenborg et al., 1996; Ismail et al., 1995; Matos et al., 2007; Mízáková et al., 2002; Rojas et al., 1991; Samson et al., 2000; Weber, 2003
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Schinken, gefrorenes Rindfleisch	Núñez et al., 1996; Weidenbörner, 1999

Fortsetzung Tabelle 1: Schimmelpilz-Spezies in Fleisch und Fleischwaren

Schimmelpilz-Spezies	Produkte	Literatur
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Fleisch, Rindfleisch, Hackfleisch, Schinken, Speck, Würste	Iacumin et al., 2009; Ismail & Zaky, 1999; Ismail et al., 1995; Krämer, 1997; Mahmoud et al., 2001; Núñez et al., 1996; Reiß, 1986; Samson et al., 2000; Weidenbörner, 1999
<i>Penicillium commune</i>	Schinken, Würste	Asefa et al., 2009a; Iacumin et al., 2009; Núñez et al., 1996; Samson et al., 2000
<i>Penicillium expansum</i>	Schinken, Würste, gefrorenes/gekühltes Fleisch	Brooks & Hansford, 1923; Iacumin et al., 2009; Núñez et al., 1996; Samson et al., 2000; Weidenbörner, 1999
<i>Penicillium griseofulvum</i>	Würste, gefrorenes Rindfleisch	Weidenbörner, 1999
<i>Penicillium nalgiovense</i>	Schinken, Würste	Asefa et al., 2009a; Filtenborg et al., 1996; Iacumin et al., 2009; Krämer, 1997; Samson et al., 2000; Weidenbörner, 1999
<i>Penicillium olsonii</i>	Würste	Iacumin et al., 2009; López-Díaz et al., 2002; Samson et al., 2000
<i>Penicillium roqueforti</i>	Rindfleisch, Geflügelfleisch	Samson et al., 2000; Weidenbörner, 1999
<i>Penicillium solitum</i>	Schinken, Würste, Speck	Asefa et al., 2009a; Peintner et al., 2000; Samson et al., 2000
<i>Penicillium verrucosum</i>	Schinken, Würste, Schweinefleischprodukte	Cabañes et al., 2010; Edwards et al., 2002; Iacumin et al., 2009; Samson et al., 2000; Weidenbörner, 1999
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Fleisch, Würste	Ismail & Zaky, 1999; Matos et al., 2007; Reiß, 1986; Weidenbörner, 1999
<i>Wallemia sebi</i>	Würste	Weidenbörner, 1999
<i>Thamnidium elegans</i>	Fleisch, gefrorenes/gekühltes Fleisch	Brooks & Hansford, 1923; Lowry & Gill, 1984; Weidenbörner, 1999

Tabelle 2: Hefe-Spezies in Fleisch und Fleischwaren

Hefe-Spezies	Produkte	Literatur
<i>Candida</i> spp.	Rinderhackfleisch, gefrorenes Fleisch, Schinken, Würste	Asefa et al., 2009b; Banks & Board, 1987; Hsieh & Jay, 1984; Weber, 2003; Weidenbörner, 1999
<i>Candida albicans</i>	Rindfleisch	Deak & Beuchat, 1996
<i>Candida intermedia</i>	Rindfleisch, Geflügelfleisch, Würste	Deak & Beuchat, 1996; Encinas et al., 2000
<i>Candida parapsilosis</i>	Rindfleisch, gefrorenes Fleisch, Geflügelfleisch, Würste	Banks & Board, 1987; Deak & Beuchat, 1996; Encinas et al., 2000
<i>Candida rugosa</i>	Rindfleisch, gefrorenes Fleisch, Geflügelfleisch, Würste	Banks & Board, 1987; Deak & Beuchat, 1996

Fortsetzung Tabelle 2: Hefe-Spezies in Fleisch und Fleischwaren

Hefe-Spezies	Produkte	Literatur
<i>Candida zeylanoides</i>	Hackfleisch, gefrorenes Fleisch, Rindfleisch, Geflügelfleisch, Würste, Fleischprodukte, Schinken	Asefa et al., 2009b; Banks & Board, 1987; Dalton et al., 1984; Deak & Beuchat, 1996; Deak et al., 2000; Encinas et al., 2000; Hsieh & Jay, 1984; Nielsen et al., 2008; Weidenbörner, 1999
<i>Cryptococcus</i> spp.	Hackfleisch, Schinken	Asefa et al., 2009b; Hsieh & Jay, 1984; Weidenbörner, 1999
<i>Cryptococcus albidus</i>	Rinderhackfleisch, Würste	Deak & Beuchat, 1996
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Rindfleisch, gefrorenes Fleisch, Schinken, Lammfleisch, Schweinefleischprodukte	Banks & Board, 1987; Deak & Beuchat, 1996; Saldanha-da-Gama et al., 1997
<i>Debaryomyces hansenii</i> (<i>Candida famata</i>)	Hackfleisch, gefrorenes Fleisch, Rindfleisch, Geflügelfleisch, Würste, Schinken, Fleischprodukte	Asefa et al., 2009b; Banks & Board, 1987; Dalton et al., 1984; Deak & Beuchat, 1996; Encinas et al., 2000; Gardini et al., 2001; Krämer, 1997; Nielsen et al., 2008; Saldanha-da-Gama et al., 1997; Weber, 2003; Weidenbörner, 1999
<i>Issatchenkia orientalis</i> (<i>Candida krusei</i>)	Milchprodukte*	Bockelmann et al., 2008; Makino et al., 2010
<i>Pichia membranifaciens</i>	Rindfleisch, Würste	Dalton et al., 1984; Deak & Beuchat, 1996
<i>Pichia guilliermondii</i>	Schweinefleischprodukte	Nielsen et al., 2008; Saldanha-da-Gama et al., 1997
<i>Rhodotorula</i> spp.	Fleisch, Schinken, Würste	Asefa et al., 2009b; Weber, 2003; Weidenbörner, 1999
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Rindfleisch, gefrorenes Fleisch, Geflügelfleisch, Schinken, Würste, getrocknete Fleischprodukte,	Asefa et al., 2009b; Banks & Board, 1987; Deak & Beuchat, 1996
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Rindfleisch, Schinken, Würste	Deak & Beuchat, 1996
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Geflügelfleisch, Milchprodukte*	Bockelmann et al., 2008; Weidenbörner, 1999
<i>Saccharomyces exiguus</i>	Rindfleisch, Geflügelfleisch	Deak & Beuchat, 1996
<i>Trichosporon</i> spp.	Rindfleisch, Geflügelfleisch, Hackfleisch, Würste	Deak & Beuchat, 1996; Encinas et al., 2000; Hsieh & Jay, 1984; Weidenbörner, 1999
<i>Yarrowia lipolytica</i> (<i>Candida lipolytica</i>)	Rinderhackfleisch, gefrorenes Fleisch, Würste, Lammfleisch, Geflügelfleischprodukte	Banks & Board, 1987; Deak & Beuchat, 1996; Deak et al., 2000; Encinas et al., 2000; Gardini et al., 2001; Hsieh & Jay, 1984; Weidenbörner, 1999

* Milchprodukte werden gelegentlich als Zutaten zu Fleischprodukten verwendet

1.1 Rohes Fleisch

Mizáková et al. (2002) konnten bei Untersuchungen von rohem Fleisch (Rind- und Schweinefleisch) auf Schimmelpilze in der Slowakei am häufigsten die Gattungen *Penicillium* spp., *Acremonium* spp., *Mucor* spp., *Cladosporium* spp. und *Aspergillus* spp. isolieren. In lokalen Fleisch- und Hackfleischproben in Ägypten fanden Mahmoud et al. (2001) am häufigsten Vertreter der Gattung *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. terreus*), gefolgt von *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. varadicatum*), *Cladosporium* (*Cla. cladosporioides*, *Cla. herbarum*), *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. verticillioides*) und *Mucor* (*M. hiemalis*). Häufige Hefen in rohem Fleisch sind *Candida* spp., *Debaryomyces* spp., *Pichia* spp., *Rhodotorula* spp., *Trichosporon* spp. und *Yarrowia lipolytica* (Deak und Beuchat, 1996).

1.2 Hackfleisch

Bei der Herstellung von Hackfleisch kommt es durch die mechanische Zerkleinerung teilweise zur Zerstörung von Zellen und zum Austritt von Zellsaft. Zudem werden die primär auf der Fleischoberfläche befindlichen Mikroorganismen im ganzen Substrat mehr oder minder homogen verteilt. Die Kontaminierung mit humanpathogenen Bakterien ist hier von größter Bedeutung. Während Schimmelpilze eher selten auftreten, erreichen Hefen, wohl dank des hohen verfügbaren Wassergehalts, in Hackfleisch Keimzahlen bis zu 10^6 KBE/g (Deak und Beuchat, 1996). In Hackfleisch wurden die Gattungen *Candida* spp., *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces* spp., *Yarrowia lipolytica*, *Pichia* spp., *Rhodotorula* spp., *Trichosporon* spp. und *Cryptococcus* spp. am häufigsten nachgewiesen (Dalton et al., 1984; Weidenbörner, 1999).

1.3 Gefrorenes Fleisch

Unter 0 °C können Pilze beim Wachstum mit Bakterien konkurrieren. Im Vergleich zu Hefen spielen Schimmelpilze eine große Rolle beim Befall gefrorener Fleischprodukte. Bei der frostbedingt geringen Verfügbarkeit von Wasser können Hefen sich nicht vermehren, während viele Schimmelpilze noch wachsen können. Auf gefrorenem Fleisch können sie sichtbare Defekte wie „Black Spots“, „Whisker¹“ oder „White Spots“ bilden. Nach Untersuchungen von Brooks und Handsford (1923), Gill et al. (1981) und Gill und Lowry (1982) bilden *Cl. herbarum*, *Cl. cladosporioides*, *P. hirsutum* und *Aureobasidium pullulans* auf gefrorenem Fleisch „Black Spots“. Pilze der Unterabteilung Mucoromycotina, wie *Thamnidium elegans* und *Mucor* spp. (*M. racemosus*) bilden nach den zitierten Untersuchungen auf gefrorenem Fleisch sogenannte „Whiskers“. Aus „White Spots“ wurden *Chrysosporium pannorum* und *Acremonium* spp. isoliert, „Blue Green Spots“ werden von *P. corylophilum* gebildet (Lowry und Gill, 1984).

¹ *Whisker*: Englisch für Barthaar, Backenhaar bei Menschen sowie Tast-/Schnurrhaare bei Hauskatzen. Hier handelt es sich um haarförmige Kolonien von Pilzen.

1.4 Fleischprodukte

Geräucherte Fleischwaren: Einer Untersuchung in Norwegen zufolge war *Penicillium* spp. die häufigste Schimmelpilzgattung auf geräuchertem Fleisch (z. B. Schinken), mit *P. nalgiovense* als dominierender Art, gefolgt von *Cladosporium* spp. und *Eurotium* spp. (Asefa et al., 2009a). In Spanien wurden *Aspergillus* spp. (*A. glaucus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, Rojas et al., 1991), *Penicillium* spp. (*P. commune*, *P. chrysogenum*, *P. aurantiogriseum*, *P. expansum*) und *Eurotium* spp. (*E. herbariorum* und *E. repens*) aus geräuchertem spanischem Schinken isoliert (Núñez et al., 1996). Zu ähnlichen Befunden kamen Comi et al., (2004), die in Kroatien *Eurotium* spp., *Aspergillus* spp. und *Penicillium* spp. aus Istrien-Schinken isolierten und Peintner et al. (2000), die in Tiroler Speck aus Italien und Österreich *E. rubrum* und *P. solitum* als dominierende Arten nachweisen konnten.

Würste: 91 % der von Papagianni et al. (2007) aus traditionellen griechischen Würsten isolierten Pilze gehörten zur Gattung *Penicillium* spp.; darunter waren *P. solitum*, *P. nalgiovense* und *P. commune* die häufigsten Arten. López-Díaz et al. (2001) untersuchten in Spanien verschiedene fermentierte Würste, die von

weißer Patina bedeckt sind. 70 % der isolierten Pilze gehörten zur Gattung *Penicillium* spp., mit *P. commune* als dominierender Art, gefolgt von *P. olsonii*. Matos et al. (2007) isolierten Schimmelpilze aus zwei verschiedenen geräucherten portugiesischen Wurstsorten und fanden *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. und *Fusarium* spp. als die häufigsten kontaminierenden Gattungen. Ähnliche Befunde berichten Ismail und Zaky (1999), die in fertigem Fleischgericht in Ägypten am häufigsten *A. niger*, *A. flavus*, *P. chrysogenum*, *Rhizopus stolonifer* und *M. circinelloides* nachweisen konnten.

2 Kontaminationsquellen

Bedeutendste Kontaminationsquelle für Pilze in Fleischwaren ist das Umfeld von Schlachthöfen und fleischverarbeitenden Betrieben. Dort konnten *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Eurotium* spp., *Cladosporium* spp., *Botrytis* spp., *Epicoccum* spp. und *Phoma* spp. wiederholt isoliert werden (Ismail et al., 1995; Mansour, 1986; Sørensen et al., 2008). Häufig vorkommende *Aspergillus*-Arten sind *A. flavus*, *A. niger*, *A. alutaceus*, *A. fumigatus*, *A. sydowii*, *A. terreus* und *A. vesicolor* (Ismail et al., 1995); häufig vorkommende *Cladosporium*-Arten sind *Cla. herbarum* und *Cla. cladosporioides* (Mansour, 1986). Ein Beispiel von Sørensen et al. (2008) zeigt, dass *Penicillium* spp. und *Eurotium* spp., die sich in einem fleischverarbeitenden Betrieb fanden, auch aus den fermentierten Würsten isoliert werden konnten. Cvetnić und Pepeljnjak (1997) untersuchten in Kroatien Pilze in der Außenluft: Im Zeitraum von 3 Jahren fanden sich *Cladosporium* spp. (44.7 %), *Penicillium* spp. (34.4 %), *Alternaria* spp. (26.3 %), *Aspergillus* spp. (21.6 %), *Absidia* spp. (12.2 %) und *Fusarium* spp. (7.5 %) als die dominierenden Gattungen. **Tabelle 3** zeigt Pilz-Gattungen und mögliche Kontaminationsquellen für Fleischprodukte.

Tabelle 3: Kontaminationsquellen für Pilze in Fleischwaren

Pilz-Spezies	Lokalisation	Referenz
<i>Absidia</i> spp.	Außenluft	Cvetnić & Pepeljnjak, 1997
<i>Alternaria</i> spp.	Außenluft, Innenraumluft, Schlachthöfe	Cvetnić & Pepeljnjak, 1997; Ismail et al., 1995; Bundesgesundheitsblatt, 2007
<i>Aspergillus</i> spp.	Außenluft, Schlachthöfe, Fleischverarbeitende Betriebe	Cvetnić & Pepeljnjak, 1997; Ismail et al., 1995; Palmas & Meloni, 1997

Fortsetzung Tabelle 3: Kontaminationsquellen für Pilze in Fleischwaren

Pilz-Spezies	Lokalisation	Referenz
<i>Botrytis</i> spp.	Außenluft, Innenraumluft	Bundesgesundheitsblatt, 2007
<i>Candida</i> spp.	Fleischverarbeitende Betriebe	Nielsen et al., 2008; Palmas & Meloni, 1997
<i>Cladosporium</i> spp.	Außenluft, Innenraumluft, Schlachthöfe, Fleischverarbeitende Betriebe, Kuhställe	Cvetnić & Pepeljnjak, 1997; Ismail et al., 1995; Mansour, 1986; Pitkäranta et al., 2008; Bundesgesundheitsblatt, 2007; Sørensen et al., 2008; Zeng, et al., 2006
<i>Cryptococcus</i> spp.	Fleischverarbeitende Betriebe, Innenraumluft	Pitkäranta et al., 2008; Palmas & Meloni, 1997
<i>Epicoccum</i> spp.	Außenluft, Innenraumluft	Bundesgesundheitsblatt, 2007
<i>Mucor</i> spp.	Fleischverarbeitende Betriebe	Palmas & Meloni, 1997
<i>Penicillium</i> spp.	Außenluft, Schlachthöfe, Fleischverarbeitende Betriebe	Cvetnić & Pepeljnjak, 1997; Ismail et al., 1995; Palmas & Meloni, 1997; Sørensen et al., 2008
<i>Scopulariopsis</i> spp.	Schlachthöfe	Ismail et al., 1995
<i>Wallemia</i> spp.	Außenluft, Innenluft, Tierhaltung mit Einstreu	Gabrio, 2008; Bundesgesundheitsblatt, 2007 ; Samson et al., 2000

3 Mykotoxine bildende Pilze in Lebensmitteln tierischen Ursprungs

Mykotoxine sind toxische sekundäre Stoffwechselprodukte, die von vielen Schimmelpilzen gebildet werden können. Manche Pilze können mehrere Mykotoxine gleichzeitig produzieren: beispielsweise kann *P. griseofulvum* Patulin, Griseofulvin und Roquefortin C synthetisieren (Samson et al., 2000). Nicht alle Schimmelpilz-Stämme oder Arten können Mykotoxine produzieren (Samson et al., 2000). Pilze sind grundsätzlich hitzeempfindlich. Die für ihr Wachstum optimale Temperatur liegt zwischen 25-35 °C (maximal etwa 40 °C, thermotolerante Pilze etwa 50-60 °C; Reiß, 1986; Samson et al., 2000). Eine Hitzebehandlung von 70-80 °C inaktiviert die meisten Pilz-Sporen (Samson et al., 2000). Im Gegensatz dazu sind Mykotoxine hitzetolerant, so dass sie Pasteurisation und sogar Sterilisation noch überstehen können oder nur zum Teil abgebaut werden (Samson et al., 2000). Bullerman und Bianchini (2007) zeigten

in einer Studie, dass das Mykotoxin Fumonisin B1 erst bei einer Temperatur von mindestens 160 °C zu 85 % zerstört wird, und zwar nur in Gegenwart von Glucose.

Die Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* sind unter den Pilzen die bedeutendsten Kontaminanten in der Nahrungskette, nicht nur, weil sie häufig im Umfeld der fleischverarbeitenden Betriebe auftreten (Ismail et al., 1995; Sørensen et al., 2008), sondern insbesondere, weil viele von ihnen Mykotoxine und toxische Stoffwechselprodukte produzieren (Edwards et al., 2002; Samson et al., 2000).

Tabelle 4 zeigt die wichtigsten Mykotoxine, die von den häufig in Fleischwaren vorkommenden Pilzgattungen *Aspergillus* und *Penicillium* gebildet werden.

Tabelle 4: Mykotoxine produzierende Pilzarten der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*

Toxin / unerwünschte Substanz	Pilze	Referenz
Aflatoxin	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nominus</i>	Bullerman et al., 1969; Edwards et al., 2002; Reiß, 1986; Samson et al., 2000
Patulin	<i>A. terreus</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. roqueforti</i>	Edwards et al., 2002; Reiß, 1986; Samson et al., 2000
Ochratoxin A	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. westerdijkiae</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. nordicum</i>	Cabañes et al., 2010; Edwards et al., 2002; Gil-Serna et al., 2009; Lund & Frisvad, 2003; Pardo et al., 2006; Reiß, 1986; Samson et al., 2000; Saxena et al., 2001
Roquefortin C	<i>P. roqueforti</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. hirstum</i>	Taniwaki et al., 2009; Samson et al., 2000
Penicillinsäure	<i>P. aurantiogriseum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. nalgiovense</i> , <i>P. olsonii</i> , <i>A. ochraceus</i>	Asefa et al., 2009a; Laich et al., 2002; Papagianni et al., 2007; Samson et al., 2000
Penicillin*	<i>P. chrysogenum</i> , <i>P. nalgiovense</i>	Samson et al., 2000

* Penicillin ist kein Mykotoxin, sollte sich jedoch nicht in Lebensmitteln befinden (Samson et al., 2000)

Darüber hinaus existieren andere Mykotoxin-produzierende Schimmelpilzarten im Fleisch: *Alternaria alternata* bildet Alternariol (Andersen et al., 2006; Reiß, 1986; Samson et al., 2000), Pilze der Gattung *Fusarium* bilden die Fusarium-Mykotoxine z. B. Trichothecene, Zearalenone und Fumonisin (Edwards et al., 2002; Reiß, 1986; Samson et al., 2000), Arten der Gattung *Eurotium* spp. (*E. herbariosum*, *E. repens*, *E. amstelodami*) bilden toxische Stoffwechselprodukte wie z. B. Phycion und Echinulin (Núñez et al., 1996, Samson et al., 2000) und *Wallemia sebi* – ein Pilz, der in Gewürzen sowie in Innen- und Außenluft vorkommt – bildet Walleminol (Reiß, 1986; Samson et al., 2000).

Auch Arten der Gattung *Cladosporium* wurden häufig in Fleischprodukten und im Umfeld fleischverarbeitender Betriebe gefunden. Bisher gibt es jedoch keine Erkenntnisse, dass diese Gattung Toxine bildet (Samson et al., 2000). In einer entsprechenden Studie von Núñez et al. (1996) erwiesen sich die Stoffwechselprodukte von *Cladosporium herbarum*, isoliert aus spanischem Schinken, als nicht toxisch gegenüber dem Salinenkrebs *Artemia*.

4 Nachweis und Quantifizierung von Pilzen

4.1 Kulturelles Nachweisverfahren

Kontaminierende Pilze in Lebens- und Futtermitteln werden meist in „Koloniebildenden Einheiten (KbE)“ (= Colony Forming Units: CFU) quantifiziert (Gourama und Bullerman, 1995; Saxena et al., 2001). Hierzu wird Probenmaterial zerkleinert und mit Peptonwasser verdünnt; Aliquots dieser Suspension werden dann auf geeignete Pilznährmedien (z. B. Sabouraud-Agar, DG-18-Agar) aufgebracht. Nach einer Woche wird die Anzahl der Kolonien bestimmt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Zahl der KbE/g berechnet (Gedek, 1974). Nachteil dieser Methode: sie ist zeitaufwendig und spiegelt vorwiegend die Anzahl vermehrungsfähiger Sporen (und sprossender Hyphen), nicht aber die Anzahl inaktivierter oder defekter Sporen. Junge Schimmelpilz-Kolonien in Lebensmitteln bestehen beispielsweise überwiegend aus Hyphen. Der KbE-Wert ist in diesem Fall im Vergleich zur Pilzmasse sehr niedrig. Nach dem Einsetzen der Sporulation erhöht sich der KbE-Wert, ohne dass die gesamte Pilz-Biomasse wesentlich zugenommen hat. Schimmelpilze wie *Alternaria* spp. und *Fusarium* spp. produzieren überwiegend Hyphen, aber wenig Sporen, während Pilze wie *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. und *Rhizopus* spp.

überwiegend Sporen produzieren (Karakousis et al., 2006; Schnürer, 1993; Taniwaki et al., 2006). Dennoch beträgt die Sporenanzahl bei Schimmelpilzen nur zwischen 3-5 % der gesamten pilzlichen Biomasse (Schnürer, 1993). Der KbE-Wert ist daher kein optimaler verlässlicher quantitativer Indikator für die gesamte pilzliche Biomasse (Le Dréan et al., 2010; Schnürer, 1993; Taniwaki et al., 2006).

4.2 Grenzwert für kontaminierende Pilze in Fleischwaren

Anders als für Bakterien gibt es keine gesetzlichen Grenzwerte für die Gesamtkeimzahl von kontaminierenden Pilzen in Fleischprodukten. Nach Eisgruber und Bülte (2006) (Rechtsvorschriften, Referenzverfahren und Empfehlungen in der EU und der Schweiz) wird der Toleranzwert für Schimmelpilze in Fleischprodukten (z. B. Rohwurstwaren, aber auch pasteurisierte Fleischprodukte) als „von bloßem Auge nicht erkennbar“ beschrieben. Immerhin sind für verschiedene Produkte Toleranz-Richtwerte für die Belastung mit Hefen definiert (**Tabelle 5**).

Tabelle 5: Richtwerte für die Belastung von Fleischprodukten mit Hefen

Produkte	Richtwerte (KbE/g)	Referenz
Brüh-, Kochwürste, Kochpökelware, Sülzen und Aspikware, im Stück und vakuumverpackt	10^4	DGHM*, 2005
Würstchen, vakuumverpackt	10^3	ALST**, 1991
Brühwurst und Kochpökelware (Stückware und Aufschnittware)	10^3	ALST, 1991
Rohpökelware (Stückware und Aufschnittware)	10^6	ALST, 1991
Kochwürste und Brühwürste, vakuumverpackt	Stück: 10^3 Aufschnitt: 10^4	ALST, 1991
Rohwürste, schnittfest, vakuumverpackt	Stück: 10^3 Aufschnitt: 10^5	ALST, 1991
Rohwürste, streichfähig, vakuumverpackt	10^6	ALST, 1991
Sülzen und Aspikwaren, vakuumverpackt	Stück: 10^2 Aufschnitt: 10^3	ALST, 1991

* DGHM: Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene;

**ALST: Arbeitskreis lebensmittelhygienischer tierärztlicher Sachverständiger (Eisgruber und Bülte, 2006)

Als Referenzwert in dieser Studie wurde mit 10^5 KbE/g (bzw. Sporen/g) der Grenzwert von Rohwurst-Aufschnitt übernommen, auch weil der mit bloßem Auge erkennbare Befall mit Hefen auf Fleischoberflächen nach Weber (2003) ab etwa 10^5 KbE/cm² wahrgenommen wird. Dieser Orientierungswert wurde für diese Studie als Referenz für die Interpretation der qPCR-Ergebnisse verwendet.

4.3 Nachweis der pilzlichen Biomasse

Ein alternativer Ansatz zur Quantifizierung der gesamten pilzlichen Biomasse in einer Probe ist die Bestimmung des Myzel-Trockengewichts (Mycelium Dry Weight). Diese Methode funktioniert nicht, wenn die Hyphen die Matrix des Lebensmittels durchdringen (Le Dréan et al., 2010). Deshalb wurden chemische und biochemische Methode zur quantitativen Bestimmung von Pilz-Biomasse in Lebens- und Futtermitteln entwickelt. Dazu gehört die Quantifizierung von Chitin und von Ergosterin. Chitin ist ein Polymer, das nicht in Bakterien, sondern in Zellwänden von Pilzen vorkommt – aber auch im Hautskelett von Insekten. Chitin-Werte können deshalb missinterpretiert werden, wenn z. B. Getreide oder Futtermittel von Insekten verunreinigt sind. Auch die Dauer des Chitin-Assays von 4 bis 6 Stunden erweist sich als Nachteil im Vergleich zur Quantifizierung per Ergosterin (Gourama und Bullerman, 1995; Seitz et al., 1977; Zelles et al., 1987). Ergosterin bildet den Haupt-Bestandteil der Sterine in der Membran von Pilzen. Es kommt nur selten in Bakterien und höheren Pflanzen vor (Newell et al., 1987; Madonna et al., 2001; Parsi und Górecki, 2006; Seitz et al., 1977). Ergosterin ist relativ instabil und wird nach dem Absterben der Pilze abgebaut. Es dient deshalb als Indikator der lebenden Pilz-Biomasse und ihres Entwicklungszustands (Gourama und Bullerman, 1995; Mille-Lindblom et al., 2004; Parsi und Górecki, 2006; Saxena et al., 2001; West und Grant, 1987; Zill et al., 1988).

4.4 Polymerase Chain Reaction

Die molekularbiologische Methode „Polymerase-Kettenreaktion“ (PCR: Polymerase Chain Reaction) wurde vom amerikanischen Chemiker Kary Mullis 1983 entwickelt. Die PCR ermöglicht den Nachweis geringster DNA-Mengen, indem die vorhandene DNA durch wiederholte Verdopplung in mehreren Zyklen künstlich vervielfältigt wird. Die konventionelle PCR erfordert, die vervielfältigte DNA in Agarosegel aufzutragen, um das Produkt der Amplifikation sichtbar zu machen. Sie wird auch als qualitative PCR bezeichnet, da die Menge der in der Probe vorhandenen DNA nicht bestimmt werden kann. Zur Quantifizierung der DNA in der Probe wurde die Real-Time-PCR oder quantitative PCR (qPCR) entwickelt. Die qPCR ist schnell, spezifisch und macht den Erfolg der Amplifikation unmittelbar sichtbar.

Die Anwendung PCR-basierter Methoden zum Nachweis und zur Quantifizierung von Pilz-DNA ist weit verbreitet. Sie erlaubt eine schnelle Diagnose, ob es sich

bei einer Erkrankung um eine Pilzinfektion handelt, und ermöglicht die Identifizierung der infizierenden Pilze (Hendolin et al., 2000; Kumar und Shukla, 2005; Kumar und Shukla, 2006; Lau et al., 2007; Rao et al., 2006; Sandhu et al., 1995; Schabereiter-Gurtner et al., 2007; Spiess et al., 2007; Vollmer et al., 2008; Walsh et al., 1995; Zeng et al., 2007). Die qPCR wird auch eingesetzt, um Veränderungen der Antigenlast während einer Therapie zu verfolgen und damit die Wirksamkeit der Therapie zu prüfen (Sanguinetti et al., 2003). Im Bereich der Lebens- und Futtermittelproduktion ist die qPCR eine anerkannte Methode, u. a. um festzustellen, ob die Kontamination mit Mykotoxin produzierenden Pilzen ein akzeptiertes Toleranz-Niveau überschreitet (Edwards et al., 2002). Einige Untersucher reklamieren den Einsatz der qPCR und die Ergebnisse der Quantifizierung von Mykotoxin-produzierenden Pilzen, z. B. von *Aspergillus* spp. (Gil-Serna et al., 2009; Suanthie et al., 2009), *Penicillium* spp. (Suanthie et al., 2009), *Fusarium* spp. (Fredlund et al., 2008; Suanthie et al., 2009) und *Alternaria* spp. (Andersen et al., 2006), als Indikator einer Mykotoxin-Belastung von Lebensmitteln.

Die qPCR kann eine sehr geringe DNA-Menge in Proben quantifizieren. Nach Studien von Black (2009) ist es möglich, die DNA in Teppich-Proben mit 40 Pilz-Sporen von *Alternaria alternata*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium cladosporioides* oder *Stachybotrys chartarum* zu quantifizieren. Die Sporen-Konzentration in der Probe ist aber nur einer der Faktoren, die die Effizienz der PCR beeinflussen. Die Extraktionsmethode zur Gewinnung der DNA, (siehe 4.5), die verwendeten Primerpaare zur Amplifizierung der extrahierten DNA, (siehe 4.6), die PCR-Bedingungen, die Proben-Matrix (Al-Soud und Rådström, 1998; Hanna et al., 2005) und die PCR-Inhibitoren (Al-Soud und Rådström, 1998; Fredlund et al., 2008), z. B. zelluläre Proteine (Simmon et al., 2004), die sich in biologischen Proben finden, sind ebenfalls bedeutende Faktoren für den Erfolg der PCR. Zur Interpretation der Ergebnisse der Quantifizierung von Pilzen in Proben gilt es, pilzarteigene Charakteristika zu berücksichtigen, die die Mengenbestimmung beeinflussen. Einzellige Mikroorganismen wie Bakterien und Hefen bestehen aus einzelnen Zellen, ein Molekül chromosomale DNA repräsentiert eine Zelle und die Ableitung der Biomasse aus der chromosomalen DNA-Menge ist möglich (Guidot et al., 2002). Schimmelpilze bestehen aus Multinuklear-Hyphen und Konidien und die Zellen unterscheiden sich voneinander in Länge, Volumen und

DNA-Menge (Guidot et al., 2002; Schnürer, 1993; Taniwaki et al., 2006). Bei Schimmelpilzen kann deshalb aus der DNA-Menge nicht unmittelbar auf die Anzahl der Zellen geschlossen werden. Mit einem geeigneten Umrechnungsfaktor könnte man aber die gesamte Biomasse aller vorhandenen Schimmelpilze bestimmen (Guidot et al., 2002).

4.5 DNA-Extraktionsverfahren für Pilze

Die Methode zur Extraktion der DNA aus den Proben spielt eine große Rolle, da Quantität und Qualität der amplifizierten DNA bzw. des PCR-Produkts von der Qualität und Quantität der extrahierten DNA abhängen. Die Struktur der Pilzzelle ist vielschichtiger als die der Zellen von Säugetieren, Bakterien und Viren. Die Zellwand der Pilze besteht aus dicken Schichten von Chitin, $\beta(1-3)$ D-Glucan, $\beta(1-6)$ D-Glucan, Lipiden und Peptiden (Karakousis et al., 2006). Das erschwert die Verdauung durch Enzyme und den chemischen Abbau (Karakousis et al., 2006) und beeinträchtigt die Wirksamkeit der DNA-Extraktion. Ist die Pilz-Menge sehr gering, was in biologischen Proben wie Blut, Schleim und Gewebe gegeben ist, wird die Extraktion der Pilz-DNA zusätzlich erschwert (Karakousis et al., 2006).

Eine universelle, für alle Pilzarten geeignete DNA-Extraktionsmethode gibt es noch nicht (Karakousis et al., 2006). Unter den vielen verfügbaren kommerziellen Kits zur DNA-Extraktion aus verschiedenen Mikroorganismen und Zellen gibt es keines, das DNA aus Pilzen gut extrahieren kann (Black, 2009). Um ein optimales Extraktionsergebnis zu erzielen, muss der Untersucher jeweils abhängig von der Pilz- und Probenart die geeignete Extraktionsmethode bzw. das geeignete Extraktionskit auswählen. Auch der Wachstumszustand beeinflusst die Effizienz der DNA-Extraktion. Sporen sind relativ widerstandsfähig, daher lässt sich DNA weniger leicht aus Sporen extrahieren als aus Myzelien und Hyphen (Le Dréan et al., 2010). Zur Optimierung der DNA-Extraktionsmethode werden bei Pilzen zur Aufspaltung der Zellwände verschiedene Zell-Lyse-Schritte zusätzlich eingefügt oder kombiniert: z. B. die mechanische Spaltung mit Glass Beads (Black, 2009; Black und Foarde, 2007; Fredricks et al., 2005; Haugland et al., 1999; Haugland et al., 2002), Mörserzerkleinerung (Karakousis et al., 2006), tiefes Einfrieren mit sofortigem Auftauen (Haugland et al., 1999; Leinberger et al., 2005), Hitze- und alkalische Behandlung (Löffler et al., 1997), Säurebehandlung (Karakousis et al., 2006), Ultraschalldesintegration (Haugland et al., 1999; Karakousis et al., 2006)

und die enzymatische Behandlung mit dem Enzym Lyticase (Francesconi et al., 2008; Fredlund et al., 2008; Halliday et al., 2005; Karakousis et al., 2006; Kasai et al., 2008; Leinberger et al., 2005; Millar et al., 2000; Müller et al., 1998; Ramírez et al., 2008; Schabereiter-Gurtner et al., 2007; Walsh et al., 1995). Lyticase wird verwendet, um Pilz-Zellwände soweit aufzuschließen, dass die Zellen instabil werden und eine Spheroplastform (Kugelform) einnehmen. In diesem Zustand sind die Zellen fragil und können durch die Übertragung in Lysepuffer oder Hypotonie-Lösung lysiert werden. Die ausgewählten zusätzlichen Zell-Lyse-Schritte hängen von der Pilzart ab. Manche Pilzarten wie *Aspergillus* spp. (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*) und *Alternaria* spp. sind widerstandsfähig gegenüber Lyse-Enzymen, können aber mechanisch gespalten werden (Fredricks et al., 2005; Haugland et al., 1999; Karakousis et al., 2006; Löffler et al., 1997). Die DNA von *P. chrysogenum* und *C. albicans* kann sowohl mit enzymatischer als auch mit chemischer oder mechanischer Behandlung gut extrahiert werden (Fredricks et al., 2005; Karakousis et al., 2006)

4.6 Primer zur Amplifizierung von Pilz-DNA

Der zur PCR-Amplifikation am häufigsten verwendete DNA-Abschnitt ist die ribosomale DNA (rDNA). Dieser Abschnitt besteht aus der „Small Subunit-Coding Sequence“ (SSU: 18S rDNA), der „Large Subunit-Coding Sequence“ (LSU: 28S rDNA), dem „Internal Transcribed Spacer“ (ITS), der zwischen SSU und LSU liegt und dem „Intergenic Spacer“ (IGS). ITS besteht aus drei kleinen Abschnitten: ITS1, 5.8S rDNA und ITS2. Es ist der rDNA-Abschnitt, der wohl am häufigsten bei der PCR-Amplifikation verwendet wird, weil er sich durch artspezifische Unterschiede auszeichnet und somit die Identifikation von Arten ermöglicht (Edwards et al., 2002; Martin und Rygiewicz, 2005; Suanthie et al., 2009). Der rDNA-Abschnitt IGS zeichnet sich ebenfalls durch hohe artspezifische Varianz aus. Zugleich zeigt er jedoch eine hohe innerartliche Varianz und dient daher vornehmlich dazu, Pilzstämme innerhalb der gleichen Art zu unterscheiden (Guidot et al., 1999; Martin et al., 1999).

Abbildung 1 zeigt eine repetitive Sequenz der ribosomalen DNA, den Abschnitt ITS und einige Primer, die diesen ITS-Abschnitt amplifizieren. Die Forward-Primer ITS1, ITS1F, ITS5 und NSI1 liegen am 3' Ende des rDNA-Abschnitts SSU, die Reverse-Primer ITS4, NLB4 am Anfang (5' Ende) des rDNA-Abschnitts LSU. Sie amplifizieren den rDNA-Abschnitt ITS. Im Abschnitt Material und Methoden werden alle Primer ausführlich beschrieben.

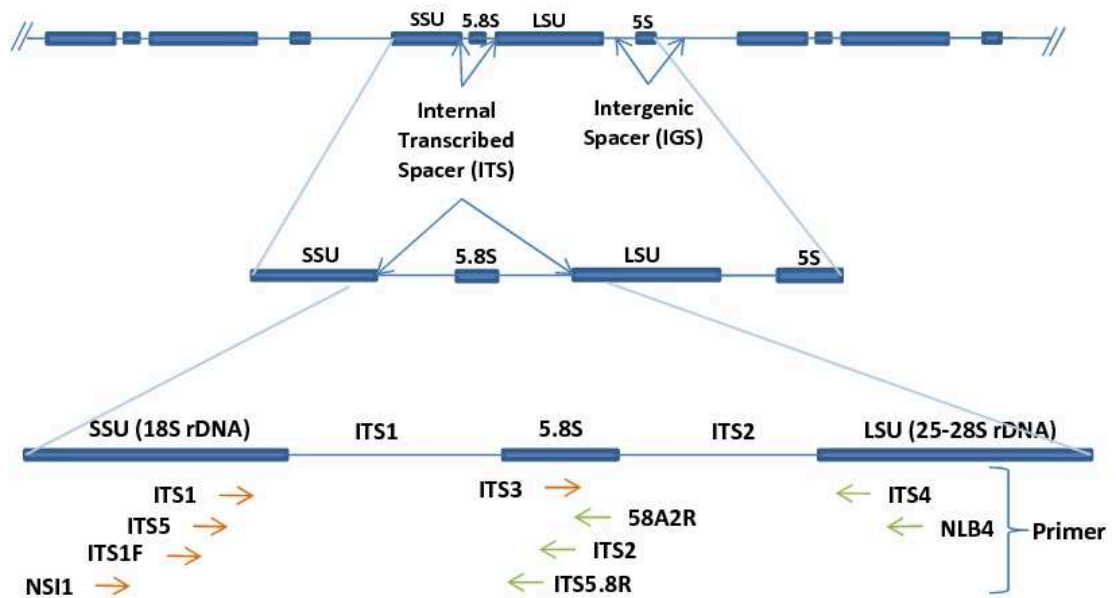


Abbildung 1: Aufbau der ribosomalen DNA (rDNA) von Pilzen

III MATERIAL UND METHODEN

1 Materialien und technische Geräte

1.1 Verwendete technische Geräte

Tabelle 6 listet die verwendeten technischen Geräte auf.

Tabelle 6: Verzeichnis der verwendeten technischen Geräte

Name	Model / -Serien Nr.	Hersteller
Analysenwaage	R200D	Sartorius
Brutschrank	Typ 040	Memmert
Elektrophoresekammer für Agarosegele	40-1214	Peqlab
Elektrophoresekammer für Polyacrylamidgele	45-2020-i	Peqlab
Färbewannen	420-575	Heiland
Finnpipette (1-5 ml)	613-3520	VWR
Flockeis Automat	AF80	Scotsman
IsoFreeze PCR-Rack	KR-96	G. Kisker
IsoFreeze-Rack	KR-20W	G. Kisker
Kälte-Umwälzthermostat	Wise Circu	Witge Labortechnik
Kämme für Agarosegele	40-1214-24D	Peqlab
Kolonienzähler	30808002 Nr. 90/37	Schütt Labortechnik
Kühl- & Gefrierkombination	411090	Privileg
LightCycler® (Carousel) 1.1 Instrument (mit LightCycler® Software Version 3.5)	1401018	Roche
Magnetrührer temperierbar	MR 3001K	Heidolph
Mikrowelle	-	Bauknecht
Pipetten 0,5-10 µl	613-3583	Eppendorf
Pipetten 10-100 µl	613-3585	Eppendorf
Pipetten 100-1000 µl	613-3587	Eppendorf
Scanner	Arcus 1200	AGFA
Schüttler	G10 Gyrotory® Shaker	New Brunswick Scientific Co.
Schüttler	3500	GFL
Software GelCompar® II	-	Applied Maths
Spannungsgerät für Agarosegele	EV 243	Peqlab

Fortsetzung Tabelle 6: Verzeichnis der verwendeten technischen Geräte

Name	Model / -Serien Nr.	Hersteller
Spannungsgerät für Polyacrylamidgele	EV 243	Peqlab
Spektrophotometer	Nano-Drop® ND-1000	Peqlab
Stomacher	Lab Blender 400 BA6021	Seward
TissueLyser II	128101148	Retsch
Thermocycler	2807237 (T3000 Thermocycler)	Biometra
Thermomixer	Comfort 535502652	Eppendorf
UV-Gerät	CN-UV/WL 983506	Vilber Lourmat
UV-Gerät	ECX-26.M	Peqlab
Wasserbad	Typ 1013 10564598 1	GFL
Wonder Wedge Separation Tool	SE 1514	Novodirect
Vortex Genie 2	G560E	Scientific Industries
Zentrifuge (PerfectSpin Mini)	1107 0199	Peqlab
Zentrifuge	Galaxy 16DH	VWR
Zentrifuge	Typ Z383 Nr. 30050017	Hermle
Zentrifuge	1800 94 (Biofuge 28 RS)	Heraeus Sepatech
Zentrifuge	0002866-03-00 (Mikro 200)	Hettich

1.2 Chemikalien

Tabelle 7 listet die verwendeten Chemikalien auf.

Tabelle 7: Verzeichnis der verwendeten Chemikalien

Name	Art. Nr.	Hersteller
100bp DNA Ladder	15628-019	Invitrogen
Agar-Agar	20768.292	VWR
APS	802829	ICN Biomedicals Inc.
Bind Silane	A3797	Applichem
Borsäure	A3581.1000	Applichem
Bromphenolblau	1.08122.0025	Merck
dNTP-Mix	201901	Qiagen
Essigsäure	1.100063.2511	VWR
EDTA	E5134-240G	Sigma

Fortsetzung Tabelle 7: Verzeichnis der verwendeten Chemikalien

Name	Art. Nr.	Hersteller
Ethanol	1.00983.2511	VWR
Ethidiumbromid	1.11615	VWR
Ficoll 400	341691-250G	Merck
Formaldehydlösung	F7026	Sigma
Formamid	344206-L	Merck
GenAgarose LE	M3044.0500	Genaxxon
Glykogen	10814-010	Invitrogen
Hot Start Polymerase (geliefert mit 10X Puffer, enthalt $MgCl_2$)	203203	Qiagen
Isopropanol	109634	Merck
Lambda Exonuklease & Exonuklease Puffer	MO262S	New England Biolabs
LightCycler [®] FastStart DNA Master SYBR Green I	12239264001	Roche
Lyticase aus <i>Arthrobacter luteus</i>	L2524	Sigma
MDE [®] Gel Solution (Lösung: enthält 2X Acrylamid) NaCl	50620 1.06400.1000	Lonza Merck
Na ₂ EDTA	1.08454.0250	Merck
Natriumcarbonat	27771.290	VWR
Natriumthiosulfat	F7026	Sigma
NaOH	1.06498.1000	Merck
Nucleasefreies Wasser	P119C	Promega
Penicillin G	-	NBK
Pepton	1.07213	Merck
Primer	-	Metabion
Repel-Silane	A0818	Applichem
Sabouraud-2 % Glucose-Agar	1.07315.0500	Merck
Silbernitrat	S7276	Sigma
Streptomycin Sulfate	S6501	Sigma
TEMED	A1148.0100	Applichem
Tris-Base	1.08382.2500	Merck
Xylene Cyanol	X4126	Sigma

1.3 Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 8 listet die verwendeten Verbrauchsmaterialien auf.

Tabelle 8: Verzeichnis der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Art. Nr.	Hersteller
DNeasy Blood and Tissue Kit	69504	Qiagen
Einmalspritzen (20 ml)	6120118	VWR
Filterpipettenspitzen 10 µl	70.1115.410	Sarstedt
Filterpipettenspitzen 100 µl	70.760.412	Sarstedt
Filterpipettenspitzen 1000 µl	70.762.411	Sarstedt
GenElute PCR Clean Up Kit	NA1020	Sigma
GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit	G1N70-1KT	Sigma
Glass Beads (unwashed)	G9143-100G	Sigma
Glasplatte 20 x 20 cm	45-2020-20G	Peqlab
Glasplatte ausgeschnitten 20 x 20 cm	45-2020-20R	Peqlab
Greinerröhrchen (15 ml)	188271	Greiner Bio One
Greinerröhrchen (50 ml)	227261	Greiner Bio One
High Pure PCR Template Preparation Kit	11796828001	Roche Applied Science
Multiply® -µStripPro 8er Kette	72.991.002	Sarstedt
Petrischalen	821472	Sarstedt
Pipettenspitzen (1-5 ml)	612-1484	VWR
QIAamp DNA Mini Kit	51304	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	28704	Qiagen
Reaktionsgefäß 0,5 ml	72.735.002	Sarstedt
Reaktionsgefäß 1,5 ml	72.690	Sarstedt
Reaktionsgefäß 2,0 ml	72.695	Sarstedt
Skalpellklingen	7827702	Henry Schein
Spritzenvorsatzfilter	Z.3210745	Zefa
Stomacherbeutel mit Filtereinsatz	Separator 400	Kleinfeld Labortechnik

1.4 Reagenzien und Herstellung von Gebrauchslösungen

Tabelle 9 listet die Reagenzien und Gebrauchslösungen auf.

Tabelle 9: Zusammensetzung der verwendeten Gebrauchslösungen

Bezeichnung	Herstellung
10 x TBE Puffer	108 g Tris-Base 55 g Borsäure auf 900 ml mit Aqua dest. Auffüllen 40 ml 0,5M Na ₂ EDTA pH 8,0 auf 1 l mit Aqua dest. Auffüllen
100 bp Ladders (nach Herstellerangaben New England BioLab® Inc.) pro Einzelansatz	4 µl Nucleasefreies Wasser 1 µl 6X blue Loading Dye 1 µl DNA Ladder
Auftragspuffer für SSCP-Gele	0,04 g NaOH 0,25 g Xylene Cyanol 0,25 g Bromphenolblau 95 ml Formamid ad 5 ml Aqua dest.
Bind Silane Lösung	10 ml Ethanol (96 %ig) 100 µl Essigsäure (96 %ig) 100 µl Bind Silane
Crush & Soak-Puffer (für 50 ml)	1,927 g 0,5 M Ammoniumacetat 0,1072 g 10 mM Magnesiumacetat 0,0186 g 1 mM EDTA 0,5 ml 10%ige Stocklösung der 0,1% SDS
Entwicklerlösung für SSCP-Gele	33,75 g Na ₂ CO ₃ 1,2 ml Formaldehydlösung (37 %ig) 600 µl Natriumthiosulfat (0,2 %ig) 600 ml Aqua bidest.
Gel Loading Buffer für Agarosegel	3 g Ficoll 400 1 ml Na ₂ EDTA pH 8 (0,5 M) 0,25 ml Bromphenolblau (4 %ig) 10 ml steriles Aqua dest.
Lambda-Exonuklease-Verdau (pro Einzelansatz)	5,0 µl Nucleasefreies Wasser 8,0 µl λ-Exonuklease-Puffer (10x) 1,0 µl λ-Exonuklease (5 U/µl)
PBS-Lösung	9,55 g PBS Puffer 1,0 l steriles Aqua dest. (pH-Werte auf 7,4 einstellen)
Peptonwasser 1 %	50 g Pepton 42,5 g NaCl 5 l Aqua dest.
Sabouraud-2% Glucose-Agar ⁺	47 g Sabouraud-2 Glucose-Agar 2 g Agar-Agar 1 l Aqua dest. 10 ml Antibiotikum (Penicillin G (NBK) 400000 IE; Streptomycin (Sigma) 40 mg)
Silbernitratfärbelösung für SSCP-Gele	0,5 g AgNO ₃ 750 µl Formaldehydlösung (37 %ig) 500 ml Aqua bidest.

Fortsetzung Tabelle 9: Zusammensetzung der verwendeten Gebrauchslösungen

Bezeichnung	Herstellung
SSCP-Gellösung (MDE [®] -Konzentration 35,2%)	11,0 ml steriles Aqua bidest. 2,0 ml 10 x TBE 7,0 ml 2 x MDE [®] 16 µl Temed 40 µl APS (40 %ig)
TE Puffer	1,21 g Tris-Base 0,37 g EDTA 1,0 l Aqua dest.

1.5 Test-Primer

Die Primer bestimmen, welche DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Die Auswahl der Primer für diese Untersuchung sollte gewährleisten, dass sie nur Pilz-DNA amplifizieren, dass die PCR-Produkte klare Banden im Agarosegel bilden und dass sie sich im SSCP-Gel ausreichend trennen, um die Identifizierung von Pilz-Spezies zu ermöglichen. In dieser Untersuchung wurden insgesamt 22 Primerpaare (13 Forward-Primer und 13 Reverse-Primer) eingesetzt. Alle Primer wurden der Literatur entnommen, außer dem Reverse-Primer ITS5.8R (siehe Primerpaare Nr. 9 und 10 in **Tabelle 10** und **Tabelle 11**), dieser wurde vom Autor entwickelt (siehe Abschnitt 1.6). **Tabelle 10** stellt die verwendeten Primerpaare und ihre Annealing-Temperatur für diese Studie dar. **Tabelle 11** zeigt die Literaturquellen der verwendeten Primerpaare.

Tabelle 10: Sequenzen, Amplicongrößen und Annealing-Temperaturen der verwendeten Primerpaare

Nr.	Primer Forw./ Rev.	Sequenz (Richtung 5´- 3´)	Fragment- Größe ¹ (bp)	Annealing-Temp. (°C)	
				nach Literatur	in dieser Studie
1	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	500-650	50-62 (55-56)	56, 62²
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
2	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	250-300	55-60	60
	ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC			
3	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	315	55-56	56
	ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC			
4	ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	350-400	55-56	56
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
5	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	650-700	55	55
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
6	Fun18Sf	TGCTCTTCAACGAGGAAT	700-800	50	50
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			

Fortsetzung Tabelle 10: Sequenzen, Amplicongrößen und Annealing-Temperaturen der verwendeten Primerpaare

Nr.	Primer Forw./ Rev.	Sequenz (Richtung 5' - 3')	Fragment- Größe ¹ (bp)	Annealing-Temp. (°C) nach Literatur	in dieser Studie
7	ITS1F ITS4	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA TCCCTCCGCTTATIGATATGC	650-700	54-55	55
8	ITS1F ITS2	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA GCTGCGTTCATCGATGC	150-500	60	56, 62²
9	ITS1 ITS5.8R³	TCCGTAGGTGAACCTGCGG GAGATCCGTTGTTGAAAGTT	100-450	-	56, 62²
10	ITS1F ITS5.8R³	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA GAGATCCGTTGTTGAAAGTT	120-480	-	56, 62²
11	NSI1 NLB3	GATTGAATGGCTTAGTGAGG GGATTCTCACCTCTATGA	800-1000	60	60
12	NSI1 NLB4	GATTGAATGGCTTAGTGAGG GGATTCTCACCTCTATGAC	800-1000	60	60
13	NSI1 58A2R	GATTGAATGGCTTAGTGAGG CTGCGTTCATCGAT	250-500	60	60
14	ITS1F NLB3	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA GGATTCTCACCTCTATGA	500-800	60	60
15	ITS1F NLB4	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA GGATTCTCACCTCTATGAC	500-800	60	60
16	0817F 1536R	TTAGCATGGAATAATRRRAATAGGA ATTGCAATGCYCTATCCCCA	762	55-56	56
17	NS7 NS8	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC TCCGCAGGTTACCTACGGA	380	50-60	50
18	NS1 NS4	GTAGTCATATGCTTGTCTC CTCCGTC AATCCCTTAAAG	1100	50-60	50
19	P1 P2	ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG CCGATCCCTAGTCGGCATAG	482-503	50-68 (55-62)	62
20	FF2 FR1	GGTCTATTTGTTGGTTTCTA CTCTCAATCTGTCAATCCTTATT	425	50-55	52
21	EF4 Fung 5	GGAAGGGRTGTATTTATTAG GTAAAAGTCCTGGTTCCC	550	48-55 (48)	48
22	U1 U2	GTGAAATTGTTGAAAGGGAA GACTCCTGGTCCGTGTT	260	50	50

¹ DNA-Fragmentgröße in Durchschnitt² Primerpaare Nr. 1, 8, 9, 10: Annealing-Temperatur 56 °C für Thermocycler und 62 °C für qPCR (im LightCycler®)³ Primer ITS5.8R wurde vom Autor entwickelt

Tabelle 11: Literaturquellen und Amplifikationsregionen der verwendeten Primerpaare

Nr.	Primer (Forw./ Rev.)	Amplifikations-Region	Referenz
1	ITS1/ITS4	ITS 1&2 (18S-28S)	Bockelmann et al., 2008; Brito et al., 2009; Carvalho et al., 2005; Deak et al., 2000; Dean et al., 2005; Fujita et al., 2001; Gardes & Bruns, 1993; Hendolin et al., 2000; Korabecna, 2007; Kumar & Shukla, 2005; Leinberger et al., 2005; López et al., 2006; Luo & Mitchell, 2002; Mirhendi et al., 2006; Petersen et al., 2001; Romão et al., 2011; Rath & Ansorg, 2000; Renard et al., 2008; White et al., 1990; Wu et al., 2002
2	ITS1/ITS2	ITS 1 (18S-5.8S)	Chang et al., 2001; Kumar & Shukla, 2005; Lau et al., 2007; White et al., 1990
3	ITS5/ITS2	ITS 1 (18S-5.8S)	Martin et al., 2000 ; White et al., 1990; Wu et al., 2002
4	ITS3/ITS4	ITS 2 (5.8S-28S)	Brilo et al., 2009 ; Kumar & Shukla, 2005; Martin et al., 2000; White et al., 1990
5	ITS5/ITS4	ITS 1&2 (18S-28S)	Martin et al., 2000; White et al., 1990
6	Fun18Sf/ITS4	ITS 1&2 (18S-28S)	Pitkäranta et al., 2008; ITS4: White et al., 1990
7	ITS1F/ITS4	ITS (18S-28S)	Anderson et al., 2003; Gardes & Bruns, 1993; Manter & Vivanco, 2007; Okubo & Sugiyama, 2009; Redecker, 2000; Robinson et al., 2009; ITS4: White et al., 1990
8	ITS1F/ITS2	ITS 1 (18S-5.8S)	Okubo & Sugiyama, 2009; ITS1 & ITS2: White et al. 1990; ITS1F: Gardes & Bruns, 1993 ITS5.8R: vom Autor entwickelter Primer für diese Studie
9	ITS1/ITS5.8R	ITS 1 (18S-5.8S)	
10	ITS1F/ITS5.8R	ITS 1 (18S-5.8S)	
11	NSII/NLB3	ITS 1&2 (18S-28S)	Martin & Rygiewicz, 2005
12	NSII/NLB4	ITS 1&2 (18S-28S)	Martin & Rygiewicz, 2005
13	NSII/58A2R	ITS 1 (18S-5.8S)	Martin & Rygiewicz, 2005
14	ITS1F/NLB3	ITS 1&2 (18S-28S)	Malvárez & Oliveira, 2003; Martin & Rygiewicz, 2005
15	ITS1F/NLB4	ITS 1&2 (18S-28S)	Martin & Rygiewicz, 2005
16	0817F/1536R	18S rDNA	Anderson et al., 2003; Borneman & Hartin., 2000; Edel-Hermann et al., 2004; Hagn et al., 2003; Kumar & Shukla, 2006; Wu et al., 2002
17	NS7/NS8	18S rDNA	Peters et al., 2000; White et al., 1990
18	NS1/NS4	18S rDNA	White et al. 1990; Wu et al., 2002
19	P1/P2	18S rDNA	Aubry et al., 2006; Einsele, et al., 1997; Karakousis et al., 2006; Löffler et al., 1997; Löffler et al., 2000; Millar et al., 2000; Müller et al., 1998; Ramírez et al., 2008; Wu et al., 2002

Fortsetzung Tabelle 11: Literaturquellen und Amplifikationsregionen der verwendeten Primerpaare

Nr.	Primer (Forw./ Rev.)	Amplifikations-Region	Referenz
20	FF2/FR1	18S rDNA	Chen et al., 2002; Nieguitsila, et al., 2007; Rao et al., 2006; Wu et al., 2002; Zhou et al., 2000
21	EF4/Fung 5	18S rDNA	Anderson et al., 2003; Borneman & Hartin, 2000; Hagn et al., 2003; Hunt et al., 2004; Jørgensen et al., 2005; Marschall et al., 2003; Okubo & Sugiyama, 2009; Smit et al., 1999; van Elsas et al., 2000
22	U1/U2	28S rDNA	Sandhu et al., 1995; Wu et al., 2002

1.6 Design des Primers ITS5.8R

Der rDNA-Abschnitt ITS (Internal Transcribed Spacer: bestehend aus den Abschnitten ITS1, 5.8S rDNA und ITS2) weist bei Pilzen und Pflanzen Homologien auf. Für diese Studie wurde ein neuer Primer entwickelt, der nur den rDNA-Abschnitt ITS von Pilzen amplifiziert, nicht aber den von Pflanzen. **Abbildung 1** (im Literaturteil, Abschnitt **4.6**) zeigt den DNA-Abschnitt ITS und die Bindungsstellen einiger in dieser Studie verwendeten Primer. Der neu entwickelte Reverse-Primer ITS5.8R bindet im Abschnitt 5.8S rDNA und amplifiziert rDNA-Abschnitt ITS1.

Mit Hilfe eines Primer-Design Online-Programms (von der Firma „GenScript“ : http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/primer_genscript.cgi) und Daten aus der Genbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) wurde der Pilz-DNA spezifische Reverse-Primer ITS5.8R entwickelt. Dazu wurden insgesamt:

- 67 Pilz-Spezies mit 96 Genbank-Accession-Numbers (55 Pilz-Spezies aus den Dateien der Genbank; 12 Pilz-Spezies, die in der Versuchsphase dieser Studie isoliert und sequenziert wurden)
- 26 Pflanzen mit 31 Genbank-Accession-Numbers (18 Gewürze und 8 Getreide) auf ihre Eignung für die Amplifikation durch den neuen Primer untersucht.

Die verwendeten Sequenzen von Pilzen und Pflanzen zum Design des neuen Primers sind in **Tabelle 33** (im **Anhang 2**) dargestellt. In Genbank sind neun unterschiedliche Sequenzen des DNA-Abschnitts 5.8 rDNA (**Abbildung 2**). Die

Sequenzen 1-5 stammen von Pilzen, 6-9 von Gewürzen und Getreiden. Die Sequenz Nr. 1 entspricht den meisten überprüften Pilzarten, ihre Komplementär-Sequenz wurde als Reverse-Primer ITS5.8R ausgewählt.

GAGATCCGTTGTTGAAAGTT	Reverse Primer: ITS5.8R: Richtung 5'-3'
AACTTTCAACAACGCATCTC	Komplementär-Sequenz: Richtung 5'-3'
..... <u>T</u>	1*
..... <u>T</u>	2*
..... <u>G</u> <u>T</u>	3*
..... <u>A</u>	4*
..... <u>A</u>	5*
Sequenzen von Pilzen	
<u>G</u> ... <u>C</u> ... <u>GG</u> <u>A</u> ..	6*
<u>G</u> ... <u>C</u> ... <u>G</u> <u>A</u> ..	7*
<u>G</u> ... <u>CCTGG</u> ... <u>T</u> ... <u>A</u> ..	8*
<u>G</u> ... <u>C</u> ... <u>GG</u> ... <u>T</u> ... <u>A</u> ..	9*
Sequenzen von Pflanzen	

Abbildung 2: Primer ITS5.8R und Komplementär-Sequenzen von Pilzen und Pflanzen

- 1*** : *Acremonium* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus fumigatus*, *Candida* spp. ,
Chrysosporium spp., *Cryptococcus* spp., *Debaryomyces hansenii*, *Eurotium* spp.,
Fusarium spp., *Penicillium* spp., *Pichia* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces cerevisiae*,
Scopulariopsis spp., *Trichosporon lignicola*,
- 2***: *Aspergillus* spp.
- 3***: *Cladosporium* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Thamnidium elegans*,
Trichosporon gracile
- 4***: *Absidia* spp.
- 5***: *Yarrowia lipolytica*
- 6*** : **Gewürze**: Bohnenkraut, Karotte, Majoran, Oregano, Paprika, Piment, Rosmarin,
Thymian, Weißer Senf, Weißer Pfeffer, Zimt, Zitrone
Getreide: Gerste, Hafer, Hirse, Mais, Reis, Roggen, Sojabohne, Weizen
- 7***: Koriander, Kümmel, Sellerie
- 8***: Knoblauch, Zwiebel
- 9***: Ingwer

1.7 Proben zur Validierung

1.7.1 Pilze aus Reinkultur

Insgesamt 33 Pilz-Reinkulturen wurden zur Validierung der Nachweismethode angelegt (**Tabelle 12**), 12 stammten aus der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig), 18 aus Stammkulturen des Lehrstuhls für Tierhygiene der Technischen Universität München und 3 von Pilzen, die der Autor aus Hackfleisch isoliert hatte. Deren DNA war extrahiert und die Pilz-Spezies per Sequenzierung identifiziert worden.

Tabelle 12: Zur Validierung der Labormethode verwendete Pilz-Spezies

Nr.	Pilz-Spezies	Herkunft
Schimmelpilze: Ascomycota und Basidiomycota		
1	<i>Acremonium</i> sp.	Lehrstuhl für Tierhygiene (Futtermittel 141/1992)
2	<i>Alternaria alternata</i>	DSM 1102
3	<i>Aspergillus flavus</i>	Lehrstuhl für Tierhygiene
4	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Lehrstuhl für Tierhygiene (Futtermittel 180/1992)
5	<i>Aspergillus glaucus</i>	Lehrstuhl für Tierhygiene (Futtermittel 165/1992)
6	<i>Aspergillus niger</i>	Lehrstuhl für Tierhygiene (Futtermittel 180/1992)
7	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Lehrstuhl für Tierhygiene (Futtermittel 120/1996)
8	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Lehrstuhl für Tierhygiene
9	<i>Aspergillus terreus</i>	Lehrstuhl für Tierhygiene
10	<i>Aspergillus vesicolor</i>	DSM 1943
11	<i>Aureobasidium pullulans</i>	DSM 2404
12	<i>Cladosporium herbarum</i>	DSM 63442
13	<i>Eurotium amstelodami</i>	DSM 62629
14	<i>Eurotium rubrum</i>	DSM 62630
15	<i>Fusarium</i> sp.	Lehrstuhl für Tierhygiene (Futtermittel 35/2001)
16	<i>Penicillium chrysogenum</i> *	DSM 844
17	<i>Penicillium expansum</i>	Lehrstuhl für Tierhygiene
18	<i>Penicillium nalgiovense</i>	Lehrstuhl für Tierhygiene (Futtermittel 181/1997)
19	<i>Penicillium roqueforti</i>	Lehrstuhl für Tierhygiene
20	<i>Penicillium verrucosum</i>	Lehrstuhl für Tierhygiene
21	<i>Wallemia sebi</i>	DSM 5329
Schimmelpilze: Unterabteilung Mucoromycotina		
22	<i>Absidia glauca</i> **	Lehrstuhl für Tierhygiene
23	<i>Mucor spinosus</i> ***	Lehrstuhl für Tierhygiene
24	<i>Rhizopus oryzae</i> ***	Lehrstuhl für Tierhygiene

Fortsetzung Tabelle 12: Zur Validierung der Labormethode verwendete Pilz-Spezies

Nr.	Pilz-Spezies	Herkunft
Hefen: Ascomycota und Basidiomycota		
25	<i>Candida albicans</i>	Lehrstuhl für Tierhygiene (ATCC 102.31)
26	<i>Candida krusei</i>	DSM 70077
27	<i>Cryptococcus curvatus</i>	Isoliert aus Hackfleisch Nr.1(siehe Tabelle 15)
28	<i>Pichia membranaefaciens</i>	DSM 70366
29	<i>Rhodotorula</i> sp.	Lehrstuhl für Tierhygiene(Futtermittel 189/2001)
30	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DSM 70451
31	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DSM 4531
32	<i>Trichosporon gracile</i>	Isoliert aus Hackfleisch Nr.1 (siehe Tabelle 15)
33	<i>Yarrowia lipolytica</i> *	Isoliert aus Hackfleisch Nr.1 & Nr.2 (siehe Tabelle 15)

* *P. chrysogenum* und *Y. lipolytica* wurden als Standardspezies für die qPCR eingesetzt

** *Absidia* spp. wurde gelegentlich in der Luft nachgewiesen (Cvetnić & Pepeljnjak, 1997) und kann Fleisch kontaminieren. Deshalb wurde die Gattung *Absidia* in diese Untersuchung einbezogen.

*** *Rhizopus* spp. und *Mucor* spp. wurden von einigen Autoren in Fleischwaren gefunden. Die in dieser Arbeit eingesetzten Referenzarten kommen aber in Fleisch nicht vor. Sie wurden zur Erfassung ihrer Gattungen ausgewählt.

1.7.2 Gewürze

Die meisten hitzebehandelten Fleischprodukte sind Ferticlebensmittel und werden vor dem Erhitzen gewürzt. Aufgrund der Homologien der ITS-Region von Pilzen und Pflanzen (vgl. **1.6**) wurden die eingesetzten Primerpaare auch für die DNA einiger Pflanzen und Gewürze validiert. **Tabelle 13** listet einige regelmäßig oder gelegentlich bei der Herstellung von Fleischprodukten verwendete Gewürze auf.

Tabelle 13: Zur Validierung der Labormethode verwendete Gewürze

Nr.	Gewürze
1	Lauch (<i>Allium</i> spp.)
2	Zwiebel (<i>Allium cepa</i>)
3	Knoblauch (<i>Allium sativum</i>)
4	Zitrone (<i>Citrus limon</i>)
5	Paprika (<i>Capsicum annuum</i>)
6	Ingwer (<i>Zingiber officinale</i>)
7	Koriander (<i>Coriandrum sativum</i>)
8	Sellerie (<i>Apium graveolens</i>)

1.7.3 Fleisch und Fleischprodukte

Insgesamt 50 Proben wurden getestet. Hackfleisch- und Fleischproben Nr. 1-8 dienten zur Validierung der Labormethode. Die restlichen Proben sind hitzebehandelte Fleischprodukte aus dem Handel, abgesehen von den Proben Nr. 25 und 26 (Sojasauce). **Tabelle 14** zeigt, welchen Untersuchungen und Behandlungen die einzelnen Proben unterzogen wurden. Die frischen Fleischproben Nr. 1-8 wurden in der Versuchsphase verwendet, um die Methoden zur DNA-Extraktion und für die PCR auszuwählen und zu validieren. Die Fleischsuspensionen, die zur KbE-Bestimmung kultiviert wurden, wurden auch der DNA-Extraktion unterzogen. Teile von Proben Nr. 1-8 wurden erhitzt und anschließend der DNA-Extraktion unterzogen. Probe Nr. 3 ist ein Stückchen Schweinefleisch, das mit sterilisiertem Besteck aus dem Innern eines Stückes präpariert wurde, um das Risiko einer Kontamination mit Pilz-DNA vor der DNA-Extraktion zu reduzieren. Diese Probe diente als negative Kontrolle. Sie diente auch dem Nachweis, ob die getesteten Primerpaare tierische DNA amplifizieren. Probe Nr. 4 wurde Gamma (γ) -Strahlung ausgesetzt, um die DNA zu zerstören, und anschließend als Standard-Fleischmatrix für die qPCR verwendet. Die frischen Fleischproben Nr. 5-8 wurden – nach ihrem Einsatz zur Auswahl und Validierung der DNA-Extraktionsverfahren und der PCR – dem Verderb überlassen. Ein Teil dieser verdorbenen Proben wurde der DNA-Extraktion unterzogen, ein Teil wurde zunächst erhitzt und erst anschließend der DNA-Extraktion unterzogen. Die Beschreibung der Verfahren, denen die Proben 1–8 unterzogen wurden, findet sich in Abschnitt **2.2**. Die Proben Nr. 9-50 waren Feldproben. **Tabelle 15** listet die getesteten Proben auf.

Tabelle 14: Überblick über Behandlungen und Untersuchungen der Proben

Proben-Nr.	Gesamte Proben	Verwendung der Proben						
		Kultur (KbE)	Fleisch-suspension & DNA.Ext.	DNA-Ext.	Erhitzt & DNA-Ext.	Verderb & DNA-Ext.	Verderb & Erhitzt & DNA-Ext.	Bestrahlt & DNA-Ext.
1- 3	3	√	√	√	√	-	-	-
4	1	√	√	√	√	-	-	√
5- 8	4	√	√	√	√	√	√	-
9-50*	42	-	-	√	-	-	-	-

* Probe 25 und 26 sind Sojasaucen

Tabelle 15: Untersuchte Proben

Nr.	Beschreibung / Herkunft
Frisches Fleisch: zur Validierung der Labormethode	
1	Hackfleisch (Schweine- & Rindfleisch), abgepackt (Vinzenz Murr)
2	Hackfleisch (Schwein), abgepackt (Kaufhof-Galleria)
3	Schweinefleisch, 500 g Stück (Metzgerei in Freising)
4	Hackfleisch (Schweine- & Rindfleisch), abgepackt (Vinzenz Murr)
5	Hackfleisch (Schwein), frisch (Karstadt)
6	Hackfleisch (Rind), frisch (Karstadt)
7	Hackfleisch (Schwein), frisch (Kaufhof-Galleria)
8	Hackfleisch (Schweine- & Rindfleisch), frisch (Kaufhof-Galleria)
Pasteurisierte Fleischprodukte¹:	
9	Leberkäs (Haudek / Aldi)
10	Lyoner (Schmälzle / Aldi)
11	Schinkenwurst (Schmitz / Galleria)
12	Jagdwurst (Schmitz / Galleria)
13	Pumuckl's Wiener Gewurstl (Vinzenz Murr)
14	Leberkäs (Vinzenz Murr: Tengelman)
15	Kalb fleischwurst: (Vinzenz Murr: Tengelman)
16	Bio-Schinkenwurst fein (Altdorfer Biofleisch: Tengelman)
17	Leberkäs (Sieber: Rewe)
18	Lyoner (Wilhelm Brandenburg: Rewe)
19	Bio-Fleischkäse (Rewe-Bio: Rewe)
20	Würstchen (Ja!: Rewe)
21	Leberkäs (Metzgerfrisch: Lidl)
22	Lyoner (Gebirgsjäger: Lidl)
23	Wiener Würstchen (Dulano: Lidl)
Proben mit hoher Nachweiswahrscheinlichkeit	
24	Speck Knödel: Semmelknödel mit Räucherspeck: Pfanni
25	Natürlich gebraute Sojasauce: Kikkoman
26	Thin Soy Sauce Formula 1: Healthy Boy Brand
Sterilisierte Fleischprodukte (Dosenwurst)²:	
27	Eisbeinfl eisch in Aspik: Dreisterne
28	Eisbeinfl eisch in Aspik: Simon
29	Schinkenwurst: Dietz
30	Lyoner: Dietz
31	Lyoner Bio: Rewe
32	BIO Lyoner. Biolance: Zimmermann
33	Jagdwurst: Eifel
34	Jagdwurst: Müller
35	Jagdwurst: Lutz
36	Bierwurst: Lutz
37	Bierwurst: Eidmann
38	Original Nürnberger Rostbratwürste: Wolf
Sterilisierte Fleischprodukte (Dosenwurst): „Hausmacherwurst“^{3,4}	
39	Rotwurst: Landmetzgerei Oliver Holzheid, Hofheim
40	Fleischkäse: Landmetzgerei Oliver Holzheid, Hofheim
41	Schinkenwurst: Landmetzgerei Oliver Holzheid, Hofheim
42	Bratwurstteig: Landmetzgerei Oliver Holzheid, Hofheim

Fortsetzung Tabelle 15: Untersuchte Proben

Nr.	Beschreibung / Herkunft
Sterilisierte Fleischprodukte (Dosenwurst): „Hausmacherwurst“^{3,4}	
43	Weißer Presssack: Landmetzgerei Oliver Holzheid, Hofheim
44	Leberkäs nach urzünftiger Art: Schäbitz (Hermann Schäbitz GmbH), München
45	Hausmacher Leberwurst: Metzgerei Franz Rühl, Schwabach
46	Bratwurstgehäck: Metzgerei Franz Rühl, Schwabach
47	Gekochte Mettwurst: Schlemmermeyer: München
48	Schinken Rotwurst: Schlemmermeyer: München
49	Thalheimer Stadtwurst: Thalheimer Bauernwurst Deuerlein GmbH, Gebertshofen
50	Oma's Bratwurstgehäck (hergestellt aus schlachtwarmen Fleisch): Thalheimer Bauernwurst Deuerlein GmbH, Gebertshofen

¹ Aus Supermärkten, angegebene Haltbarkeit bis zu einem Monat bei Lagerung unter +8 °C.

² Aus Supermärkten, angegebene Haltbarkeit bis zu 3 Jahre, Lagerung bei Zimmertemperatur

³ Angegebene Haltbarkeit bis zu 3 Jahre, Lagerung bei Zimmertemperatur

⁴ Die Proben 44 bis 50 stammen vom Münchner Viktualienmarkt

2 Methoden

2.1 Kulturelles Nachweisverfahren

2.1.1 Pilz-Kulturen aus Fleischproben

Pilze wurden aus den Fleischproben Nr. 1-8 auf Sabouraud Dextrose Agar mit Antibiotika (SAB⁺, siehe **Tabelle 9**) kultiviert und ihre DNA extrahiert. Die Zielsetzungen dieser Aufgabe waren:

- die Validierung der DNA-Extraktionsmethode und der PCR
- die Identifizierung von Pilzarten in Hackfleisch: Einer der kultivierten Pilze wurde als Standard-Spezies für die qPCR verwendet.
- die Bestimmung der Pilz-KbE pro Gramm Fleisch

Zwei Kulturverfahren wurden angewandt: die Spread-Plate- und die Direct-Plate-Methode

Spread-Plate-Methode: (nach Deak und Beuchat, 1996 und nach der Arbeitsanleitung des Instituts für Tierhygiene):

10 g zerkleinertes Fleisch wurden in einen Stomacherbeutel eingewogen, 90 ml 1%iges Pepton-Wasser zugegeben (siehe **Tabelle 9**) und im Stomacher für 1 min geschüttelt (Suspension A). Die Fleischsuspensionen A wurden direkt zur DNA-Extraktion verwendet. Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl wurden die Suspensionen in sechs Schritten (von 10⁻¹ bis 10⁻⁶) verdünnt (**Tabelle 16**).

Tabelle 16: Verdünnungsreihe von Fleischsuspension

Röhrchen	A	B	C
Vorlage (Peptonwasser 1 %)		9 ml	9 ml
Zugabe		1 ml aus A	1 ml aus B
<i>Jeweils vor dem Überpipettieren gut durchmischen</i>			
Verdünnung	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Auf SAB ⁺ Agar geben und ausstreichen	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Entspricht einer tatsächlichen Verdünnung von	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}

Aus jeder Verdünnungsreihe wurden Proben auf zwei Petrischalen mit SAB⁺ Agar ausgestrichen. Nach dem Ausstreichen wurden die Platten bei Zimmertemperatur 3-7 Tage inkubiert. Die Kolonien wurden am dritten und noch mal am fünften Inkubationstag ausgezählt. Die Anzahl der Kolonien wurde entsprechend der Verdünnungsstufe in Sporen pro Gramm Fleisch umgerechnet. Nach der Zählung der Kolonien wurden verschiedene Einzelkolonien auf SAB⁺ Agar subkultiviert und wieder bei Zimmertemperatur 7-10 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Sporen mit 5-10 ml bidest. Wasser geerntet.

Direct-Plate-Methode (Samson et al., 2000): Diese Methode wurde nur bei den Fleischproben Nr. 1-3 angewendet. Das Fleisch wurde zu Stückchen von ≤ 3 mm Durchmesser zerkleinert und zu jeweils 5 – 10 Stückchen direkt auf SAB⁺ Agar Platten gegeben. Die Platten wurden bei Zimmertemperatur über 7-10 Tage inkubiert. Unterschiedliche einzelne Kolonien wurden auf SAB⁺ Agar subkultiviert und wieder bei Zimmertemperatur 7-10 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Sporen mit 5-10 ml bidest. Wasser geerntet.

2.1.2 Pilzkulturen aus Reinkultur und KbE-Bestimmung

Pilz-Spezies (siehe **Tabelle 12**) wurden auf Sabouraud Dextrose Agar mit Antibiotika (SAB⁺, siehe **Tabelle 9**) subkultiviert und bei Zimmertemperatur (~ 25 °C) 7-14 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Sporen mit 5-10 ml bidest. Wasser geerntet. Diese wurden als Referenz-Standard für DNA-Extraktion, Primerauswahl und SSCP verwendet. In den Sporenproben, die als Referenz-Standard für die qPCR bestimmt waren, wurde vor dem Ansetzen der Verdünnungsreihe die Gesamtkeimzahl pro ml bestimmt, und zwar direkt nach der Ernte. Das sollte vermeiden, dass subletale und durch Einfrieren und Auftauen geschädigte Sporen später zu einem KbE (Kolonie bildende Einheit) Wert führen, der die wirkliche Anzahl der Sporen unterschätzt.

KbE-Bestimmung: Von den Pilzarten *P. chrysogenum* und *Y. lipolytica* (siehe **Tabelle 12**), die als Standard-Spezies für die qPCR vorgesehen waren, wurden Suspensionen mit 1×10^3 bis 1×10^8 KbE pro ml angesetzt. Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl pro ml erfolgte ebenfalls mit der Spread-Plate-Methode. In diesem Fall wurden 1 ml Sporen in bidest. Wasser (Suspension A) in 9 ml PBS (siehe **Tabelle 9**) überführt, daraus wurde eine Verdünnungsreihe in sechs Schritten (von 10^{-1} bis 10^{-6}) angesetzt (siehe **Tabelle 17**). Aus jeder Verdünnungsreihe wurden Proben auf zwei Petrischalen mit SAB⁺ Agar ausgestrichen. Die Kolonien wurden am dritten und noch mal am fünften Inkubationstag ausgezählt. Die Anzahl der Kolonien wurde entsprechend der Verdünnungsstufe in Sporen pro ml umgerechnet.

Tabelle 17: Verdünnungsreihe aus Reinkultur zur KbE-Bestimmung

Röhrchen	A	B	C
Vorlage (PBS)		9 ml	9 ml
Zugabe		1 ml aus A	1 ml aus B
<i>Jeweils vor dem Überpipettieren gut durchmischen</i>			
Verdünnung	10^0	10^{-1}	10^{-2}
Auf SAB ⁺ Agar geben und ausstreichen	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Entspricht einer tatsächlichen Verdünnung von	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}

2.2 Behandlung der Proben zur Validierung der Methode

2.2.1 Erhitzung von Fleischproben

Diese Studie untersucht hitzebehandelte Fleischprodukte. Deshalb mussten die PCR- und SSCP-Befunde von erhitztem und frischem Fleisch verglichen werden um zu validieren, ob auch die erhitzten Pilze in den Proben noch nachgewiesen werden können. Nach Krämer (1997) und Weber (2003) werden hitzebehandelte Wurstwaren, z. B. Brühwürste (Weißwurst, Gelbwurst, Lebekäse, Bierwurst) und Kochwurst, bei unterschiedlichen Temperaturen gegart oder erhitzt, je nach der Art des Produkts. Die Kerntemperatur erreicht in solchen Produkten während der Hitzebehandlung nur 70-75 °C. Deshalb wurde ein Verfahren gewählt, bei dem jeweils 50 mg Fleisch (Fleischproben Nr. 1-8: siehe **Tabelle 14** und **Tabelle 15**) in ein Eppendorf-Gefäß eingewogen und im Wasserbad bei 90 °C für 1 Stunde erhitzt wurde. Diese erhitzten Fleischproben wurden zur DNA-Extraktion verwendet.

2.2.2 Verderb von Fleischproben

Jede Pilzart hat eigene Ansprüche und kann unter unterschiedlichen Umgebungsbedingungen wachsen. Verdorbenes Fleisch bietet andere Bedingungen als frisches Fleisch – Bedingungen, unter denen manche Pilze möglicherweise besser gedeihen. Zur Prüfung dieser Hypothese hat der Autor einige Hackfleischproben (Fleischproben 5-8: siehe **Tabelle 14** und **Tabelle 15**) verderben lassen. Dazu wurden 10 g Fleisch in ein 15 ml Röhrchen eingewogen. Der Deckel wurde nur locker aufgesetzt, damit die Sauerstoffzufuhr erhalten blieb, dann wurden die Röhrchen bei Zimmertemperatur (~25 °C) für 72 Stunden inkubiert. Zur DNA-Extraktion oder zur Erhitzung wurden Einzelproben von jeweils 50 mg eingewogen. Die Ergebnisse wurden mit denen von frischem rohem Fleisch verglichen.

2.2.3 Bestrahlung von Fleischproben

Die quantitative Bestimmung der Ziel-DNA-Menge in einer Probe mit der qPCR beruht auf dem Abgleich mit einem Referenz-Standard. Die Quantifizierung der Pilz-DNA in den Proben erforderte daher den Ansatz einer entsprechenden Verdünnungsreihe von Pilz-Sporen als Referenz-Standard. Da die DNA-Amplifikation in biologischen Proben von der Matrix des Probenmaterials und materialspezifischen PCR Inhibitoren beeinflusst wird, mussten die Bedingungen der Referenzproben exakt denen der Untersuchungsproben entsprechen. Im biologischen Material der Referenzprobe wurde daher zunächst die vorhandene DNA per Bestrahlung zerstört. Dann wurde die Probe künstlich mit Pilz-Sporen kontaminiert. Zur Herstellung dieser Proben wurden jeweils 50 mg Hackfleisch (Hackfleischprobe Nr. 4, siehe **Tabelle 15**) mit 250 mg Glass Beads in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß eingewogen und einer Gamma-Bestrahlung von 200 Kilogray (kGy) ausgesetzt. Die Bestrahlung erfolgte bei der Firma „Isotron Deutschland GmbH“, Allershausen. Die bestrahlten Fleischproben durchliefen eine DNA-Extraktion und eine qualitative PCR mit sechs verschiedenen Primerpaaren (Primerpaare Nr. 1, 9, 10, 18, 19, 20, siehe **Tabelle 10**) um sicher zu stellen, dass keinerlei amplifizierbare DNA mehr vorhanden war. Erst danach wurden die Proben künstlich kontaminiert.

2.2.4 Künstliche Kontaminierung von Fleischproben mit Pilzsporen

Zur künstlichen Kontaminierung wurden jeweils 50 mg Fleisch in einem Eppendorf-Röhrchen mit 5 µl aus einer Verdünnungsreihe von 1×10^3 bis 1×10^8 Sporen pro ml versetzt. Dabei wurde jeweils eine 50 mg Fleischprobe mit Mengen von 5 bis 5×10^5 Sporen versetzt. Das entspricht einer Anzahl von 1×10^2 bis 1×10^7 Sporen pro Gramm Fleisch (siehe **Tabelle 18**). Die künstlich kontaminierten bestrahlten Fleischproben dienten als Referenz-Standard für die qPCR.

Um den Einfluss einer Hitzebehandlung zu validieren, wurden bestrahlte Fleischproben mit den Kontaminationsstufen 10^5 , 10^6 und 10^7 Sporen/g erhitzt (siehe Abschnitt **2.2.1**) und die DNA extrahiert, um die Menge der nachgewiesenen Pilz-DNA mit den nicht erhitzten Proben zu vergleichen.

Tabelle 18: Sporenanzahl pro Verdünnungsreihe und pro 50 mg Fleisch

	Sporenanzahl					
Verdünnungsreihe von Standard-Spezies (Sporen pro 1 ml)	1×10^8	1×10^7	1×10^6	1×10^5	1×10^4	1×10^3
5 µl von Verdünnungsreihe zu 50 mg Fleisch (Sporen pro 50 mg Fleisch)	5×10^5	5×10^4	5×10^3	5×10^2	5x10	5x1
Entspricht Sporen pro 1 g Fleisch	1×10^7	1×10^6	1×10^5	1×10^4	1×10^3	1×10^2

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 DNA-Extraktionsmethoden

Geprüft wurden vier verschiedene Extraktionskits, die mit drei unterschiedlichen Probenmengen (50, 100, 250 mg) beladen wurden. Ziel war, festzustellen, welche Extraktionsmethode mit welchem Probengewicht zu den besten Ergebnissen führt. Die Durchführung der Extraktion erfolgte nach Angaben des jeweiligen Herstellers. Zwei zusätzliche Zell-Lyse-Schritte wurden eingefügt, um die Effizienz der DNA-Extraktionsmethode zu optimieren. Der erste bestand aus der Behandlung mit 250 mg Glass Beads, um die Zellwand der Pilz-Sporen zu spalten (Haugland et al. 2002). Im zweiten zusätzlichen Schritt wurden die Proben mit dem Enzym Lyticase inkubiert (400 Units pro Probe, 37 °C über eine Stunde) um die komplexe Zellmembran aufzuschließen (Karakousis et al., 2006). Die folgenden Kits wurden getestet und ihre Ergebnisse verglichen. Hierbei war nicht

die quantitative Ausbeute an DNA vorrangig; Auswahlkriterium war vielmehr die Anzahl und Intensität der Banden in der anschließenden PCR-SSCP-Analytik.

Kit 1: High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science)

(Aubry et al., 2006; Schabereiter-Gurtner et al., 2007)

Kit 2: QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) (Ramírez et al., 2008)

Kit 3: GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) (Halliday et al., 2005)

Kit 4: DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) (Fredlund et al., 2008)

Folgende Proben wurden zur Auswahl des DNA-Extraktions-Kits eingesetzt:

- Pilz-Reinkulturen (20 Spezies)
- Fleischproben (Nr. 1 und Nr. 2: Frisches Hackfleisch): naiv und mit 10^3 Sporen/Probe von jeweils *A. flavus*, *Cl. herbarum*, *E. rubrum* und *P. chrysogenum* künstlich kontaminiert.

Nach der Auswahl des DNA-Extraktions-Kits wurde dieses auf folgende Proben angewandt

- Pilz-Reinkulturen (33 Spezies)
- Fleischproben (Vorversuche, Proben 1-8)
- Fleischsuspension mit Peptonwasser (Vorversuche, Proben 1-8)
- künstlich mit Pilz-Sporen kontaminierte Fleischproben (Standard für qPCR)
- Pflanzenproben (8 Proben)
- Fleischproben aus dem Handel (40 Proben)
- Sojasauce (2 Proben)

Jede Probe wurde zweimal die DNA-Extraktion, außer den Pilzen aus Reinkultur, die nicht als Standard für die qPCR eingesetzt wurden und lediglich eine Extraktion durchliefen. Die DNA-Eluate wurden gemischt und weiter für PCR und PCR-SSCP verwendet. Hier wird nur die Anwendung des DNA-Extraktions-Kits Nr. 4 (DNeasy Blood and Tissue Kit) zusammen mit Glass Beads und dem Enzym Lyticase beschrieben. Die Beschreibungen der Anwendungen der anderen Kits befinden sich im **Anhang 1**.

DNA-Extraktions-Methode mit Kit 4: DNeasy Blood and Tissue Kit

Vorbereitung des Kits vom Typ „50 Präparat“: Den Puffern AW1 und AW2 jeweils 96-100 %igen Alkohol zufügen, Menge nach Herstellerangaben.

Reinkultur

+ 250 mg Glass Beads + 100 µl Sporen-Suspension

- ↓
- Schütteln in TissueLyser II, 30 Hz, 1 min
 - Vortexen 5-10 sec

+ 100 µl Puffer ATL (Tissue Lysis Puffer)

+ 400 Units (U) Lyticase (20 µl)

- ↓
- Vortexen 5-10 sec, kurz zentrifugieren (5 sec bei 8000 x g)
 - Inkubation bei 37 °C, 60 min
 - Vortexen 5-10 sec

+ 200 µl Puffer AL (Lysis Puffer)* + 20 µl Proteinase K (600 mAU/ml)

- ↓
- Vortexen 5-10 sec
 - Inkubation bei 70 °C 10 min in Wasserbad

+ 200 µl Ethanol (96-100 %)

- ↓
- Vortexen 5-10 sec
 - Überführung der 500 µl Flüssigkeit in DNeasy Mini Spin Column
 - Zentrifugation: 8000 x g über 1 min**
 - Durchfluss- und Collection-Tube verwerfen
 - DNeasy Mini Spin Column in neue Collection Tube (mitgeliefert) überführen

+ 500 µl Puffer AW1

- ↓
- Zentrifugation: 8000 x g, 1 min
 - Durchfluss und Collection Tube verwerfen
 - DNeasy Mini Spin Column in neue Collection Tube (mitgeliefert) überführen

+ 500 µl Puffer AW2

- ↓
- Zentrifugation: 8000 x g, 1 min
 - Durchfluss verwerfen
 - DNeasy Mini Spin Column zurück in dieselbe Collection Tube
 - Zentrifugation: 16000 x g, 2 min
 - Durchfluss und Collection Tube verwerfen
 - DNeasy Mini Spin Column in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß

+ 200 µl Puffer AE

- ↓
- Inkubation bei Zimmertemperatur (~ 25 °C) 1 min
 - Zentrifugation: 8000 x g, 1 min
 - ▼ - DNeasy Mini Spin Column verwerfen

DNA liegt im Eluat vor; Aufbewahrung bei +2 bis +8 °C oder bei -20 °C für 2 Jahre (Anchordoquy und Molina, 2007) oder bis zu 8 Jahren möglich (Kasper und Lenz, 2004)

Fleischproben, Pflanzenproben und künstlich kontaminierte Fleischproben

50 mg Probe zerkleinern und in 2 ml Reaktionsgefäß geben (zur künstlichen Kontamination: + 5-10 µl Pilz-Sporen-Suspension)

+ 250 mg Glass Beads, + 200 µl Puffer ATL

- ↓
- Schütteln in TissueLyser II, 30 Hz, 1 min
 - Zentrifugation: 16000 x g, 30 sec
 - ▼ - Vortexen 5-10 sec

+ 20 µl Proteinase K (600 mAU/ml)

- ↓
- Vortexen 5-10 sec
 - Inkubation bei 56 °C über 1,5 - 2 h*** (in Eppendorf-Thermomixer)

+ 400 Units Lyticase (20 µl)

- ↓
- Vortexen 5-10 sec, kurz zentrifugieren (5 sec, 8000 x g)
 - ▼ - Inkubation bei 37 °C, 60 min

+ 200 µl Puffer AL (Lysis Puffer)*

- ↓
- Vortexen 5-10 sec
 - ▼ - Inkubation bei 70 °C über 10 min in Wasserbad

+ 200 µl Ethanol (96-100 %), Waschen und Eluieren wie bei der DNA-Extraktionsmethode für Reinkultur

Fleischsuspension

0,5 ml und 1,0 ml Fleischsuspension in ein 2-ml-Reaktionsgefäß geben, in das schon 250 mg Glass Beads eingewogen wurden

↓
- Zentrifugation: 10000 x g, 10 min

↓
Überstand 0,3 ml von 0,5 ml Probe und 0,8 von 1,0 ml Probe abpipettieren und verwerfen (es verbleiben 200 µl pro Probe)

↓
- Schütteln in TissueLyser II, 30 Hz, 1 min

- kurz zentrifugieren (5 sec, 8000 x g)

↓
- Vortexen 5-10 sec

+ 200 µl Puffer ATL + 20 µl Proteinase K (600 mAU/ml)

↓
- Vortexen 5-10 sec

- Inkubation bei 56 °C über 1 h in Eppendorf-Thermomixer mit 500 rpm, während der Inkubation 2-3 Mal pro Stunde vortexen

+ 400 Units Lyticase (20 µl)

↓
- Vortexen 5-10 sec, kurz zentrifugieren (5 sec, 8000 x g)

↓
- Inkubation bei 37 °C, 60 min

+ 200 µl Puffer AL (Lysis Puffer)*

↓
- Vortexen 5-10 sec

↓
- Inkubation bei 70 °C über 10 min in Wasserbad

+ 200 µl Ethanol (96-100 %), Waschen und Eluieren wie bei der DNA-Extraktionsmethode für Reinkultur

* *Nachdem Puffer AL zugefügt wurde, war gelegentlich ein weißes Präzipitat zu sehen, welches sich nach der Inkubation bei 70 °C löste.*

** *Wenn die Flüssigkeit nicht aus der DNeasy Mini Spin Column gewichen war, wurde erneut zentrifugiert (mit Geschwindigkeit 16000 x g, 2 min)*

*** *Oder bis das Fleisch komplett verdaut war (bei Pflanzen dauerte die Inkubation 1,5 h, da sie nicht komplett verdaut wurden); während der Inkubation 2-3 Mal pro Stunde vortexen.*

2.3.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die Thermocycler-PCR wurde zum Nachweis von Pilz- bzw. Pflanzen-DNA eingesetzt, indem ein PCR-Mastermix-Ansatz von 25 µl Gesamtvolumen verwendet wurde. Dazu wurde jeweils zu 24,0 µl Mastermix 1,0 µl extrahierte DNA gegeben. Für die PCR-SSCP-Methode wurde ein Mastermix mit einem Gesamtvolumen von 50 µl im 3-fach Ansatz (150 µl) verwendet (**Tabelle 19**). **Tabelle 20** zeigt das verwendete PCR-Protokoll für den Thermocycler. Alle Primerpaare wurden nach diesem Protokoll eingesetzt.

Tabelle 19: Ansatz für den PCR-Mastermix

Mastermix	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Ansatz	Volumen (µl) pro Einzelansatz	
1. Nukleasefreies Wasser	-	-	20,37	40,75
2. 10x Puffer(mit MgCl ₂)	15 mM	1,5 mM	2,5	5,0
3. dNTP mix	je 10 mM	200 µM	0,5	1,0
4. Forward Primer	50 µM	0,5 µM	0,25	0,5
5. Reverse Primer	50 µM	0,5 µM	0,25	0,5
6. Hotstart Polymerase	5 U/µl	-	0,13	0,25
7. DNA Probe	-	-	1,0	2,0
Gesamtvolumen			25	50

Tabelle 20: PCR-Protokoll zur Amplifizierung eines Pilz-DNA-Fragments

PCR-Ablauf	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklus
1 Einleitende Denaturierung	95	15 min	1
2 Denaturierung	94	45 sec	} 35 Zyklen
3 Annealing	Siehe Tabelle 10	1 min	
4 Elongation	72	1 min*	
5 Terminale Elongation	72	10 min	1
6 Pause	10	Pause	-

* Primerpaar Nr. 21 (EF4/Fung5): 3 min

2.3.3 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

Die SSCP-Analyse ist ein molekularbiologisches Fingerprintverfahren, das Sequenz-Unterschiede erkennbar macht. Es ist insbesondere geeignet, die Zusammensetzung komplexer mikrobiologischer Gemeinschaften zu differenzieren. **Abbildung 3** bietet einen Gesamtüberblick über dieses Verfahren, das in den weiteren Punkten näher beschrieben wird.

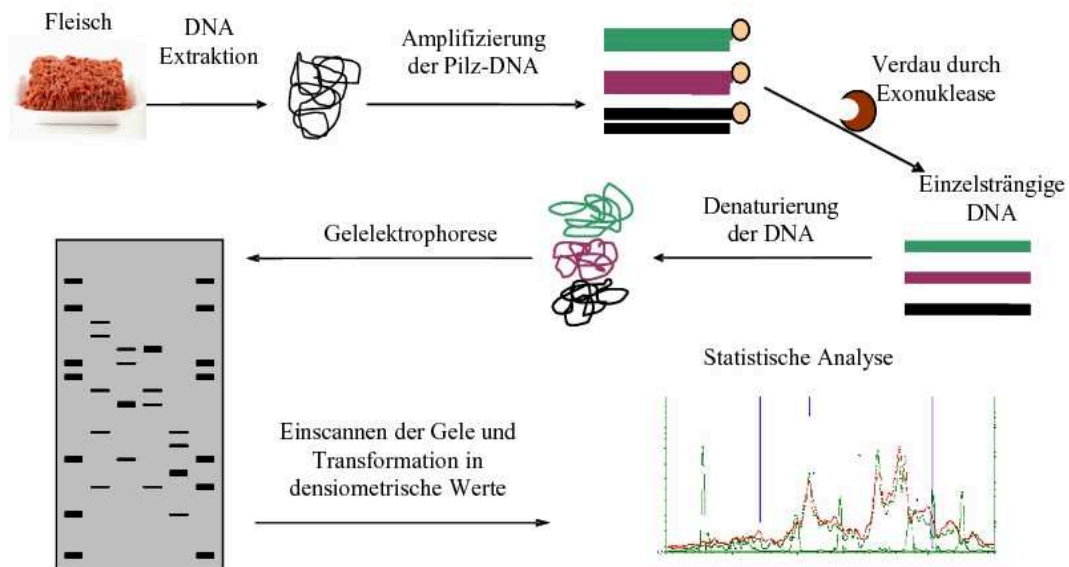


Abbildung 3: Prinzip der PCR-SSCP-Analyse

Der Reverse-Primer, der DNA Proben für das SSCP-Verfahren amplifiziert, ist an seinem 5'-Ende phosphoryliert. Die PCR wird im dreifachen Ansatz (50 µl pro Ansatz) durchgeführt, um eine für die folgenden Schritte ausreichende Menge an Amplifikat zu gewinnen (Abschnitt 2.3.2). Die doppelsträngige DNA der PCR-Produkte wird aufgereinigt (Abschnitt 2.3.7) und quantifiziert (Abschnitt 2.3.8). Danach wird die DNA auf identische Konzentrationen eingestellt und vom Enzym Lambda-Exonuclease zu Einzelsträngen verdaut (Abschnitt 2.3.9). Die einzelsträngige DNA wird aufgereinigt (Abschnitt 2.3.10), mit Auftragspuffer auf Polyacrylamid-Gel aufgetragen und in eine Elektrophoresekammer verbracht (Abschnitt 2.3.11).

Nach abgeschlossener Elektrophorese wird das Gel mit Silbernitrat gefärbt (Abschnitt 2.3.12), um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen. Die unterschiedliche Sekundär-Struktur der einzelsträngigen Pilz-DNA führt zu unterschiedlichen Laufweiten der Banden im Gel. Die Laufweite in der Elektrophorese hängt zudem von der Fragmentgröße der DNA-Stränge und der Konzentration der MDE[®]-Lösung ab. Das angefärbte Gel wurde in der vorliegenden Studie gescannt und mittels GelCompar[®]-II ausgewertet. Um die Pilz-Spezies zu identifizieren wurden einzelne Banden aus dem SSCP-Gel ausgeschnitten und aufgereinigt, erneut PCR-amplifiziert, wieder aufgereinigt und anschließend extern sequenziert (Abschnitt 2.3.13).

2.3.4 Agarosegelelektrophorese

Die horizontale Gelelektrophorese dient der Auftrennung und Erkennung der Produkte der DNA-Amplifizierung. Hierzu wurde 1%iges Agarosegel gegossen, in das mit Hilfe eines Kammes Taschen geprägt wurden. Zur Herstellung wurde 1 g Agarose in 100 ml 0,5x TBE Puffer in der Mikrowelle geschmolzen und 3,6 µl Ethidiumbromid (gesättigte Lösung) zugefügt. Ethidiumbromid lagert sich zwischen den Basenpaaren der DNA ein (interkaliert) und wird durch Anregung unter UV-Licht sichtbar. Nach der Polymerisierung des Gels wurde ein Gemisch aus 8 µl des PCR-Produkts und 2 µl Ladepuffer in die Taschen aufgetragen. Die äußersten Taschen wurden jeweils mit 6 µl einer Lösung von 100-bp-skaliertes DNA (Ladder) als Referenzstandard beladen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 200 V, einer Laufzeit von 45 min und 0,5x TBE-Puffer als Laufpuffer. Die Herstellung des TBE-Puffers und des 100 bp-Ladders sind in **Tabelle 9** beschrieben.

2.3.5 Aufreinigung der DNA aus Agarosegel

Bei der Untersuchung von Fleischproben bildeten die PCR-Produkte von einigen Primerpaaren mehrere DNA-Banden im Agarosegel. Um die Pilzarten zu identifizieren wurden die Banden mit einem Skalpell unter UV Licht ausgeschnitten. Danach wurden sie mittels „Qiaquick Gel Extraction Kit“ (Quiagen) aufgereinigt bevor sie per PCR weiter amplifiziert wurden. Die reamplifizierten PCR-Produkte wurden weiter aufgereinigt (siehe Abschnitt **2.3.7**) und sequenziert. Das Protokoll dieser Aufreinigung ist im folgenden Ablaufschema dargestellt.

Herausschneiden der Banden aus Agarosegel (Skalpell)

Wiegen der Gelstücke in 1,5 ml Reaktionsgefäß

+ 300 µl Buffer QG pro 100 mg Gel

↓ - Inkubation: 10 min, 50 °C; alle 2-3 min leicht vortexen

100 µl Isopropanol pro 100 mg Gel

↓ - Vortexen

Überführung der Flüssigkeit in High Pure Filter Tube

(eingesetzt in 2 ml Collection Tube)

↓ - Zentrifugation: 17900 x g, 1 min

↓ - Durchfluss verwerfen

+ 500 µl Buffer QG (um das restliche Gel zu entfernen)



- Zentrifugation: 17900 x g, 1 min
- Durchfluss verwerfen

+ 750 µl Buffer PE



- Zentrifugation: 17900 x g, 1 min
- Durchfluss verwerfen
- Zentrifugation: 17900 x g, 1 min
- Filter Tube in neues 1,5 ml Reaktionsgefäß stellen

+ 30 µl Puffer EB



- Inkubation 1 min
- Zentrifugation: 17900 x g, 1 min
- Filter Tube verwerfen

Amplifizierte DNA liegt im Eluat vor

2.3.6 Zweite PCR für die gereinigte DNA aus Agarosegel

Nach der Aufreinigung der DNA aus Agarosegel war die DNA-Menge generell nicht ausreichend für weitere Analysen wie die SSCP-Methode oder die Sequenzierung. Daher wurde die aufgereinigte DNA durch eine zweite PCR erneut amplifiziert, um die benötigte DNA-Menge zu gewinnen. Die Menge der eluierten DNA nach der Aufreinigung war zwar gering, aber zu hoch um direkt in den PCR-Ansatz gegeben zu werden (Mello et al., 1999; Redecker, 2000; Thomsen und Jensen, 2002). Um schmierende Banden im Agarosegel zu vermeiden und klare Banden zu erzielen wurde die eluierte DNA mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Einem Mikroliter eluierter DNA wurden 199 µl nucleasefreies Wassers zugefügt (Verdünnung 1:200). PCR-Ablauf, Reagenzien und Bedingungen entsprachen exakt der im Abschnitt 2.3.2 bereits beschriebenen PCR. Die PCR-Produkte der zweiten PCR wurden aufgereinigt, bevor sie sequenziert wurden oder die SSCP-Methode durchliefen.

2.3.7 Aufreinigung der PCR-Produkte

Nach vollendetem Elektrophorese-Lauf wurden die PCR-Produkte mit dem „GenElute™ PCR Clean-Up Kit“ (Sigma) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Dieser Schritt diente der Entfernung von restlichen Primern und anderen Verunreinigungen. Vor Beginn der Aufreinigung wurden der Wash Solution 48 ml 100 %igen Ethanol zugefügt. Zur Vorbereitung der GenElute Miniprep

Binding Columns wurden 500 µl Column Preparation Solution in die Binding Column pipettiert und die Säule bei 13000 x g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Das Protokoll ist im folgenden Ablaufschema dargestellt:

Poolen von drei PCR Proben in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß

+ 5 faches Volumen der Binding Solution



- Vortexen

Überführung des gesamten Ansatzes in die vorbereitete GenElute Miniprep

Binding Column



- Zentrifugation: 13000 x g, 1 min

- Durchfluss verwerfen

+ 500 µl Wash Solution



- Zentrifugation: 13000 x g, 1 min

- Durchfluss verwerfen

- Zentrifugation: 16000 x g, 2 min

- Durchfluss und Collection Tube verwerfen

Binding Column in neues 2,0 ml Reaktionsgefäß (mitgeliefert) überführen



+ 50 µl Elution Solution



- Inkubation bei Raumtemperatur 1 min

- Zentrifugation: 13000 x g, 1 min

- Verwerfen der Binding Column

Amplifizierte DNA liegt im Eluat vor

2.3.8 Quantifizierung der DNA Konzentration

Die Quantifizierung der DNA-Konzentration erfolgte mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer. Das Ergebnis wurde in ng/µl angegeben. Diese quantitative Bestimmung ist erforderlich, da zur Vergleichbarkeit der Proben im SSCP-Gel die gleiche Menge an DNA aufgetragen werden sollte. Zur quantitativen Bestimmung wurden 2 µl der gereinigten PCR-Produkte direkt auf den unteren Mess-Sockel pipettiert. Die Messeinheit dieses Geräts besteht aus zwei optischen Glasfaserkabeln. Das erste ist unter dem Messsockel eingebaut. Ein zweites, das im oberen Messsockel eingebaut ist, wurde in Kontakt mit der Probe gebracht. Aufgrund der Oberflächenspannung der Probe entsteht eine Flüssigkeitssäule, die den Messweg bestimmt. Als Lichtquelle dient eine Xenon-

Blitzlampe, die einen Lichtstrahl durch die Probe schickt. Der Grad der Absorption des Lichtes durch den DNA Gehalt wird im Spektrophotometer gemessen und mit Hilfe einer speziellen Software auf dem Computer dargestellt. Des Weiteren wurde das Absorptionsverhältnis von 260nm/280nm automatisch berechnet. Dieses sollte bei 1,8 liegen und lässt Rückschlüsse auf die Reinheit der DNA zu. Anschließend wurde die DNA-Konzentration der Probe auf 400 ng in 26 μ l für den Lambda-Exonuclease-Verdau eingestellt, indem diese mit einer entsprechenden Menge an nukleasefreiem Wasser verdünnt wurde.

2.3.9 Lambda-Exonuclease-Verdau

Da im SSCP-Gel einzelsträngige DNA analysiert wird, müssen alle vorhandenen doppelsträngigen DNA-Moleküle mit dem Enzym Lambdanuclease (λ) zu einzelsträngiger DNA verdaut werden. Der Phosphatrest am 5'-Ende des Reverse-Primers dient als Angriffspunkt für die Lambda-Exonuclease. Dabei wird der phosphorylierte DNA Strang in 5'-3' Richtung selektiv verdaut und die doppelsträngige DNA in einzelsträngige überführt. Für die Durchführung des Verdau wurde den jeweils auf 400 ng/26 μ l verdünnten Lösungen von PCR-Produkten 14 μ l des Ansatzes für den Lambda-Exonuclease-Verdau hinzugegeben. Wenn die DNA-Menge nicht ausreichte, weil manche Fleischproben nur wenig Pilz-DNA enthielten, wurden 26 μ l der aufgereinigten PCR-Produkte unverdünnt verwendet und 14 μ l des Ansatzes für den Lambda-Exonuclease-Verdau hinzugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch mehrmaliges Invertieren miteinander vermengt, kurz zentrifugiert und bei 37 °C für 45 min inkubiert. Den Ansatz für den Lambda-Exonuclease-Verdau stellt **Tabelle 9** dar.

2.3.10 Aufreinigung der einzelsträngigen DNA

Nach dem Lambda-Exonuclease-Verdau wurde die einzelsträngige DNA mittels „GenElute™ PCR Clean-Up Kit“ (Sigma) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Dieser Schritt diente dem Abbruch des Verdau und der Entfernung der Exonuclease und vorhandener Abbauprodukte. Das Protokoll folgte dem der Aufreinigung der PCR-Produkte (siehe Abschnitt **2.3.7**). Der einzige Unterschied war, dass die einzelsträngige DNA statt mit 50 μ l mit 20 μ l Elution Solution eluiert wurde.

2.3.11 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Vor der Herstellung des Polyacrylamid-Gels wurden die zwei Glasplatten zunächst mit 70%igem Ethanol gründlich gereinigt, die Deckplatte mit 1 ml Repel-Silane und die Trägerplatte mit 1 ml Bind Silane (**Tabelle 9**) eingerieben und für ca. 5 min getrocknet. Repel Silane erleichtert das spätere Ablösen des Gels von der Deckplatte. Anschließend erfolgte der Zusammenbau der Gelapparatur nach Anleitung der Firma Peqlab. Danach wurde die Polyacrylamid-Gellösung für SSCP hergestellt (**Tabelle 9**).

Die Gellösung wurde zwischen die beiden Glasplatten gegossen und der Kamm im noch flüssigen Gel positioniert. Nach ca. 2 Stunden war das Gel auspolymerisiert und konnte in die Elektrophorese-Kammer eingespannt werden, die danach mit einem 1x TBE-Puffer gefüllt wurde. Der Kamm wurde entfernt und die Taschen mit 1x TBE-Puffer gründlich gespült, um Gel-Reste zu beseitigen.

Zur Vorbereitung der Probe wurden 20 µl gereinigte einzelsträngige DNA-Lösung mit 10 µl SSCP-Auftragspuffer (**Tabelle 9**) gemischt, danach bei 95 °C für 5 min inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Mit diesem Schritt sollte eine eventuell entstandene Fehlfaltung aufgehoben und die natürliche Faltung wieder hergestellt werden. Dieser Schritt ist notwendig, da die Auftrennungen der Banden im Gel von den Faltungen der DNA-Einzelstränge abhängen. Die Sekundärstruktur ist abhängig von der Nucleotidabfolge und sich ergebenden intramolekularen Basenpaarungen. Nach ca. 10 min Lagerung der Proben auf Eis konnte das Gel mit bis zu 17 Proben von jeweils 9 µl und mit 3 Speziesstandard Referenzproben (je 9 µl) beladen werden. Anschließend wurde an das SSCP-Gel eine Spannung von 400 V bei einer Stromstärke von 300 mA und einer Leistung von 50 W angelegt. Die Lauftemperatur wurde konstant bei 20 °C gehalten. Die Laufzeit war abhängig von der Größe der PCR-Produkte und der Konzentration der MDE[®]-Lösung. Wenn die MDE[®]-Konzentration und/oder die DNA-Fragmentgröße sehr hoch sind, erfordert dies längere Laufzeiten. Bei einer MDE[®]-Konzentration von 35,2 % ist beispielsweise die optimale Laufzeit 22 h 30 min für PCR-Produkte von Primerpaar ITS1/ITS4 (Fragmentgröße von 350-880 bp) und 6 h für PCR-Produkte von Primerpaar ITS1/ITS5.8R (Fragmentgröße 110-420 bp)

2.3.12 Silbernitratfärbung

Nach der abgeschlossenen Elektrophorese wurde das Gel mit Silbernitrat gefärbt, um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen. Die Glasplatten wurden vorsichtig auseinander gehoben. Die Glasplatte, auf der das Gel durch das Bind-Silane haftete, wurde mit Silbernitrat gefärbt. Das Protokoll der Silbernitratfärbung ist im folgenden Ablaufschema dargestellt:

Glasplatte mit dem Gel:

In 500 ml 10%ige Essigsäure legen

↓ - 30 min im Dunklen bei 100 rpm auf dem Schüttler

Essigsäure entfernen

↓

Waschschritte mit bidest. Wasser (um die restliche Essigsäure zu entfernen)

↓ - 5 min im Dunklen bei 100 rpm auf dem Schüttler

Bidest. Wasser entfernen (Waschschritt 3-mal wiederholen)

↓

In 500 ml frisch angesetzte Färbelösung (siehe **Tabelle 9**) legen

↓ - 30 min im Dunkeln bei 100 rpm auf dem Schüttler

Färbelösung abschütten und die Überreste durch Spülen mit bidest. Wasser (20 sec) entfernen (2 Mal wiederholen)

↓

In 200 ml Entwicklerlösung (siehe **Tabelle 9**) legen, kurz schwenken, dann die Lösung entfernen

↓

In 400 ml Entwicklerlösung legen, bis zur gewünschten Farbintensität

↓

In 500 ml 10%ige Essigsäure für 4 min legen um die Entwicklung zu stoppen

↓

Für 30 min in Aqua bidest. überführen

↓

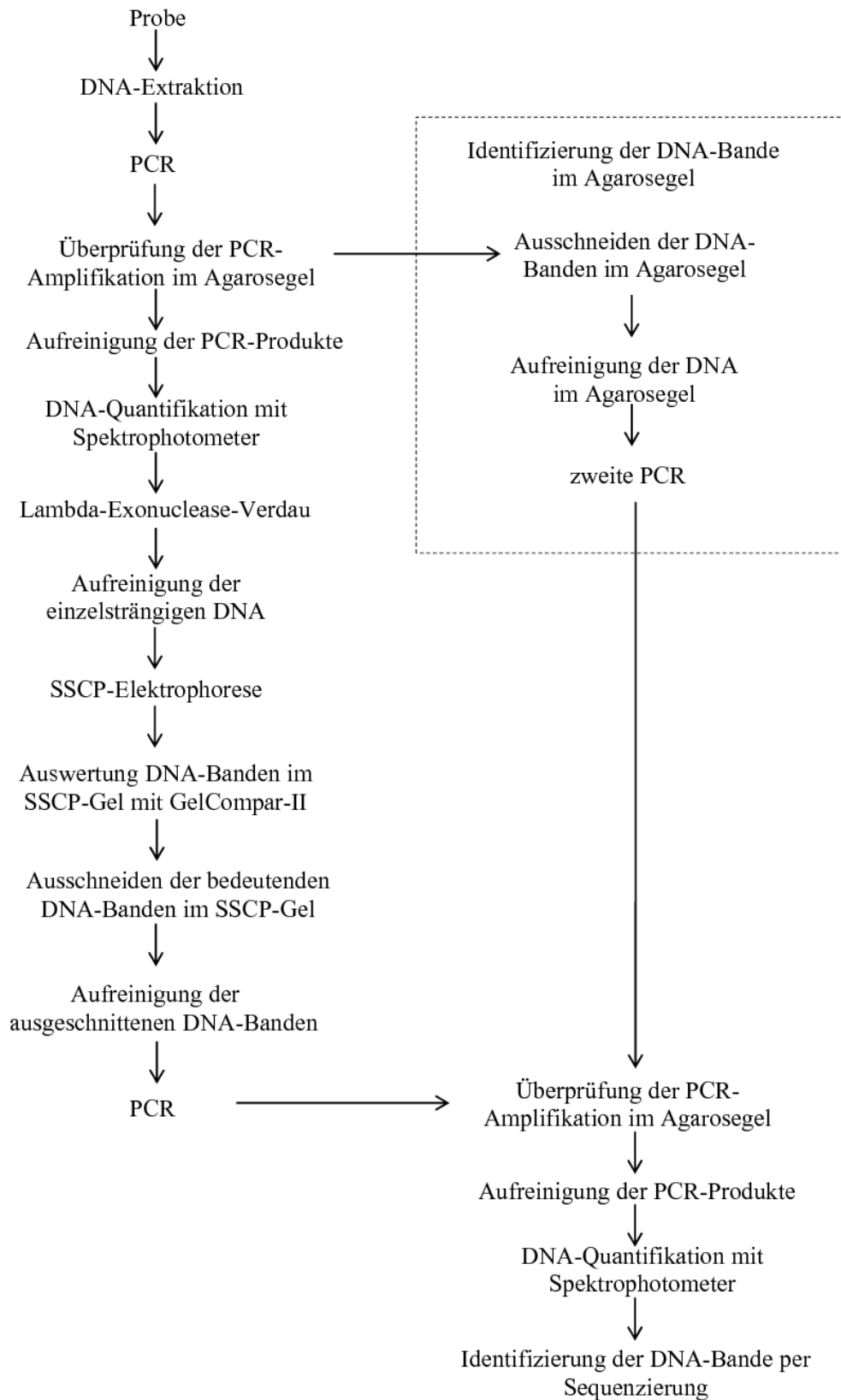
Unter dem Abzug für etwa 24 Stunden trocknen

2.3.13 Elution der DNA aus dem Polyacrylamidgel

Die zur Sequenzierung vorgesehenen DNA-Banden in Polyacrylamidgel (SSCP-Gel) wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in das mit 50 µl Crush & Soak-Puffer (**Tabelle 9**) gefüllte Eppendorf-Gefäß überführt. Vor dem Ausschneiden weiterer Banden wurde das Skalpell mit Ethanol gereinigt. Das Eppendorf-Gefäß mit der DNA-Bande wurde 3 Stunden bei 37 °C und 800 rpm in einem Thermomixer inkubiert. Danach wurden 40 µl der Lösung entnommen, mit 80 µl Ethanol 100 % versetzt und bei -20 °C über mindestens 3 Stunden oder über Nacht präzipitiert. Nach der Präzipitation wurden jeder Probe 2 µl Glycogen (20 mg/ml) zugegeben und 15 min bei 24000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 20 µl TE-Puffer (**Tabelle 9**) gelöst. Die Lösung durchlief ohne Verdünnung direkt die PCR. Nach der PCR-Amplifikation wurden die PCR-Produkte aufgereinigt, bevor sie sequenziert wurden, um die Pilzarten zu identifizieren. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma „Sequiserie GmbH“, Vaterstetten.

2.3.14 Ablauf der PCR-SSCP-Methode

Der Ablauf der PCR-SSCP-Methode und der DNA-Aufreinigung aus Agarosegel zur Identifizierung der Pilz-DNA ist im Folgenden schematisch dargestellt:



2.3.15 Real-Time-PCR (qPCR) mit SYBR-Green-I

Die Pilz-DNA wurde per Real-Time-PCR (Quantitative PCR: qPCR) mit SYBR-Green-I im LightCycler[®] (Roche Applied Science) quantifiziert. Quantitative PCR-Verfahren erlauben die Quantifizierung der PCR-Produkte, indem sie den Anstieg der DNA-Menge in ein Fluoreszenzsignal übersetzen. Im Falle der qPCR mit SYBR-Green-I beruht dieses Fluoreszenzsignal auf der Fähigkeit von SYBR-Green-I, in doppelsträngige DNA zu interkalieren. Der Farbstoff SYBR-Green-I lagert sich hierbei in jede doppelsträngige DNA ein und wird in dieser Interkalierung fluoreszent. Deshalb trägt auch die Gegenwart unspezifischer doppelsträngiger PCR-Produkte (z. B. Primer-Dimere) zum Ausmaß der Fluoreszenz bei. Im Vergleich zu den anderen qPCR-Verfahren gilt qPCR mit SYBR-Green-I daher als weniger spezifisch. In dieser Studie wurde die qPCR mit SYBR-Green-I verwendet, da nicht nur eine Pilz-Spezies, sondern alle Pilzarten, die sich in den Proben bzw. Fleischprodukten befinden, nachgewiesen werden sollten. Die Verwendung spezifischer DNA-Sonden war daher nicht möglich.

Vier Primerpaare (Primerpaar Nr. 1, 8, 9, 10) wurden für die Standard-Spezies (*P. chrysogenum* und *Y. lipolytica*) verwendet, um die Methode und das PCR-Verfahren zu validieren. Primerpaar Nr. 9: ITS1/ITS5.8R wurde später auch zur Quantifizierung der Pilz-DNA in Feldproben verwendet. Das Primerpaar Nr. 1 (ITS1/ITS4) wurde zur Optimierung der PCR-Konditionen (Annealing-Temperatur) und des PCR-Ansatzes (Mastermix- und DNA-Volumen) für die qPCR verwendet. Die Annealing-Temperatur von 62 °C wurde zuerst ausgewählt. Dann wurden der Mastermix-Ansatz und die DNA-Menge für diese Temperatur optimiert, indem unterschiedliche MgCl₂ Konzentrationen von 3 bis 5 mM, die Primer Konzentrationen 0,5 vs. 1,0 µM und DNA-Templates von 1, 2, 3, 4 µl pro Ansatz getestet wurden. Der Ansatz für den Mastermix der qPCR ist in **Tabelle 21** dargestellt; dieser optimierte Ansatz wurde für alle Primerpaare und Proben verwendet. **Tabelle 22** stellt das PCR-Protokoll für die qPCR dar.

Tabelle 21: Ansatz für den qPCR-Mastermix

Komponenten	Stock	Ansatz	Volumen (μl) pro Einzelansatz
1 PCR-H ₂ O	-	-	3,0
2 MgCl ₂	25 mM MgCl ₂	4,0 mM	1,6
3 Forward Primer	50 μM	1,0 μM	0,2
4 Reverse Primer	50 μM	1,0 μM	0,2
5 Mastermix (mit SYBR-Green-I)	10 mM MgCl ₂	1,0 mM	1,0
6 DNA-Template	-	-	4,0
Gesamtvolumen			10,0

Tabelle 22: qPCR -Protokoll zur Amplifizierung eines Pilz-DNA-Fragments

Programm	Cycle	Type	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Time	Rate	Acquisition
1 Denaturierung	1	Regular	95	10 min.	20	None
2 Amplifikation	40	Quantification	95	10 sec	20	None
			62	10 sec	20	None
			72	*	20	Single
3 Melting	1	Melting	95	5 sec	20	None
			62	10 sec	20	None
			99	0 sec	0,1	Continuous
4 Cooling	1	Regular	40	30 sec	20	None

* Primerpaar Nr. 1 (ITS1/ITS4): 25 sec; Nr. 8 (ITS1F/ITS2): 15 sec; Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R) und Nr. 10 (ITS1F/ITS5.8R): 12 sec

2.3.16 Untersuchung der Korrelation von per Kultur ermittelter KbE-Anzahl und den mittels qPCR gemessenen CP-Werten

Die mittels qPCR untersuchten Fleischproben Nr. 1-8 wurden zusätzlich auch kulturell untersucht, um die KbE-Zahl pro Gramm Fleisch zu bestimmen und mit den Ergebnissen der DNA-Quantifizierung zu vergleichen. Der KbE-Wert pro Gramm Fleisch wurde in $\log_{10}\text{KbE/g}$ konvertiert. **Tabelle 23** zeigt die konvertierten Werte für die Standard-Spezies *Y. lipolytica*. Der sogenannte Slope (Steigung), also die Differenz der CP-Werte (CP: Crossing-Point) zwischen den einzelnen Stufen ($1,0 \log_{10}\text{KbE}$) der Verdünnungsreihe von 10^2 bis 10^7 Sporen/g Fleisch belief sich im Durchschnitt auf 3,35 PCR-Zyklen bei Primerpaar Nr. 1 (ITS1/ITS4) und auf 3,37 PCR-Zyklen bei Primerpaar Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R) (siehe Ergebnis-Teil).

Tabelle 23: Konversion von CP-Werten in KbE/g bzw. \log_{10} KbE/g Fleisch für die Standard-Spezies *Y. lipolytica*

KbE/g Fleisch (Sporen)	Entspricht \log_{10} KbE/g	CP von Std. <i>Y. lipolytica</i>	
		Primerpaar Nr.1	Primerpaar Nr.9
1×10^2	2,00	29,43	30,18
1×10^3	3,00	27,56	27,87
1×10^4	4,00	24,01	24,53
1×10^5	5,00	20,55	20,88
1×10^6	6,00	16,62	16,77
1×10^7	7,00	12,70	13,32
PCR-Zyklen-Unterschied zwischen Verdünnungsstufen im Durchschnitt		3,35	3,37

Tabelle 24 zeigt die Korrelation zwischen $\Delta \log_{10}$ KbE/g (KbE-Äquivalent) und der Anzahl der PCR-Zyklen (errechnet nach **Tabelle 23**).

Tabelle 24: Korrelation zwischen $\Delta \log_{10}$ KbE/g und der Anzahl der PCR-Zyklen (nach Tabelle 23)

$\Delta \log_{10}$ KbE/g	CP-Unterschied (PCR-Zyklen)		$\Delta \log_{10}$ KbE/g	CP-Unterschied (PCR-Zyklen)	
	Primerpaar Nr. 1	Primerpaar Nr. 9		Primerpaar Nr. 1	Primerpaar Nr. 9
1,00	3,35	3,37	0,50	1,68	1,69
0,95	3,18	3,20	0,45	1,51	1,52
0,90	3,02	3,03	0,40	1,34	1,35
0,85	2,85	2,86	0,35	1,17	1,18
0,80	2,68	2,70	0,30	1,01	1,01
0,75	2,51	2,53	0,25	0,84	0,84
0,70	2,35	2,36	0,20	0,67	0,67
0,65	2,18	2,19	0,15	0,50	0,51
0,60	2,01	2,02	0,10	0,34	0,34
0,55	1,84	1,85	0,05	0,17	0,17

Ein Berechnungsbeispiel: Für Primerpaar Nr. 1 beträgt der CP-Wert der mit 10^4 Sporen von *Y. lipolytica* /g Fleisch künstlich kontaminierten Standard-Probe 24,01 PCR-Zyklen (KbE von 4,00 log/g, **Tabelle 23**). Die Feldprobe erreicht einen CP-Wert von 26,02, entsprechend dem KbE-Äquivalent von 3,40 log/g. Der CP-Wert-Unterschied zwischen Standard- und Feldprobe beträgt 2,01 Zyklen, das entspricht einem Faktor von 3,98 oder 0,60 log-Stufen (**Tabelle 24**). Die Feldprobe mit dem höherem CP-Wert enthält weniger DNA, ihr KbE-Äquivalent ist entsprechend niedriger.

IV ERGEBNISSE

1 Auswahl der DNA-Extraktionsmethode

Zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit der unterschiedlichen DNA-Extraktionsmethoden wurde von jeder Probe eine Endpunkt-PCR (Primerpaar Nr. 1 = ITS1/ITS4, Annealing Temperatur 56 °C, 35 Zyklen) durchgeführt. Von den Amplifikaten wurde die DNA-Menge mittels Nano-Drop-Verfahren bestimmt; im Anschluss wurden SSCP-Gele angefertigt (vgl. Methodenteil, Abschnitt 2.3)

Die verwendeten DNA-Extraktions-Kits (Kit 1: High Pure PCR Template Preparation Kit; Kit 2: QIAamp DNA Mini Kit; Kit 3: GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit; Kit 4: DNeasy Blood and Tissue Kit) dienen nach Herstellerangaben zur Extraktion tierischer DNA. Dazu reicht ein Fleischgewicht von 10-50 mg in der Probe aus. In dieser Studie wurden diese Kits eingesetzt, um die kontaminierende Pilz-DNA im Fleisch zu extrahieren. Deshalb musste zunächst getestet werden, ob das Fleischgewicht von 50 mg pro Probe tatsächlich ausreicht, oder ob größere Mengen (100 bzw. 250 mg) erforderlich sind.

Zunächst ist festzuhalten, dass mit allen vier Extraktions-Kits in Vorversuchen DNA von 20 verschiedenen Pilzarten extrahiert werden konnte. Der anschließende Vergleich der Ergebnisse der DNA-Extraktion aus Fleischproben von 250 mg, 100 mg und 50 mg ergab folgende Tendenz: je höher das Fleischgewicht, desto weniger DNA konnte extrahiert und amplifiziert werden.

Abbildung 4 zeigt, dass mit den Eluatens der DNA-Extraktions-Kits 1 und 3 mehr DNA durch die PCR produziert werden konnten. Allerdings fiel bei der Auswertung von naiven und mit Pilzarten künstlich kontaminierten Hackfleischproben auf, dass die SSCP-Analyse von Kit Nr. 4 zu mehr und teilweise auch intensiveren Bande führte (**Abbildung 5** und **Abbildung 6**).

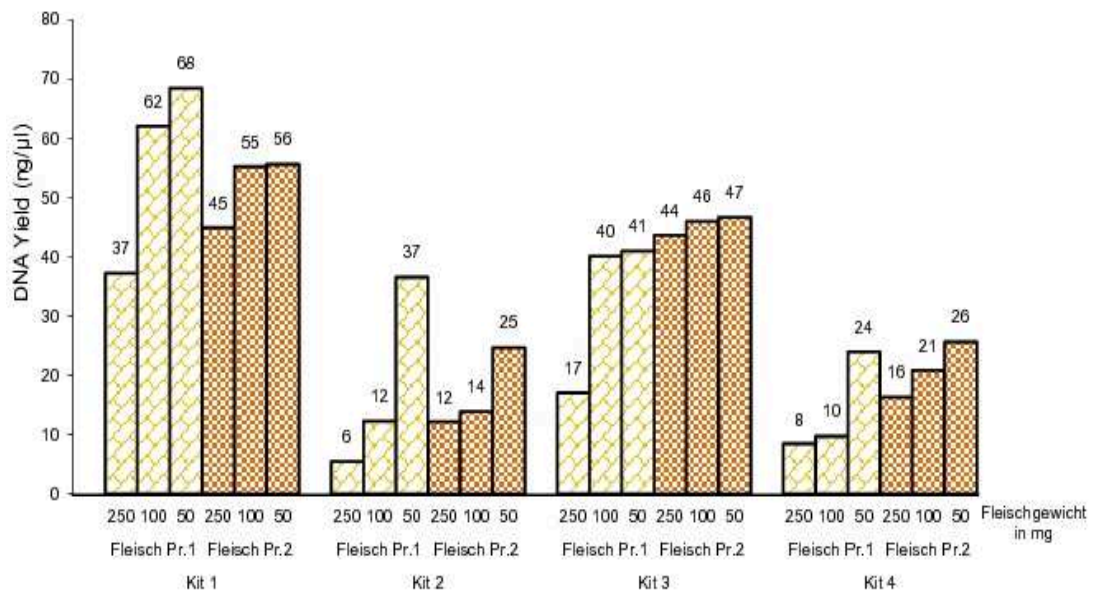


Abbildung 4: DNA-Konzentration (ng/µl), gemessen mit NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer: Vergleich zwischen 4 Kits und 3 Probengewichten (Primerpaar Nr. 1, ITS1/ITS4)

Untersuchungsmaterial: Probe 1: Rinder- und Schweinehackfleisch, Probe 2: Schweinehackfleisch



Abbildung 5: SSCP-Ergebnis von Hackfleischproben (50 mg, nicht künstlich kontaminiert) nach Anwendung unterschiedlicher DNA-Extraktions-Kits

DNA-Extraktions-Kits: **K1:** High Pure PCR Template Preparation Kit, **K2:** QIAamp DNA Mini Kit, **K3:** GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit, **K4:** DNeasy Blood and Tissue Kit

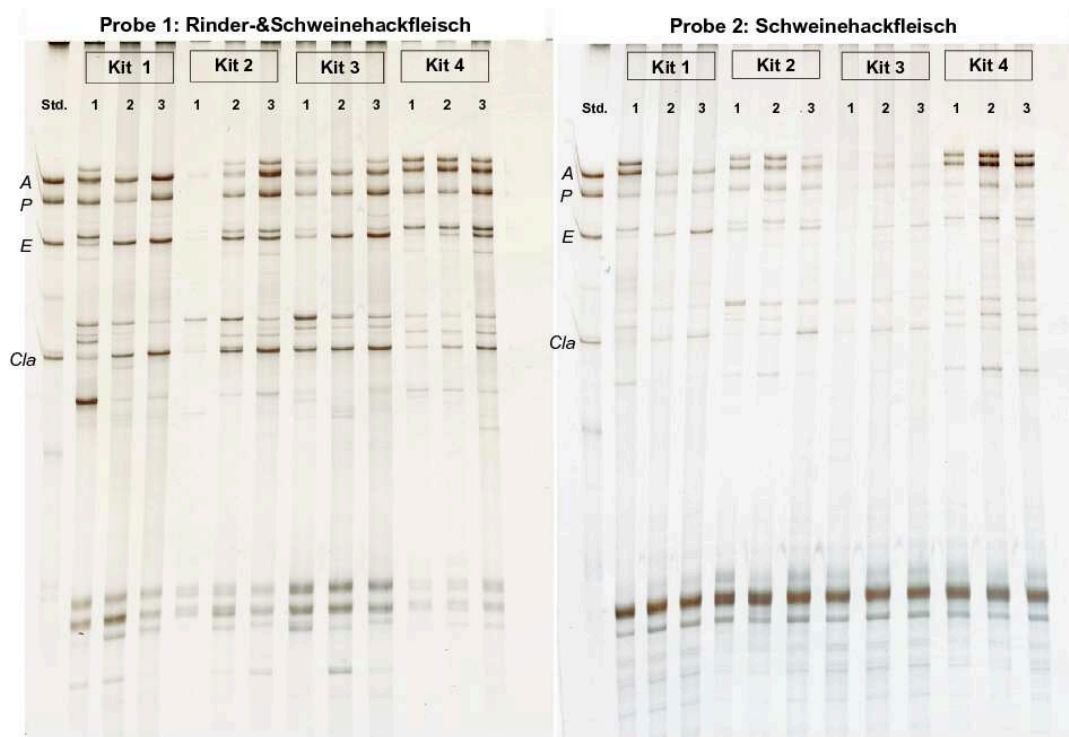


Abbildung 6: SSCP-Ergebnisse von künstlich mit Pilz-Sporen kontaminierten Hackfleischproben nach Anwendung unterschiedlicher DNA-Extraktions-Kits

Fleischproben 1&2 wurden mit 1×10^3 Sporen pro Probe künstlich kontaminiert, jeweils *A. flavus* (**A**), *Cl. herbarum* (**Cl**a), *E. rubrum* (**E**) und *P. chrysogenum* (**P**); **1**: Fleisch 250 mg, **2**: Fleisch 100 mg, **3**: Fleisch 50 mg

Anmerkung: Fleisch nicht bestrahlt, daher Banden aus Begleitflora

Vor allem die Resultate der Analyse von kontaminiertem Schweinefleisch wiesen auf die Unterlegenheit der Kits 1, 2 und 3 hin. Da jedoch die Qualität der SSCP-Gele ausschlaggebend für den erfolgreichen Einsatz des Verfahrens sind, wurden der Extraktions-Kit 4 und das Fleischprobengewicht von 50 mg für die weiteren Untersuchungen dieses Projekts ausgewählt.

2 Überprüfung von Primerpaaren und Primerauswahl

2.1 PCR-Amplifikation im Thermocycler

Zur Auswahl der Primer wurde DNA aus den Proben verwendet, die mit dem DNA-Extraktions-Kit 4 „DNeasy Blood and Tissue Kit“ zusammen mit Glass Beads und dem Enzym Lyticase extrahiert wurden. Insgesamt wurden 22 Primerpaare getestet.

Jedes der 22 Primerpaare wurde an jeweils 19 Proben getestet. Proben Nr. 1-8 sind Pilze aus Reinkultur, Nr. 9-16 sind Gewürze und Nr. 17-19 entsprechen den Fleischproben 1-3. Nr. 19 (= Fleischprobe 3) ist eine aus der Tiefe eines 500 g

Stücks Muskelfleisch (Schwein) aseptisch gewonnene Probe. Diese Probe diene als negative Kontrolle. Sie diene auch dem Nachweis, ob die getesteten Primerpaare tierische DNA amplifizieren. Die bei diesen Untersuchungen erzielten Ergebnisse sind exemplarisch in **Abbildung 7** und zusammenfassend in **Tabelle 25** dargestellt. Die detaillierten Resultate aller 22 getesteten Primerpaare können dem **Anhang 3.1** entnommen werden.

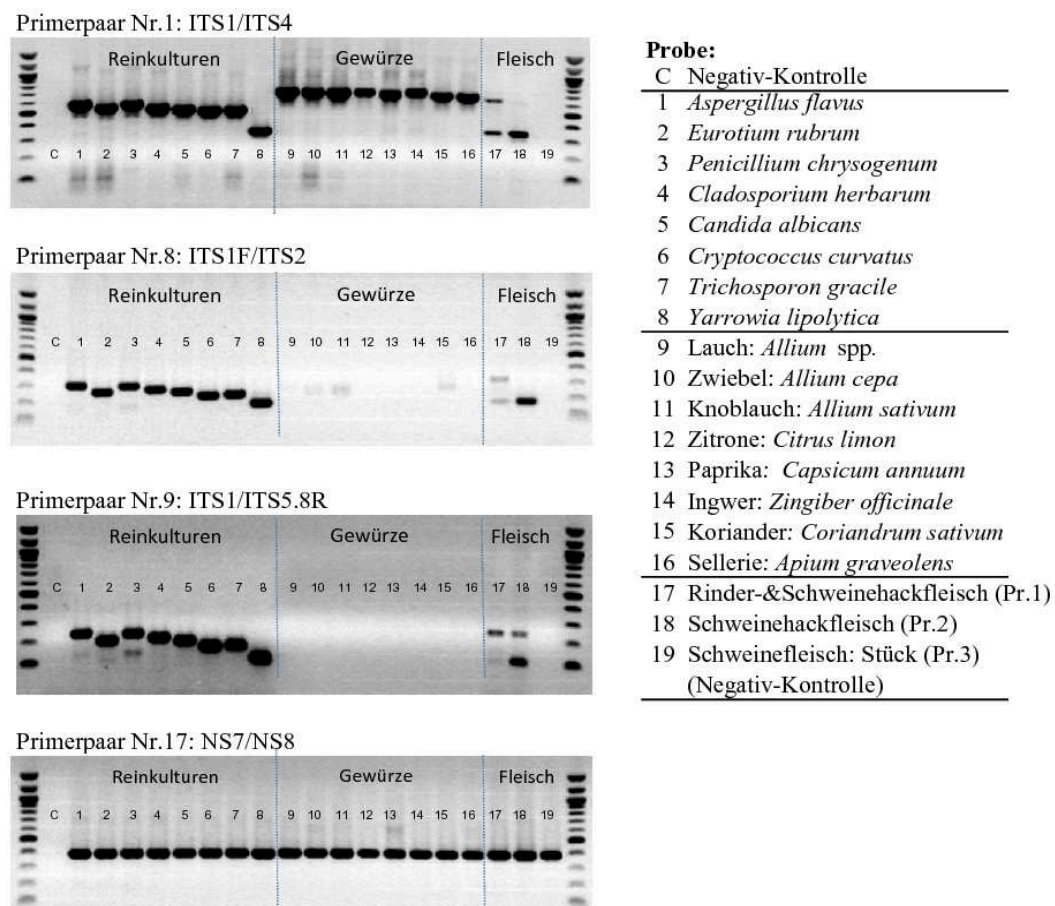


Abbildung 7: Überprüfung der PCR-Produkte der Primerpaare Nr. 1, 8, 9 und 17 im Agarosegel. Proben: Pilze, Gewürze und Fleisch

Insgesamt ist festzustellen, dass sich Primer 1-6 sowie 17 und 18 nicht bewährten, da sie auch pflanzliche DNA amplifizierten. Das gilt möglicherweise auch für die Primerpaare 8, 13, 19, 20, 21 und 22. Ob deren sehr schwache Banden tatsächlich das Resultat einer Amplifikation pflanzlicher DNA oder aber einer Kontamination mit Pilz-DNA während der Proben-Vorbereitung waren, wurde nicht geklärt. Die Primerpaare 11, 12, 14, 15, 16, 20 und 21 konnten die DNA einiger der getesteten Pilz-Stämme nur eingeschränkt amplifizieren. Mit den Primerpaaren 16, 17, 18 und 21 konnte tierische DNA nachgewiesen werden. Somit erwiesen sich die Primerpaare 7, 9 und 10 für die weiteren Untersuchungen uneingeschränkt als „nutzbar“.

Tabelle 25: Primer-Vergleich: Ergebnisse der PCR-Amplifikation im Agarosegel; Proben: Pilze, Gewürze und Fleisch

Nr. Probe		Primerpaar/ Amplifikation-Region																					
		ITS															18S rDNA					28S	
		Universal Primer						Pilz-DNA spezifische Primer									Universal Primer						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
2	<i>Eurotium rubrum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3	<i>Penicillium chrysogenum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
4	<i>Cladosporium herbarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
5	<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
6	<i>Cryptococcus curvatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
7	<i>Trichosporon gracile</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
8	<i>Yarrowia lipolytica</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
9	Lauch: <i>Allium</i> spp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
10	Zwiebel: <i>Allium cepa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
11	Knoblauch: <i>Allium sativum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
12	Zitrone: <i>Citrus limon</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
13	Paprika: <i>Capsicum annum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
14	Ingwer: <i>Zingiber officinale</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
15	Koriander: <i>Coriandrum sativum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
16	Sellerie: <i>Apium graveolens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
17	Rinder-&Schweinehackfleisch (Pr.1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
18	Schweinehackfleisch (Pr.2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
19	Schweinefleisch: Stück (Pr.3)*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Nr. Primers

1	ITS1 / ITS4	12	NSI1 / NLB4
2	ITS1 / ITS2	13	NSI1 / 58A2R
3	ITS5 / ITS2	14	ITS1F / NLB3
4	ITS3 / ITS4	15	ITS1F / NLB4
5	ITS5 / ITS4	16	0817F / 1536R
6	Fun18Sf/ITS4	17	NS7 / NS8
7	ITS1F / ITS4	18	NS1 / NS4
8	ITS1F / ITS2	19	P1 / P2
9	ITS1 / ITS5.8R	20	FF2 / FR1
10	ITS1F/ITS5.8R	21	EF4 / Fung5
11	NSI1 / NLB3	22	U1 / U2

 = Gründe, aus denen die Primerpaare **nicht geeignet** für diese Studie sind

+ = erzeugen gut sichtbare DNA-Bande in Agarosegel |

+/- = erzeugen schwache DNA Bande

- = keine DNA Bande in Agarosegel

* = Negativ-Kontrolle

Auf der Basis der in **Tabelle 25** dargestellten Ergebnisse wurden 6 Primerpaare (Primer Nr. 7, 8, 9, 10, 13 und 22) an 33 Pilzarten aus Reinkultur dahingehend getestet, ob sie auch die DNA dieser Pilzarten amplifizieren können. Obwohl sich Primerpaar Nr. 1 in der ersten Versuchsreihe nicht bewährt hatte (Amplifikation von Pflanzen-DNA), wurde es bei den weiteren Untersuchungen mitgeführt, da dieses Primerpaar der Literatur zufolge häufig zur Untersuchung auf Pilze verwendet wird.

Tabelle 26 gibt die Ergebnisse der PCR-Amplifikation der Primerpaare Nr. 1, 7, 8, 9, 10, 13 und 22 aus 33 Pilz-Spezies-Proben aus Reinkultur wieder. Außer dem Primerpaar Nr. 13 konnten alle Primerpaare die DNA von Schimmelpilzen und Hefen der Abteilungen Ascomycota und Basidiomycota (*Wallemia sebi*, *Cryptococcus curvatus*, *Trichosporon gracile*, *Rhodotorula* sp.) gut amplifizieren.

Allerdings wurde DNA von Arten der Unterabteilung Mucoromycotina (*Absidia glauca*, *Mucor spinosus*, *Rhizopus oryzae*) nur mit den Primerpaaren 1, 9 und 22 gut amplifiziert. Die Abbildungen der DNA-Banden (im Agarosegel) der Produkte von allen 7 Primerpaaren finden sich im **Anhang 3.2**.

Tabelle 26: Ergebnis der Darstellung von PCR-Amplifikaten ausgewählter Primerpaare im Agarosegel

Nr. Pilz-Spezies aus Reinkultur	Primerpaar Nr.							Primerpaar Nr.
	1	7	8	9	10	13	22	
1 <i>Acremonium</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	1 ITS1 / ITS4
2 <i>Alternaria alternata</i>	+	+	+	+	+	+	+	7 ITS1F / ITS4
3 <i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	+	+	+	+	8 ITS1F / ITS2
4 <i>Aspergillus fumigatus</i>	+	+	+	+	+	+/-	+	9 ITS1 / ITS5.8R
5 <i>Aspergillus glaucus</i>	+	+	+	+	+	+	+	10 ITS1F / ITS5.8R
6 <i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+	+	+	+	13 NS11 / 58A2R
7 <i>Aspergillus ochraceus</i>	+	+	+	+	+	+/-	+	22 U1 / U2
8 <i>Aspergillus parasiticus</i>	+	+	+	+	+	+	+	
9 <i>Aspergillus terreus</i>	+	+	+	+	+	+/-	+	
10 <i>Aspergillus vesicolor</i>	+	+	+	+	+	+	+	
11 <i>Aureobasidium pullurans</i>	+	+	+	+	+	+	+	
12 <i>Cladosporium herbarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	
13 <i>Eurotium amstelodami</i>	+	+	+	+	+	+	+	
14 <i>Eurotium rubrum</i>	+	+	+	+	+	+	+	
15 <i>Fusarium</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	
16 <i>Penicillium chrysogenum</i>	+	+	+	+	+	+	+	
17 <i>Penicillium expansum</i>	+	+	+	+	+	+	+	
18 <i>Penicillium nalgiovense</i>	+	+	+	+	+	+	+	
19 <i>Penicillium roqueforti</i>	+	+	+	+	+	+	+	
20 <i>Penicillium verrucosum</i>	+	+	+	+	+	+	+	
21 <i>Wallemia sebi</i>	+	+	+	+	+	-	+	
22 <i>Absidia glauca</i>	+	-	-	+	-	-	+	
23 <i>Mucor spinosus</i>	+	+/-	+/-	+	-	-	+	
24 <i>Rhizopus oryzae</i>	+	+	+/-	+	+/-	-	+	
25 <i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	
26 <i>Candida krusei</i>	+	+	+	+	+	+	+	
27 <i>Cryptococcus curvatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	
28 <i>Pichia membranaefaciens</i>	+	+	+	+	+	+	+	
29 <i>Rhodotorula</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	
30 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (DSM 70451)	+	+	+	+	+	+	+	
31 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (DSM 4531)	+	+	+	+	+	+	+	
32 <i>Trichosporon gracile</i>	+	+	+	+	+	+	+	
33 <i>Yarrowia lipolytica</i>	+	+	+	+	+	+	+	

= Gründe, aus denen die Primerpaare **nicht geeignet** für diese Studie sind
 + = erzeugen gut sichtbare DNA-Bande
 +/- = erzeugen schwache DNA Bande
 - = keine DNA Bande in Agarosegel

2.2 Auftrennung von Pilz-DNA im SSCP-Gel

Die PCR-Produkte von insgesamt fünf Primerpaaren wurden auf ihre Eignung für die SSCP-Methode geprüft. Vier Primerpaare (Nr. 1, 8, 9 und 10) amplifizieren den „Internal Transcribed Spacer“-Abschnitt (ITS), ein Primerpaar (Nr. 22) amplifiziert den 28S-Abschnitt der ribosomalen DNA.

Die Trennung der PCR-Produkte im SSCP-Gel ergab, dass Primerpaar Nr. 22 für weitere Untersuchungen nicht geeignet erschien. Wie aus **Abbildung 8** hervorgeht, zeigen die DNA-Banden der getesteten Pilze fast gleiche Laufweiten und sind somit nicht differenzierbar. Nur die DNA-Banden der Pilze aus der Unterabteilung Mucoromycotina (*Rhizopus oryzae* und *M. spinosus*) setzten sich im SSCP-Gel deutlich von denen der anderen Pilzarten ab. Wegen der mangelnden sichtbaren Unterschiede in der Laufweite der DNA-Banden wäre es nicht möglich, ohne weitere Schritte unterschiedliche Pilzarten in einer Probe zu erkennen und zu identifizieren.

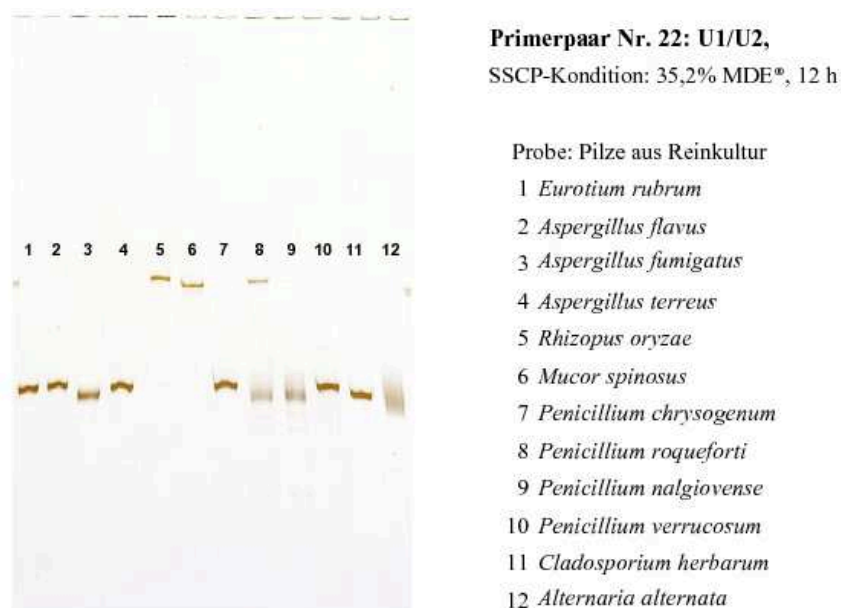


Abbildung 8: Trennung von DNA-Amplifikaten verschiedener Pilzarten im SSCP-Gel. PCR-Produkte Primerpaar Nr. 22 (U1/U2)

Die Auftrennung der DNA-Amplikate der Primerpaare, die den DNA-Abschnitt ITS der ribosomalen DNA amplifizieren (Primerpaare Nr. 1, 8, 9 und 10) ist dagegen zufriedenstellend. **Abbildung 9** zeigt exemplarisch die DNA Profile im SSCP-Gel, die vom Primerpaaren Nr. 9 amplifiziert wurden. Die DNA-Amplikate von Pilzarten der Gattungen *Penicillium*, *Aspergillus* und *Aureobasidium* trennen sich allerdings nicht gut (Banden 3-7). Die DNA-Banden einiger Pilzgattungen zeigen gleiche Laufweiten im SSCP-Gel, z. B. die Pilzarten *A. flavus*, *P. expansum*, *P. roqueforti* (Bande Nr. 6); *Alt. alternata*, *Cla. herbarum*, *M. spinosus*, *Rhodotorula* spp. (Bande Nr. 13) und *A. glaucus*, *C. albicans*, *E. amstelodami*, *E. rubrum* (Bande Nr. 15). Dies bedeutet, dass eine Differenzierung auf Genus- bzw. Speziesebene in diesen Fällen nur durch eine Sequenzierung der entsprechenden Bande erfolgen kann.

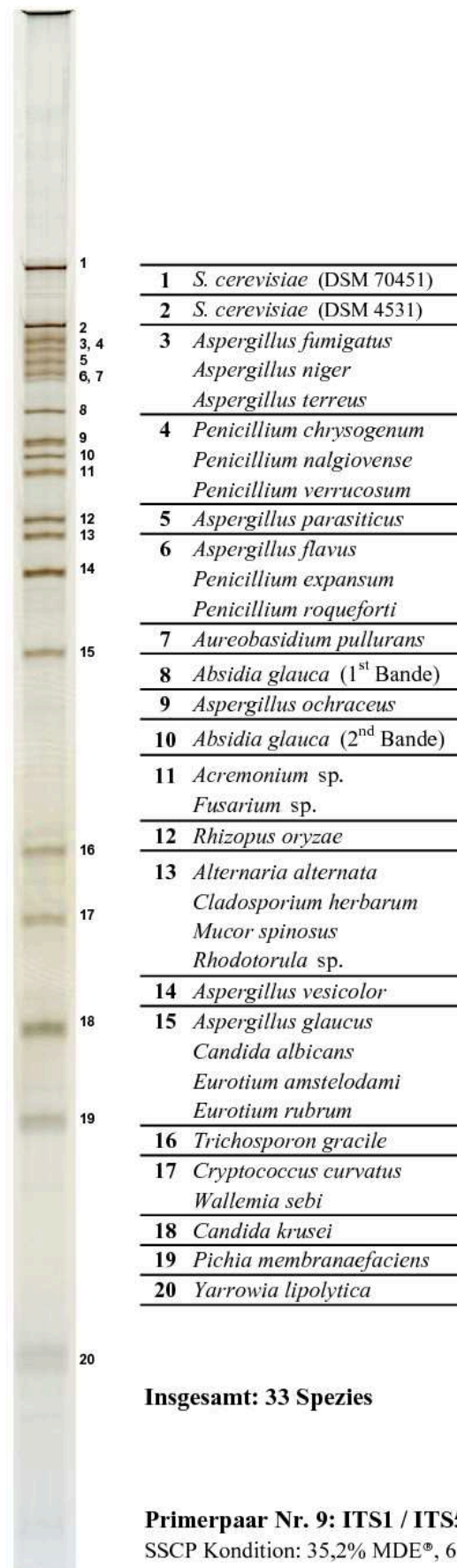


Abbildung 9: Trennung der Pilz-DNA im SSCP-Gel. PCR-Produkte aus dem DNA-Abschnitt ITS (Primerpaar Nr. 9)

Weil das Primerpaar Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R) keine pflanzliche und tierische DNA, sondern nur pilzliche DNA, und zwar von allen 33 getesteten Pilzarten aus Reinkultur, amplifiziert und die Trennung seiner PCR-Produkte in SSCP-Gel relativ gut ist, wurde es zur Untersuchung der Feldproben mit der PCR-SSCP-Methode ausgewählt.

3 Entwicklung quantitativer Standards für die qPCR

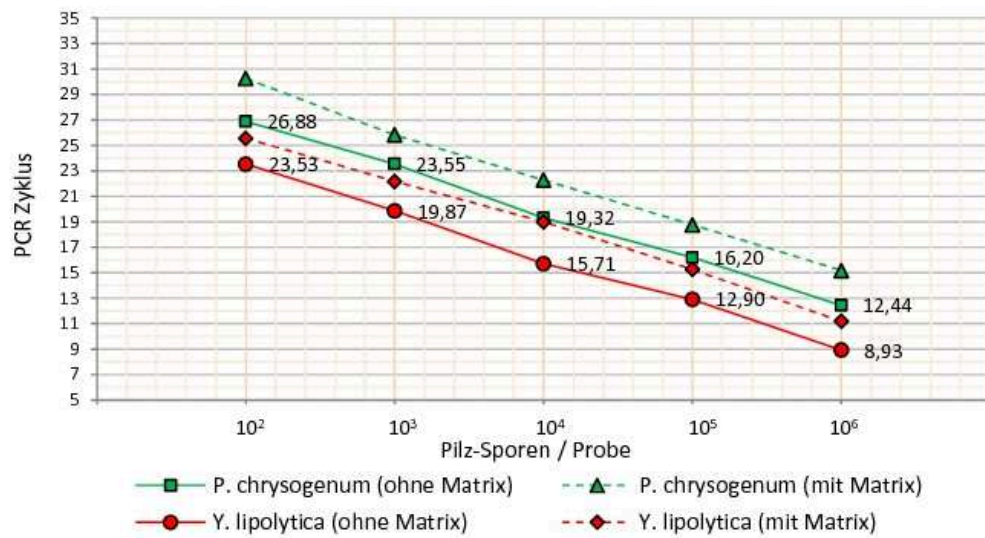
3.1 Vorversuche

Zur Quantifizierung der in den zu testenden Proben vorhandenen Pilz-DNA wurde die qPCR eingesetzt. Um der Frage nachzugehen, inwiefern Matrixbestandteile die qPCR beeinflussen, wurden Fleischproben mit definierten Sporenmengen künstlich kontaminiert und die Effizienz der Quantifikation dieser Proben und der entsprechenden Menge matrixfreier Sporen verglichen. Hierzu wurden zunächst Fleischproben mit γ -Strahlen (200 kGy) behandelt, um eventuell vorhandene pilzliche DNA zu zerstören. Der Erfolg dieser Behandlung wurde mit Hilfe der Primerpaare Nr. 1, 9, 10, 17, 19 und 20 in einer Endpunkt-PCR (vgl. Methodenteil-Abschnitt 2.3.2) mit anschließender Agarosegelelektrophorese überprüft. Selbst die Anwendung des Primerpaars Nr. 17, das Säuger-DNA amplifiziert, führte zu keiner Bande im Gel. Dies weist darauf hin, dass die in den Proben vorhandene DNA durch die Bestrahlung so weit zerstört wurde, dass keine messbaren Amplifikationsprodukte entstanden sind. Derart behandeltes Fleisch wurde nun – in Mengen von jeweils 50 mg – mit abgestuften Konzentrationen an Pilzsporen kontaminiert, so dass Gehalte von 10^2 - 10^6 Sporen / 50 mg Fleisch zu erwarten waren. Äquivalente Sporenkonzentrationen in 100 μ l Aqua dest. dienten als Kontrolle. Die Ansätze wurden entsprechend Abschnitt 2.3.15 im Methodenteil unter Verwendung der Primer ITS1/ITS4 analysiert.

Abbildung 10 zeigt, dass die Proben mit Fleischmatrix den Crossing-Point (im Folgenden als „CP“ oder „CP-Wert“ abgekürzt) im Durchschnitt 2,79 (*P. chrysogenum*) bzw. 2,45 (*Y. lipolytica*) PCR-Zyklen später erreichten als die Proben ohne Matrix. Der Befund belegt, dass die Fleischmatrix die DNA-Extraktion und/oder die PCR-Effizienz beeinträchtigt.

Als Referenz-Standard wurden deshalb bestrahlte Fleischproben mit abgestuften Konzentrationen von Pilz-Sporen kontaminiert und dann jeweils der CP-Wert

bestimmt. Dieser sogenannte „Matrix-matched-Standard“ wurde zur Quantifizierung der Feldproben eingesetzt, um somit eine interne Korrektur der quantitativen-Ergebnisse um die Matrix-Effekte zu ermöglichen.



Primerpaar Nr. 1 (ITS1/ITS4)	Crossing Point (Pilz-Sporen/Probe)					MW*
	1x10 ²	1x10 ³	1x10 ⁴	1x10 ⁵	1x10 ⁶	
Probe (Ohne & mit Fleischmatrix)						
<i>P. chrysogenum</i> (ohne Matrix)	26,88	23,55	19,32	16,20	12,44	-
<i>P. chrysogenum</i> (mit Matrix)	30,26	25,83	22,29	18,77	15,17	-
<i>Y. lipolytica</i> (ohne Matrix)	23,53	19,87	15,71	12,90	8,93	-
<i>Y. lipolytica</i> (mit Matrix)	25,56	22,17	18,99	15,26	11,19	-
CP-Werte Abstand						
<i>P. chrysogenum</i> : Ohne vs mit Matrix	-3,38	-2,28	-2,97	-2,57	-2,73	-2,79
<i>Y. lipolytica</i> : Ohne vs mit Matrix	-2,03	-2,30	-3,28	-2,36	-2,26	-2,45

* MW: Mittelwert

Abbildung 10: qPCR: Anzahl der Zyklen bis zum Crossing-Point: Standard-Spezies *P. chrysogenum* und *Y. lipolytica*: ohne und mit Fleischmatrix

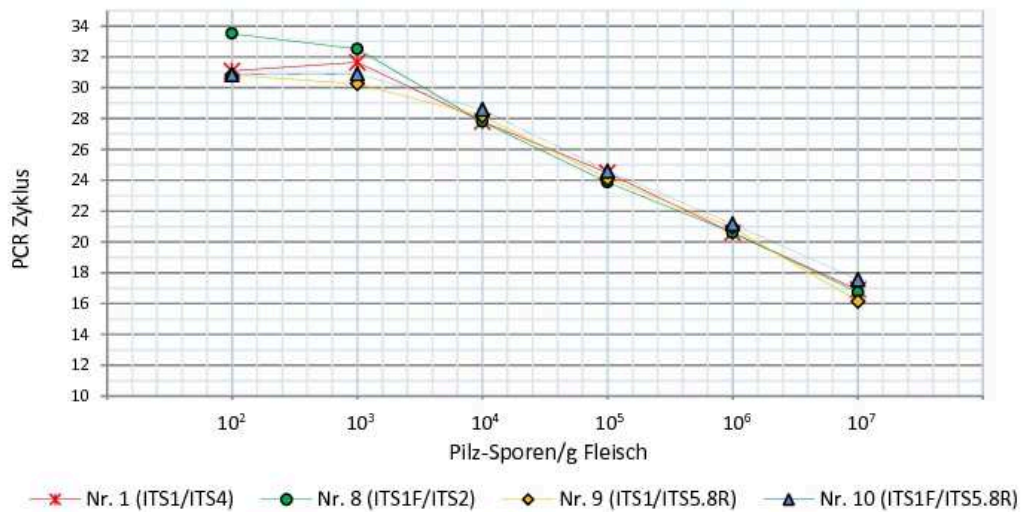
3.2 Hauptversuch

Zur Erstellung eines quantitativen Referenzstandards wurden bestrahlte Fleischproben mit abgestuften Konzentrationen von *P. chrysogenum* bzw. *Y. lipolytica* kontaminiert und dann der jeweilige CP-Wert bestimmt. Zur Amplifikation wurde der als Pilz-spezifisch erkannte Primerpaar Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R) eingesetzt. Zu Vergleichszwecken wurden die Primerpaar Nr. 1 (ITS1/IST4), Nr. 8 (ITS1F/ITS2) und Nr. 10 (ITS1F/ITS5.8R) in Parallelansätzen mitgeführt.

Abbildung 11 zeigt die qPCR-Ergebnisse von *P. chrysogenum*. Die CP-Werte aller 4 Primer sind fast gleich. Gesamtkeimzahlen von 10^3 bis 10^7 Sporen/g Fleisch konnten quantifiziert werden. Die Slope (Steigung) von 10^3 - 10^7 Sporen/g Fleisch lag zwischen -3,38 bis -3,64, der Error bei $\leq 0,213$ und der Korrelationskoeffizient r betrug für alle Primerpaare -1,00. Die Probe mit 10^2 Sporen/g Fleisch generierte unstabile CP-Werte und eine nicht ideale Schmelzkurve (siehe **Abbildung 13**: Primerpaar Nr. 1; **Abbildung 14**: Primerpaar Nr. 9). Im Agarosegel fanden sich gelegentlich unterschiedliche unspezifische PCR-Produkte.

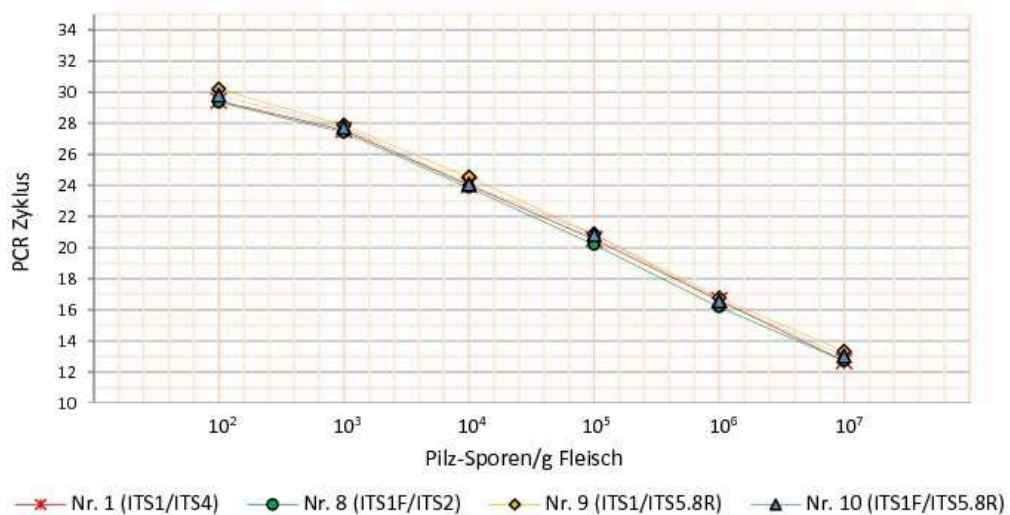
Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse von *Y. lipolytica*. Gesamtkeimzahlen von 10^2 bis 10^7 Sporen/g Fleisch konnten quantifiziert werden. Die Slope von 10^2 - 10^7 Sporen/g Fleisch lag zwischen -3,41 bis -3,46, der Error bei $\leq 0,218$ und die r -Werte für alle Primerpaare betragen -1,00. **Abbildung 13** (Primerpaar Nr. 1) und **Abbildung 14** (Primerpaar Nr. 9) zeigen die Fluoreszenz-Kurve und die Schmelzkurve. *Y. lipolytica* bietet gegenüber *P. chrysogenum* den Vorteil, dass die Spezies bei gleicher Gesamtkeimzahl den CP in 3,5 bis 4,0 PCR-Zyklen weniger als *P. chrysogenum* erreicht. Dies führt zu einer Absenkung der Nachweisgrenze auf 10^2 Sporen/g Fleisch.

Auf der Basis der Ergebnisse dieser Voruntersuchungen wurde die Spezies *Y. lipolytica* als Referenz-Standard-Spezies zur Quantifizierung der Pilz-DNA in Fleischprodukten ausgewählt.



Probe: <i>P. chrysogenum</i>	Crossing Point (Pilz-Sporen/g Fleisch)						PCR-Effizienz: von 10^3 - 10^7			
	1×10^2	1×10^3	1×10^4	1×10^5	1×10^6	1×10^7	Slope	Intercept	Error	<i>r</i>
Nr. 1 (ITS1/ITS4)	31,08	31,64	27,81	24,48	20,58	16,90	-3,644	37,81	0,062	-1,00
Nr. 8 (ITS1F/ITS2)	33,50	32,50	27,80	23,86	20,60	16,73	-3,646	37,56	0,074	-1,00
Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R)	30,81	30,25	28,16	24,10	20,94	16,15	-3,383	36,59	0,203	-1,00
Nr. 10 (ITS1F/ITS5.8R)	30,83	30,90	28,58	24,59	21,16	17,56	-3,410	37,17	0,158	-1,00

Abbildung 11: Einfluss der Konzentration von *P. chrysogenum*-Sporen auf den CP-Wert (Anzahl PCR-Zyklen): Vergleich von 4 Primerpaaren



Probe: <i>Y. lipolytica</i>	Crossing Point (Pilz-Sporen/g Fleisch)						PCR-Effizienz: von 10^2 - 10^7			
	1×10^2	1×10^3	1×10^4	1×10^5	1×10^6	1×10^7	Slope	Intercept	Error	<i>r</i>
Nr. 1 (ITS1/ITS4)	29,43	27,56	24,01	20,55	16,62	12,70	-3,415	35,58	0,212	-1,00
Nr. 8 (ITS1F/ITS2)	29,34	27,41	23,86	20,19	16,17	12,71	-3,444	32,63	0,218	-1,00
Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R)	30,18	27,87	24,53	20,88	16,77	13,32	-3,460	37,18	0,189	-1,00
Nr. 10 (ITS1F/ITS5.8R)	29,80	27,73	24,07	20,84	16,56	13,02	-3,446	33,03	0,012	-1,00

Abbildung 12: Einfluss der Konzentration von *Y. lipolytica*-Sporen auf den CP-Wert (Anzahl PCR-Zyklen): Vergleich von 4 Primerpaaren

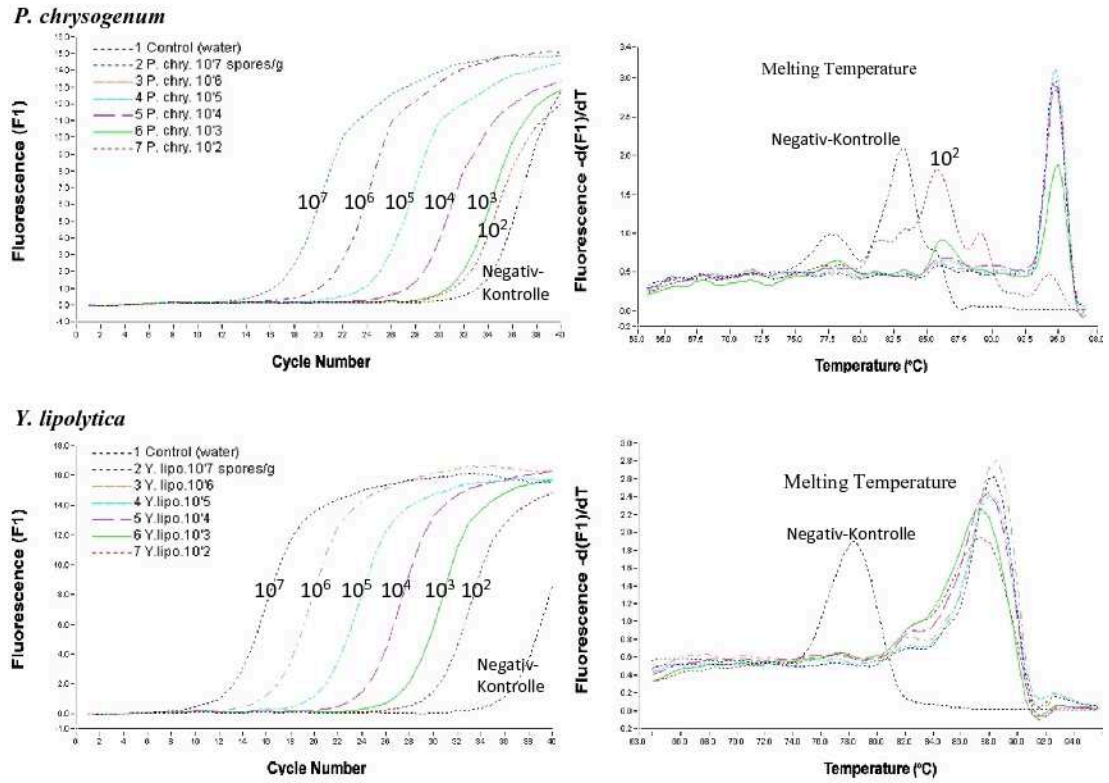


Abbildung 13: qPCR-Nachweis von *P. chrysogenum* und *Y. lipolytica* mit Primerpaar Nr. 1 (ITS1/ITS4): Verlauf der Fluoreszenz- und Schmelzkurve

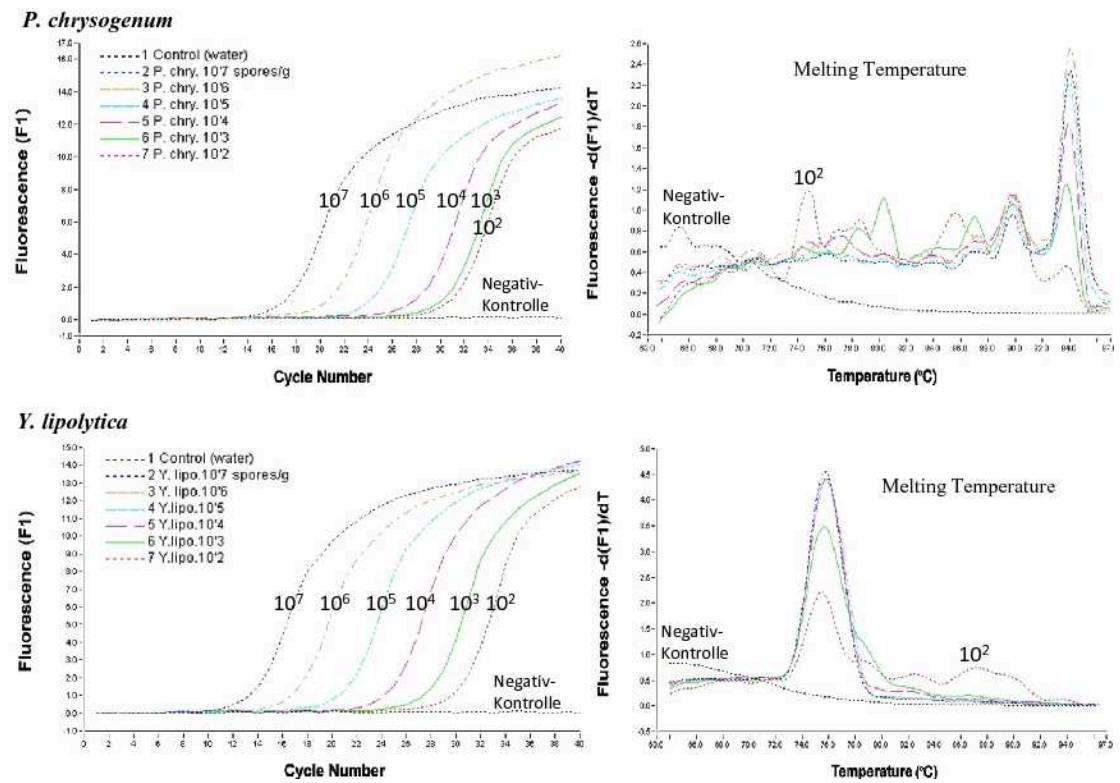
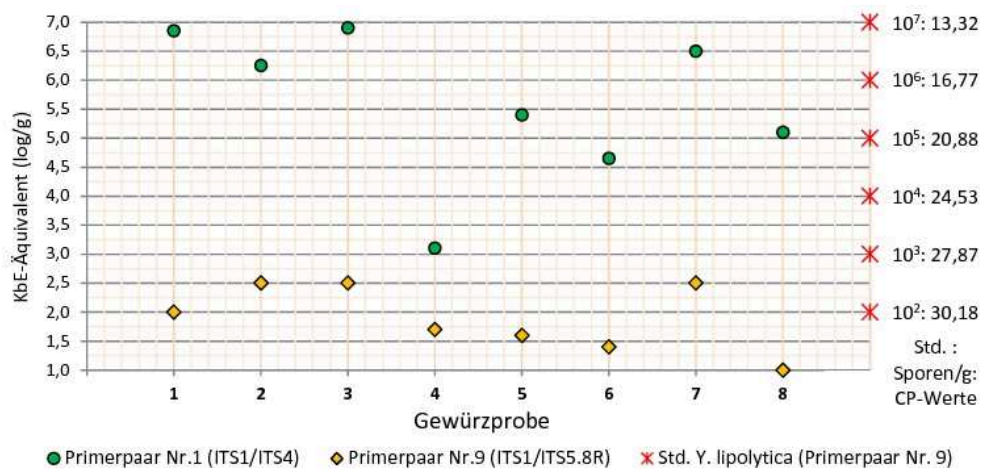


Abbildung 14: qPCR-Nachweis von *P. chrysogenum* und *Y. lipolytica* mit Primerpaar Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R): Verlauf der Fluoreszenz- und Schmelzkurve

4 Quantifizierung pflanzlicher DNA

Die Thermocycler-Ergebnisse zeigen, dass Gewürzproben-DNA zwar durch Primerpaar Nr. 1 (ITS1/ITS4), nicht aber durch Primerpaar Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R) amplifiziert wurde. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurden die gleichen Gewürzproben mit den Primern Nr. 1 und Nr. 9 per qPCR untersucht. Die CP-Werte der Gewürzproben wurden anhand der Standard-Spezies *Y. lipolytica* auf \log_{10} KbE-Äquivalent/g umgerechnet.

Abbildung 15 zeigt die KbE-Äquivalente (\log/g) von DNA aus Gewürzproben, die mit den Primern Nr. 1 und 9 amplifiziert wurden. Bei Primerpaar Nr. 1 lagen die CP-Werte der Gewürz-Proben zwischen 27,29 und 13,32, das entspricht der DNA-Menge in den mit 10^3 bis 10^7 Sporen von *Y. lipolytica* pro g kontaminierten Fleischproben. Eine pilzfreie Fleischproduktprobe, die 1 mg Gewürzpflanzen pro 50 mg enthielt, wäre somit durch Primerpaar Nr. 1 nicht von einer mit 10^6 Sporen von *Y. lipolytica* kontaminierten Fleischproduktprobe zu unterscheiden. Bei Primerpaar Nr. 9 lagen die CP-Werte aller Gewürze über 28,44; es amplifizierte damit weniger DNA als in der mit 10^3 Sporen von *Y. lipolytica* pro g versetzten Fleischprobe. Diese Befunde bestätigten die Eignung des Primerpaars Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R) für diese Studie und schließen Primerpaar Nr. 1 (ITS1/ITS4) für die Untersuchung gewürzter Fleischprodukte aus.



		KbE-Äquivalent (\log/g) der Gewürzproben							
Primerpaar		1	2	3	4	5	6	7	8
Primerpaar Nr.1 (ITS1/ITS4)		6,85	6,25	6,90	3,10	5,40	4,65	6,50	5,10
Primerpaar Nr.9 (ITS1/ITS5.8R)		2,00	2,50	2,50	1,70	1,60	1,40	2,50	1,00
Gewürzprobe	1	Lauch: <i>Allium</i> spp.		5	Paprika: <i>Capsicum annuum</i>				
	2	Zwiebel: <i>Allium cepa</i>		6	Ingwer: <i>Zingiber officinale</i>				
	3	Knoblauch: <i>Allium sativum</i>		7	Koriander: <i>Coriandrum sativum</i>				
	4	Zitrone: <i>Citrus limon</i>		8	Sellerie: <i>Apium graveolens</i>				

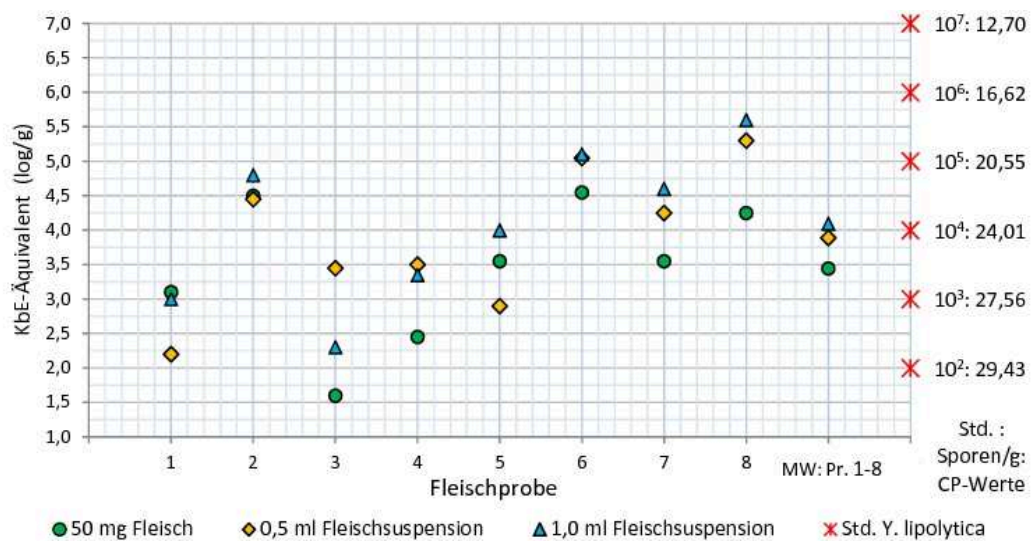
Abbildung 15: qPCR-Analyse von Gewürzen mit den Primerpaaren Nr. 1 (ITS1/ITS4) und Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R); Quantifizierungs-Standard: *Y. lipolytica*

5 Optimierung der Methoden

5.1 qPCR

5.1.1 Aufbereitung des Probenmaterials

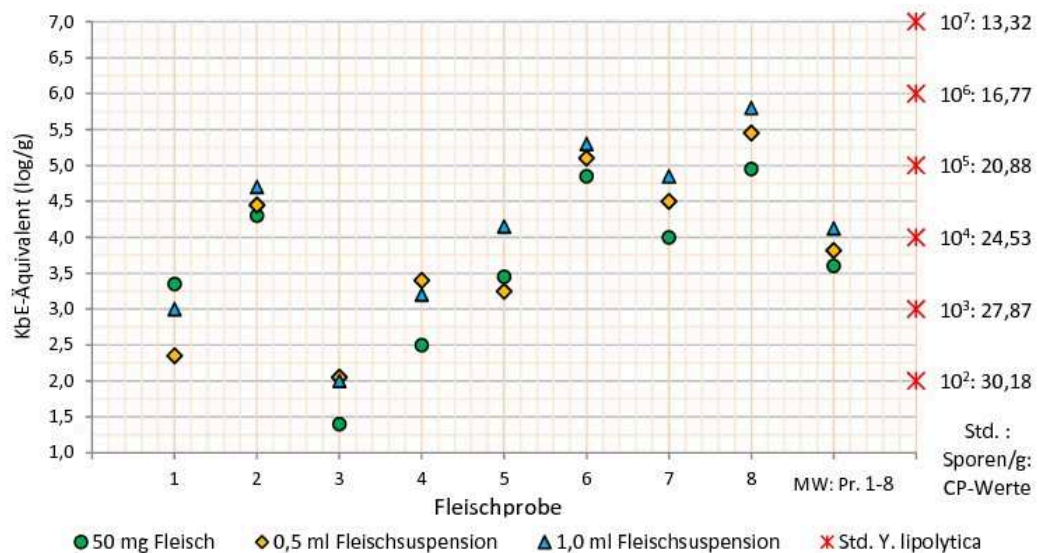
In dieser Untersuchung sollte geprüft werden, ob für die DNA-Extraktion pures Fleisch oder eine Fleischsuspension besser geeignet sind. Von acht verschiedenen Fleischproben (Hackfleischproben 1, 2 und 4-8; Fleischprobe 3, vgl. **Tabelle 15**) wurden 50 mg Fleisch unmittelbar der DNA-Extraktion zugeführt. Zum Vergleich wurde mit Hilfe eines Stomachers Fleischsuspension (10 g Fleisch, 90 ml Peptonwasser) hergestellt und von dieser jeweils 0,5 und 1 ml extrahiert. Aliquote der Extrakte wurden mittels qPCR und den Primerpaaren Nr. 1 (ITS1/ITS4) und Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R) amplifiziert. Die CP-Werte wurden anhand eines Kalibrierungsstandards (*Y. lipolytica*, „matrix matched“, vgl. Abschnitt 3.2) in KBE-Äquivalent (log) umgerechnet und verglichen.



Primerpaar Nr. 1	Proben								
KbE-Äquivalent-Werte (log/g) von Fleischproben	1	2	3	4	5	6	7	8	MW*
50 mg Fleisch	3,10	4,50	1,60	2,45	3,55	4,55	3,55	4,25	3,44
0,5 ml Fleischsuspension	2,20	4,45	3,45	3,50	2,90	5,05	4,25	5,30	3,89
1,0 ml Fleischsuspension	3,00	4,80	2,30	3,35	4,00	5,10	4,60	5,60	4,09
Unterschied log-Stufe									
50 mg vs. 0,5 ml	0,90	0,05	-1,85	-1,05	0,65	-0,50	-0,70	-1,05	-0,44

* MW: Mittelwert

Abbildung 16: qPCR-Ergebnisse, Vergleich der KbE-Äquivalente (log/g) nach unterschiedlicher Probenvorbereitung (Fleisch vs. Fleischsuspension); Primerpaar Nr. 1: ITS1/ITS4



Primerpaar Nr. 9	Proben								
KbE-Äquivalent-Werte (log/g) von Fleischproben	1	2	3	4	5	6	7	8	MW*
50 mg Fleisch	3,35	4,30	1,40	2,50	3,45	4,85	4,00	4,95	3,60
0,5 ml Fleischsuspension	2,35	4,45	2,05	3,40	3,25	5,10	4,50	5,45	3,82
1,0 ml Fleischsuspension	3,00	4,70	2,00	3,20	4,15	5,30	4,85	5,80	4,13
Unterschied log-Stufe									
50 mg vs. 0,5 ml	1,00	-0,15	-0,65	-0,90	0,20	-0,25	-0,50	-0,50	-0,22

* MW: Mittelwert

Abbildung 17: qPCR-Ergebnisse, Vergleich der KbE-Äquivalente (log/g) nach unterschiedlicher Probenvorbereitung (Fleisch vs. Fleischsuspension); Primerpaar Nr. 9: ITS1/ITS5.8R

Zunächst ist festzustellen, dass die Anwendung der unterschiedlichen Primerpaare bei den jeweiligen Probenvorbereitungen zu vergleichbaren Durchschnittswerten führten (**Abbildung 16** und **Abbildung 17**).

Allerdings scheint die Anwendung von Primerpaar Nr. 1 zu einer stärkeren Variation der Ergebnisse zu führen, als dies bei Primerpaar Nr. 9 der Fall ist. Die Extraktion einer Fleischsuspension resultierte in etwas höheren durchschnittlichen KBE-Äquivalent-Werten als die Extraktion von purem Fleisch. Besonders deutlich wird dies in der Analyse von 1 ml Suspension, die fast durchgehend zu höheren Einzelwerten führte.

5.2 PCR-SSCP

5.2.1 Annealing-Temperatur

Um den Einfluss der Annealing-Temperatur auf die Qualität der SSCP-Gele zu prüfen, wurde aus jeweils vier Fleischproben (zwei Proben naiv, zwei Proben künstlich kontaminiert) die DNA extrahiert und unter Anwendung der Primerpaare Nr. 1 (ITS1/ITS4) und Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R) bei Annealing-Temperaturen von 56 bzw. 62 °C im Thermocycler amplifiziert. Die mit Silbernitrat gefärbten Gele sind in **Abbildung 18** exemplarisch wiedergegeben. Beim Vergleich der entsprechenden Laufspuren fällt auf, dass für beide Primerpaare eine Annealing-Temperatur von 56 °C zu mehr und teilweise auch intensiveren Banden führte als eine Annealing-Temperatur von 62 °C.

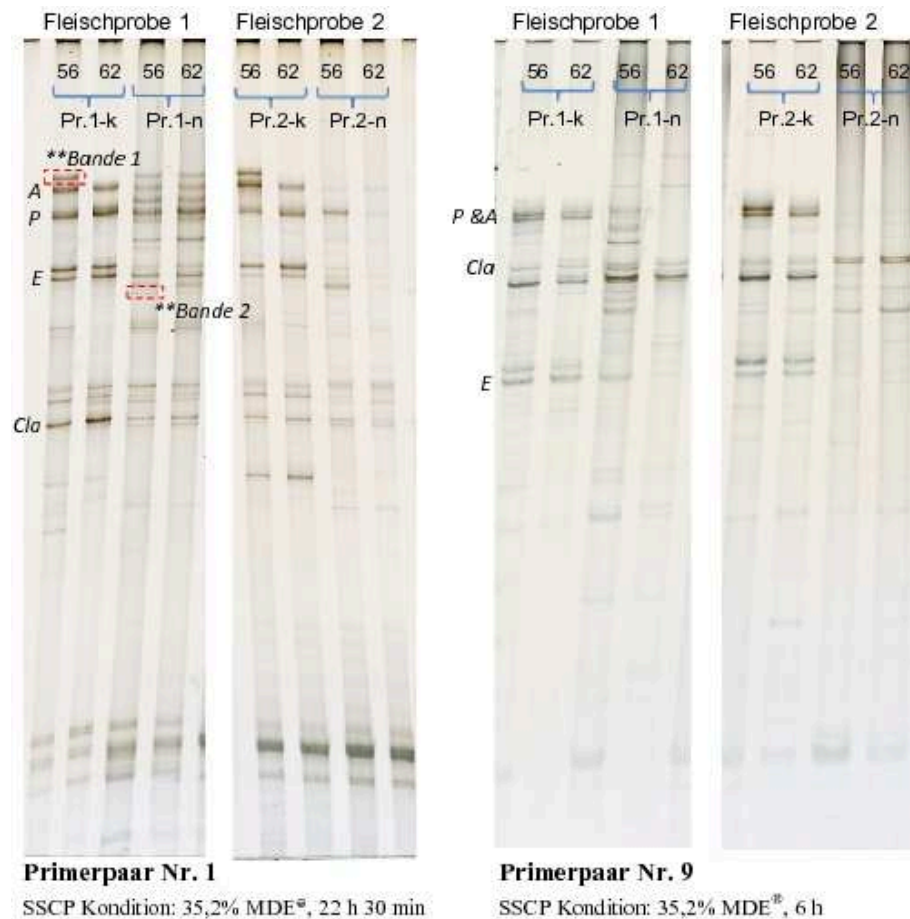


Abbildung 18: PCR-SSCP-Bandenprofile von Amplifikaten aus 4 Fleischproben: Vergleich der Primerpaare Nr. 1 (ITS1/ITS4), Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R) und der Annealing Temperaturen 56 und 62 Grad Celsius

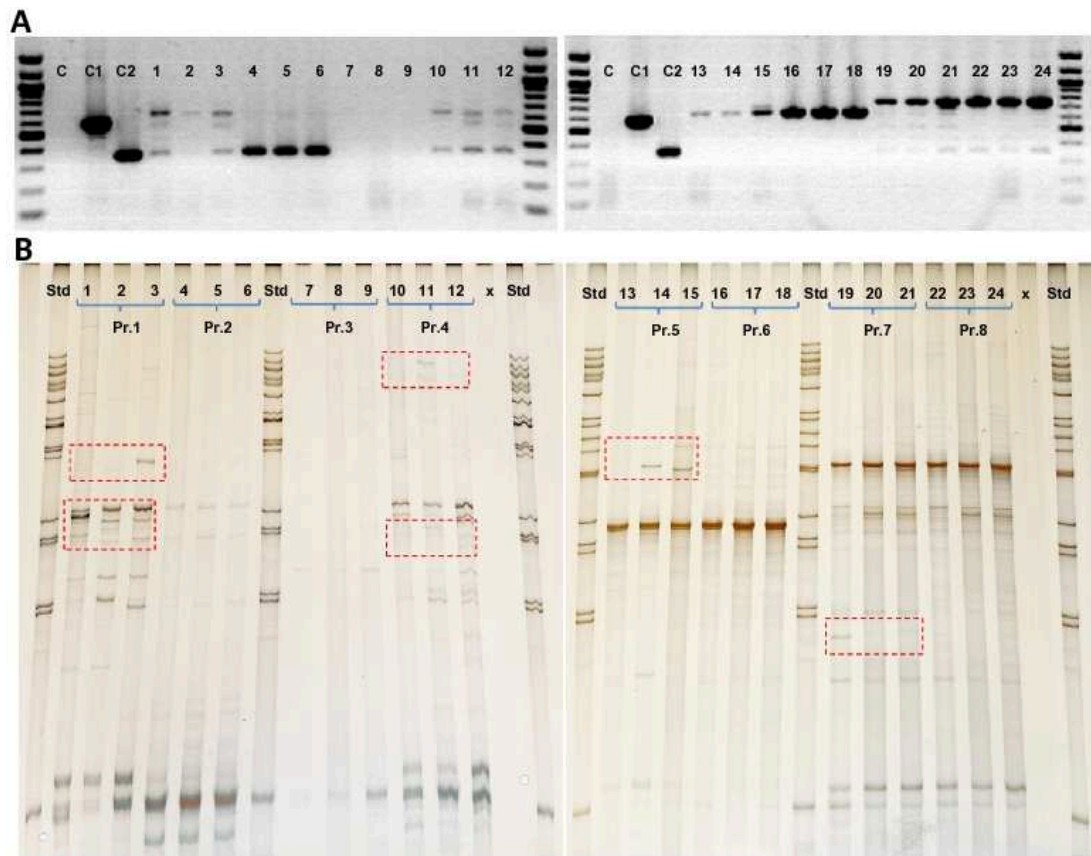
Probe: **Pr.1-k, Pr.2-k** sind Hackfleischproben (50 mg), die jeweils mit 1×10^3 Sporen künstlich kontaminiert wurden: *A. flavus* (**A**), *Cla. herbarum* (**Cl**a), *E. rubrum* (**E**) und *P. chrysogenum* (**P**); **Pr.1-n, Pr.2-n** sind naive Hackfleischproben; Annealing-Temperatur 56 °C und 62 °C

Um zu prüfen, ob diese Banden, die nur bei der Annealing-Temperatur von 56 °C entstehen, Pilz-DNA repräsentieren, wurden 2 Banden (siehe **Abbildung 18**) ausgeschnitten, aufgereinigt, per PCR reamplifiziert und sequenziert. Bande 1 zeigte 100%ige Identität mit *Aspergillus terreus* und Bande 2 zeigte 99%ige Identität mit *Eurotium amstelodami*. Zur Untersuchung der Feldproben wurden daher die Primerpaare Nr. 1 und Nr. 9 im Thermocycler bei einer Annealing-Temperatur von 56 °C eingesetzt, um die PCR-Produkte verschiedener Pilze für die SSCP-Methode zu amplifizieren. Primerpaar Nr. 1 wurde weiter zur Validierung der Methoden verwendet, um die Ergebnisse von Primerpaar Nr. 9 zu bestätigen.

5.2.2 Vorbereitung des Probenmaterials

Wie im Abschnitt **5.1.1** bereits dargestellt, hat die Vorbereitung des Probenmaterials (pures Fleisch oder Fleischsuspension) einen gewissen Einfluss auf die Resultate der Amplifikation. Aus diesem Grunde sollte auch geprüft werden, inwieweit sich dies auf die Qualität der SSCP-Gele auswirkt. Deshalb wurden Aliquots der DNA-Extrakte aus Abschnitt **5.1.1** mittels Endpunkt-PCR amplifiziert und unter Anwendung der Primerpaare Nr. 1 (ITS1/ITS4), und Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R) amplifiziert und nach λ -Exonukleaseverdau im Polyacrylamidgel getrennt. Beim Vergleich der entsprechenden Laufspuren wird ersichtlich, dass die Banden der unterschiedlich vorbereiteten Proben doch sehr ähnlich sind (**Abbildung 19** und **Abbildung 20**). Insbesondere die dominanten Banden stimmen überein. Nur in wenigen Fällen (vgl. Umrandungen in **Abbildung 19** und **Abbildung 20**) sind schwach ausgeprägte Banden nicht bei allen unterschiedlich vorbereiteten Proben zu erkennen. Dies war nicht kontinuierlich einer Probenvorbereitung zuzuordnen und dürfte daher auf die Inhomogenität der Probenmatrix zurückzuführen sein. Solche durch Inhomogenität der Matrix hervorgerufenen Effekte treten bei der Untersuchung von Feldproben hitzebehandelter Fleischprodukte in den Hintergrund, da diese bereits bei ihrer Herstellung homogenisiert werden.

Aufgrund der großen Übereinstimmung der unterschiedlich vorbereiteten Fleischproben wurde die Probenzubereitung von 50 mg Fleisch ohne Auflösung in einer Suspension für die Untersuchung der Feldproben mit der PCR-SSCP-Methode ausgewählt.



Primerpaar Nr. 1: SSCP Kondition: 35,2% MDE®, 22 h 30 min

Abbildung 19: Vergleich der PCR- (A) und SSCP-Ergebnisse (B) nach unterschiedlicher Probenvorbereitung (Fleisch vs. Fleischsuspension); Primerpaar Nr. 1: ITS1/ITS4

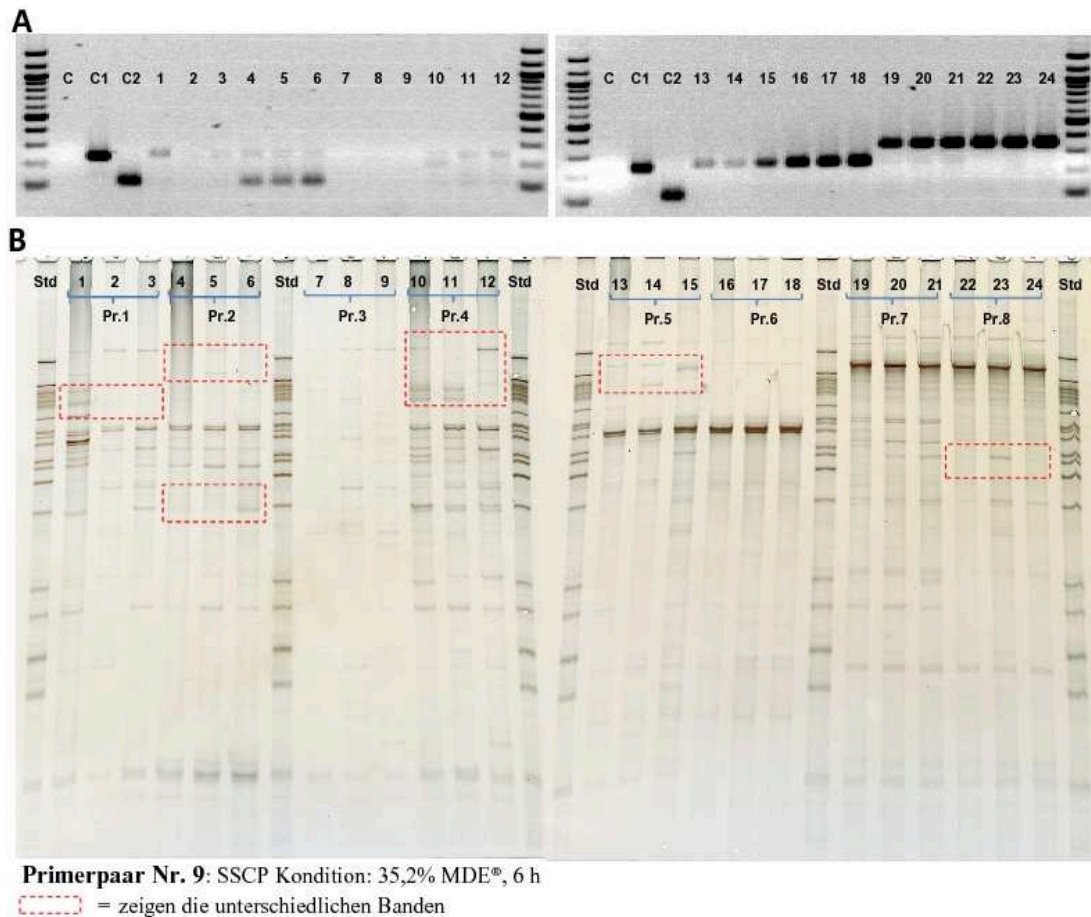
A: Agarosegel: C: Negativ-Kontrolle; C1: *P. chrysogenum*; C2: *Y. lipolytica*

Zuordnung der Ziffern 1-24 siehe **B**

B: SSCP-Gel: Std.: Standard-Spezies; x: keine Probe; Fleischprobe

Pr. 1	1	50 mg	2	0,5 ml*	3	1,0 ml**	Pr. 2	4	50 mg	5	0,5 ml*	6	1,0 ml**
Pr. 3	7	50 mg	8	0,5 ml*	9	1,0 ml**	Pr. 4	10	50 mg	11	0,5 ml*	12	1,0 ml**
Pr. 5	13	50 mg	14	0,5 ml*	15	1,0 ml**	Pr. 6	16	50 mg	17	0,5 ml*	18	1,0 ml**
Pr. 7	19	50 mg	20	0,5 ml*	21	1,0 ml**	Pr. 8	22	50 mg	23	0,5 ml*	24	1,0 ml**

☐ = zeigen die unterschiedlichen Banden * : Äquivalent 50 mg; ** : Äquivalent 100 mg Fleisch



Proben: siehe **Abbildung 19**

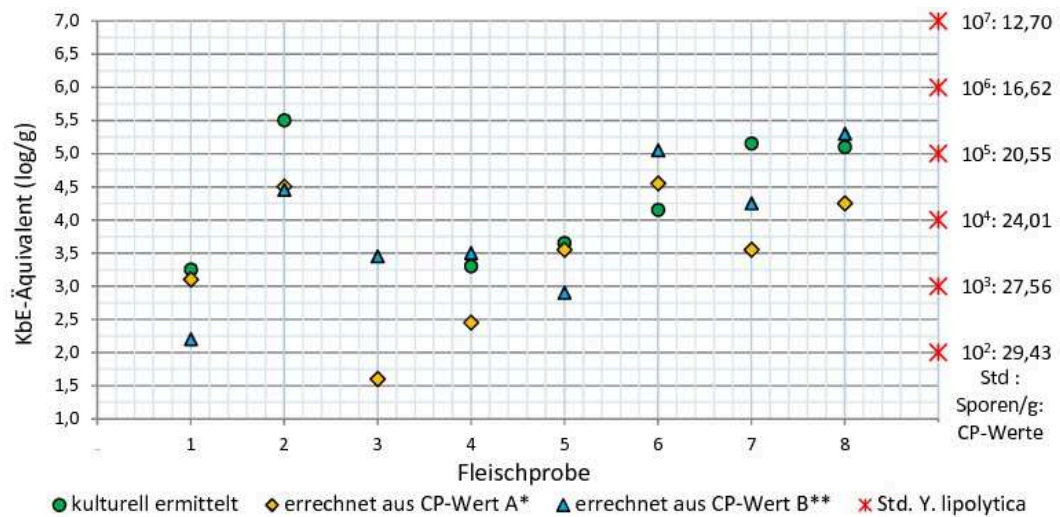
Abbildung 20: Vergleich der PCR- (A) und SSCP-Ergebnisse (B) nach unterschiedlicher Probenvorbereitung (Fleisch vs. Fleischsuspension); Primerpaar Nr. 9: ITS1/ITS5.8R

6 Validierung der Methoden

6.1 Ergebnisse der qPCR

6.1.1 Kulturell bestimmte Keimgehalte vs. qPCR-Werte

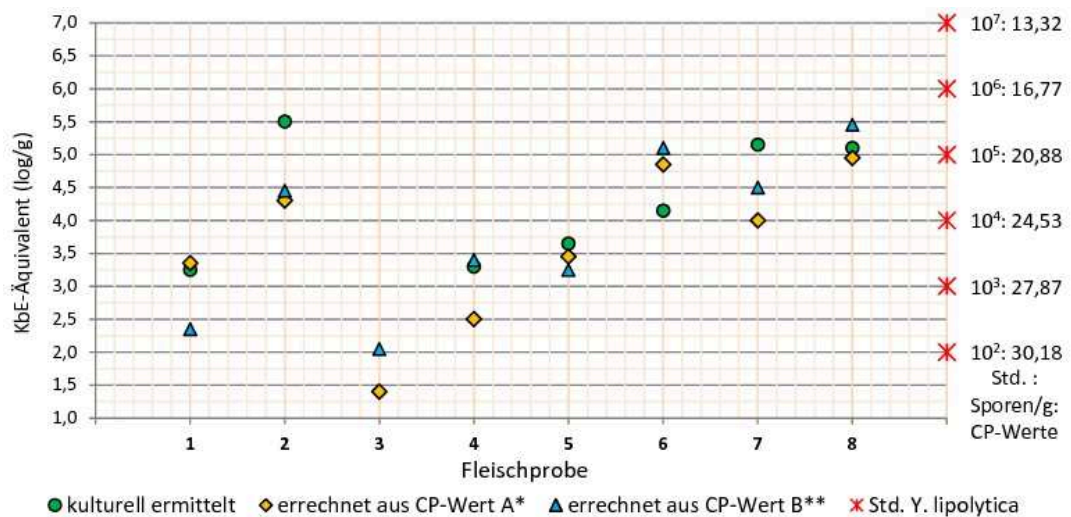
Abbildung 21 und **Abbildung 22** zeigen die \log_{10} KbE/g-Werte der Fleischproben 1-8 (frisches Fleisch, naiv) im Vergleich zu den anhand der CP-Werte errechneten \log_{10} KbE/g-Äquivalent-Werte. Zur Amplifikation wurden die Primerpaare Nr. 1 (ITS1/ITS4) und Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R) angewandt. In beiden Fällen zeigte sich die Tendenz, dass die kulturell ermittelten \log_{10} KbE-Werte höher als die errechneten KbE-Werte der 50 mg Fleischproben ausfielen, außer bei Probe 3 (Fleischkern) und Probe 6.



Primerpaar Nr. 1	Proben							
KbE-Äquivalent-Werte (log/g) von Fleischproben	1	2	3	4	5	6	7	8
kulturell ermittelt	3,25	5,50	0,00	3,30	3,65	4,15	5,15	5,10
errechnet aus CP-Wert A*	3,10	4,50	1,60	2,45	3,55	4,55	3,55	4,25
errechnet aus CP-Wert B**	2,20	4,45	3,45	3,50	2,90	5,05	4,25	5,30

* ermittelt nach DNA-Extraktion aus 50 mg Fleisch
 ** ermittelt nach DNA-Extraktion aus 0,5 ml Fleischsuspension

Abbildung 21: Vergleichende Darstellung der kulturell ermittelten und der aus den PCR-Ergebnissen errechneten KBE-Werte (log/g) nach unterschiedlicher Probenvorbereitung (Fleisch vs. Fleischsuspension); Primerpaar Nr. 1: ITS1/ITS4



Primerpaar Nr. 9	Proben							
KbE-Äquivalent-Werte (log/g) von Fleischproben	1	2	3	4	5	6	7	8
kulturell ermittelt	3,25	5,50	0,00	3,30	3,65	4,15	5,15	5,10
errechnet aus CP-Wert A*	3,35	4,30	1,40	2,50	3,45	4,85	4,00	4,95
errechnet aus CP-Wert B**	2,35	4,45	2,05	3,40	3,25	5,10	4,50	5,45

* ermittelt nach DNA-Extraktion aus 50 mg Fleisch
 ** ermittelt nach DNA-Extraktion aus 0,5 ml Fleischsuspension

Abbildung 22: Vergleichende Darstellung der kulturell ermittelten und der aus den PCR-Ergebnissen errechneten KBE-Werte (log/g) nach unterschiedlicher Probenvorbereitung (Fleisch vs. Fleischsuspension); Primerpaar Nr. 9: ITS1/ITS5.8R

Die Korrelation der kulturell ermittelten und der aus den 50 mg Fleisch- und 0,5 ml Fleischsuspensionsproben errechneten KbE (log/g)-Werte wurde statistisch (Pearson-Korrelation) geprüft. Die in **Tabelle 27** dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Korrelation zwischen den kulturell ermittelten und den aus 50 mg Fleischproben errechneten \log_{10} KbE/g-Werten auf dem Niveau von 0,01 signifikant ist. Dieses Signifikanz-Niveau ergab sich für die Korrelation mit den Produkten beider Primerpaare (Primerpaar Nr. 1: ITS1/ITS4 und Nr. 9: ITS1/ITS5.8R).

Tabelle 27: Korrelation zwischen den kulturell ermittelten- und nach qPCR-errechneten Keimzahlen

Probe ($n = 8$)	Korrelation nach Pearson		
	kulturell ermittelt vs. CP-Wert-basiert A ¹	kulturell ermittelt vs. CP-Wert-basiert B ²	CP-Wert-basiert A ¹ vs. CP-Wert-basiert B ²
Primerpaar Nr. 1	0,006**	0,084	0,046*
Primerpaar Nr. 9	0,005**	0,013*	0,001**

* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

¹ A ermittelt nach DNA-Extraktion aus 50 mg Fleisch

² B ermittelt nach DNA-Extraktion aus 0,5 ml Fleischsuspension

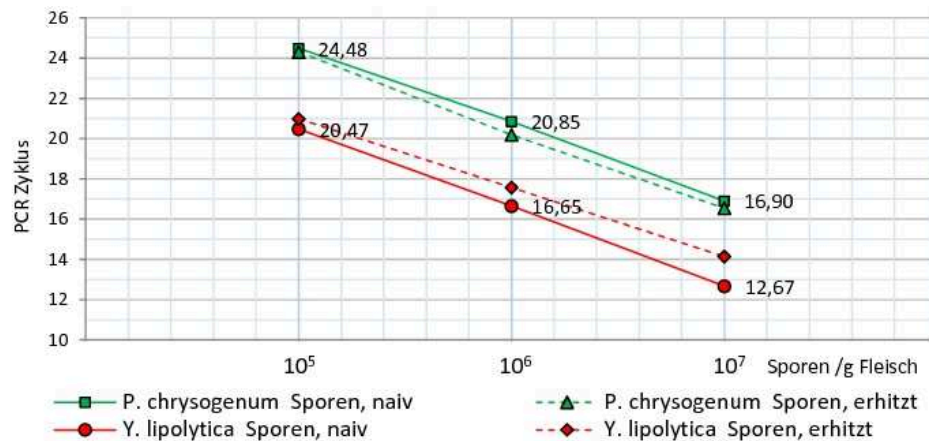
Die 50 mg Fleischprobe wurde angesichts dieser marginalen Unterschiede aufgrund der besseren Handhabbarkeit für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Als Standardproben der qPCR dienten in dieser Studie 50 mg Fleisch, jeweils künstlich kontaminiert mit der Standard-Spezies *Y. lipolytica*, d. h. Standard- und Feldproben waren von ähnlicher Matrix-Intensität.

6.1.2 Einfluss der thermischen Behandlung auf den quantitativen Nachweis von Pilzen

Es war das Ziel dieser Studie, Pilz-DNA in hitzebehandelten Fleischprodukten nachzuweisen, zu identifizieren und zu quantifizieren. Zur Bewertung der Ergebnisse war es nötig zu klären, ob sich die DNA-Profile und die DNA-Menge zwischen frischem und hitzebehandeltem Fleisch unterscheiden. Dazu wurden Proben (Pilzsporen bzw. Fleisch) im Labor für eine Stunde bei 90 °C im Wasserbad erhitzt bevor die DNA extrahiert wurde. Die Proben mit Referenz- und Standard-Pilz-Spezies wurden nur mit der qPCR getestet. Die Fleischproben 1-8 durchliefen sowohl das PCR-SSCP-Verfahren als auch die qPCR.

Quantitativer Nachweis von Pilz-Sporen

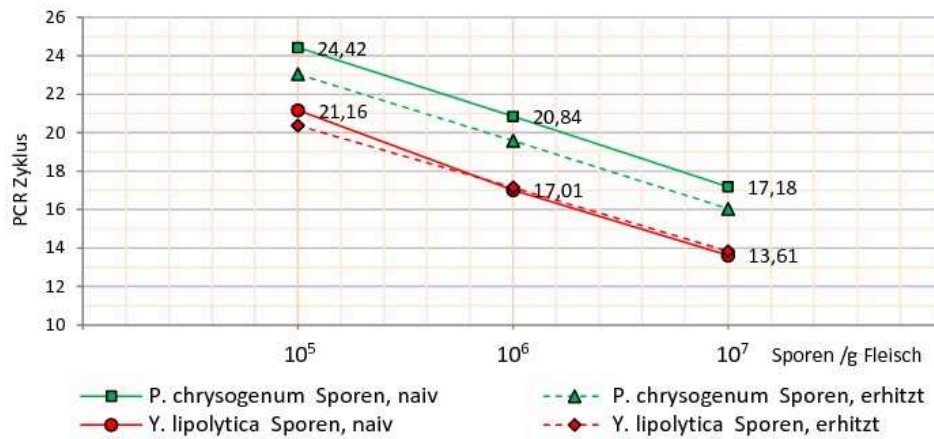
Bei der Anwendung des Primerpaares Nr. 1 lagen die CP-Werte erhitzter *P. chrysogenum*-Sporen um 0,17-0,66 PCR-Zyklen unter denen naiver Sporen (Abbildung 23). Bei *Y. lipolytica* brauchten die Proben von erhitzten Sporen hingegen 0,51 bis 1,47 PCR-Zyklen mehr als die von naiven Sporen, um den CP zu erreichen.



	Crossing Point (Sporen/g Fleisch)					
	<i>P. chrysogenum</i>			<i>Y. lipolytica</i>		
Primerpaar Nr. 1	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
Sporen, erhitzt	24,31	20,19	16,54	20,98	17,57	14,14
Sporen, naiv	24,48	20,85	16,90	20,47	16,65	12,67
CP Unterschied (erhitzt vs. naiv)	-0,17	-0,66	-0,36	0,51	0,92	1,47

Abbildung 23: Vergleich der CP-Werte von Amplifikaten naiver und hitzebehandelter *P. chrysogenum*-Sporen definierter Konzentration in bestrahlten Fleischproben; Primerpaar Nr. 1, ITS1/ITS4

Ein vergleichbares Ergebnis wurde beim Einsatz des Primerpaares Nr. 9 erzielt (Abbildung 24). Allerdings lagen die CP-Werte der erhitzten *P. chrysogenum*-Sporen um 1.14-1.38 PCR-Zyklen unter denen naiver Sporen, der Abstand war also größer als beim Primerpaar Nr. 1. Bei *Y. lipolytica* waren die CP-Werte naiver und erhitzter Sporen fast gleich. Bei *P. chrysogenum* wurde somit aus den erhitzten Sporen mehr DNA extrahiert (oder mehr DNA amplifiziert) als aus den naiven Sporen.



Primerpaar Nr. 9	Crossing Point (Sporen/g Fleisch)					
	<i>P. chrysogenum</i>			<i>Y. lipolytica</i>		
	10^5	10^6	10^7	10^5	10^6	10^7
Sporen, erhitzt	23,04	19,58	16,04	20,37	17,15	13,83
Sporen, naiv	24,42	20,84	17,18	21,16	17,01	13,61
CP Unterschied (erhitzt vs. naiv)	-1,38	-1,26	-1,14	-0,79	0,14	0,22

Abbildung 24: Vergleich der CP-Werte von Amplifikaten naiver und hitzbehandelter *Y. lipolytica*-Sporen definierter Konzentrationen in bestrahlten Fleischproben; Primerpaar Nr. 9, ITS1/ITS5.8R

Quantitativer Nachweis von Pilzen in Fleischproben

Die Resultate der Keimgehaltsbestimmung mittels qPCR von erhitzten und nicht erhitzten Fleischproben sind in den **Abbildung 25** und **Abbildung 26** dargestellt. Die CP-Werte der Proben aus der qPCR wurden anhand der Standard-Spezies *Y. lipolytica* auf \log_{10} KbE-Äquivalent/g umgerechnet.

Bei der Amplifikation mit Primerpaar Nr. 1 (**Abbildung 25**) waren die KbE-Äquivalent-Werte (\log/g) fast aller erhitzten Fleischproben niedriger als die von frischem Fleisch, und zwar um 0,10 bis 1,05 log-Stufen (bzw. um 0,28 bis zu mehr als 2,00 PCR-Zyklen), in Ausnahme war Probe 3, die als negative Kontrolle galt. Die KbE-Äquivalent-Werte der verdorbenen Proben waren erwartungsgemäß höher als die von Frischfleisch (um 0,20 bis 0,90 log-Stufen). Die KbE-Äquivalent-Werte von verdorbenen sowie von verdorbenen und erhitzten Fleischproben unterschieden sich nur gering (um 0,05 bis 0,35 log-Stufen).

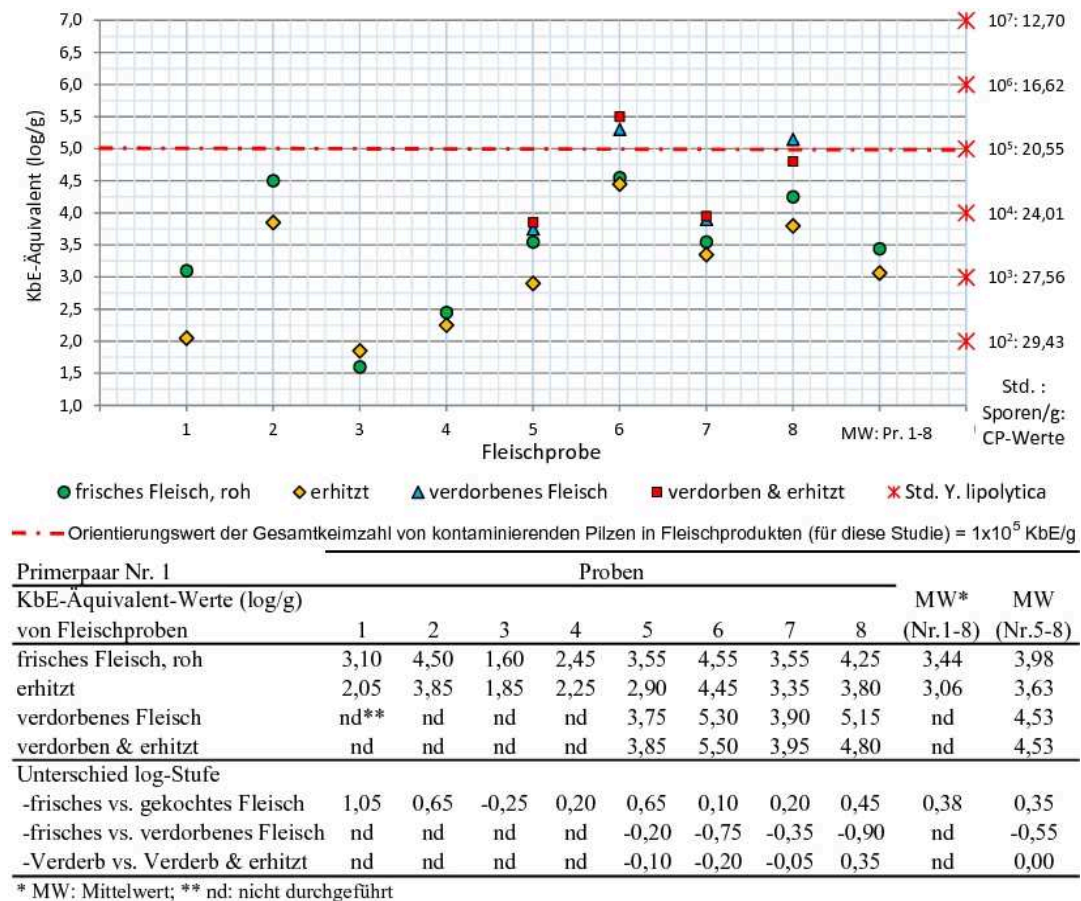


Abbildung 25: KbE-Äquivalent-Werte (log/g) von Fleischproben nach Anwendung des Primerpaars Nr. 1 (ITS1/ITS4): Vergleich zwischen frischen, erhitzten, verdorbenen und verdorbenen und erhitzten Fleischproben 1-8 (Quantifizierungs-Standard: *Y. lipolytica*)

Die Ergebnisse, die mit dem Primerpaar Nr. 9 erzielt wurden (Abbildung 26), waren durchaus mit den vorher beschriebenen Resultaten vergleichbar. Der KbE-Äquivalent-Wert (log/g) der frischen Fleischprobe 1 lag um 1,0 log-Stufen höher, die Werte der frischen Fleischproben 4 und 6 um 0,5 log-Stufen niedriger als die der erhitzten Fleischproben. Für die anderen fünf Proben waren die KbE-Äquivalent-Werte der unbehandelten und der entsprechenden erhitzten Fleischproben fast gleich.

Beim Vergleich von frischem und verdorbenem Fleisch waren die KbE-Äquivalent-Werte von verdorbenem Fleisch im Durchschnitt erwartungsgemäß um bis zu 1,0 log-Stufen (Probe 6) höher. Der Erhitzungsprozess scheint bei verdorbenen Proben keinen allzu großen Einfluss auf die Nachweisbarkeit von Pilz-DNA zu haben. Die KBE-Äquivalent-Werte unterschieden sich nur um bis zu 0,25 log-Stufen.

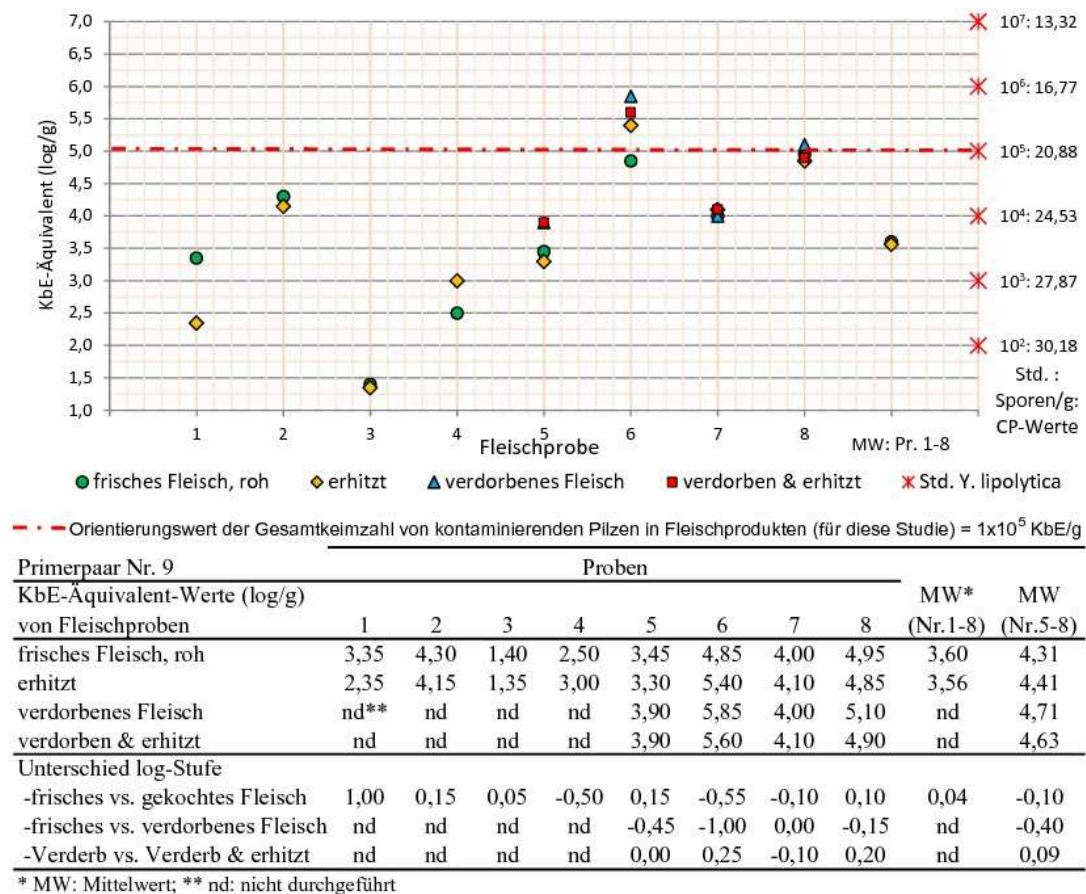


Abbildung 26: KbE-Äquivalent-Werte (log/g) von Fleischproben nach Anwendung des Primerpaares Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R): Vergleich zwischen frischen, erhitzten, verdorbenen und verdorbenen und erhitzten Fleischproben 1-8 (Quantifizierungsstandard: *Y. lipolytica*)

6.2 PCR-SSCP-Ergebnisse

6.2.1 Frisches vs. hitzebehandeltes Fleisch

Die SSCP-Analyse von frischem unbehandeltem und frischem erhitztem Fleisch mit dem Primerpaar Nr. 1 (ITS1/ITS4) ergab, dass sich die Bandenmuster der entsprechenden Proben nur unwesentlich unterschieden (**Abbildung 27**). Die dominanten Banden waren bei beiden Behandlungsgruppen (erhitzt vs. nicht erhitzt) identisch; allein bezüglich des Vorkommens schwacher Banden waren geringe Unterschiede feststellbar (z. B. bei den Fleischproben 1, 5 und 7), die jedoch nicht durchgehend einem Behandlungsverfahren zuzuordnen waren.

Die Anwendung des Primerpaares Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R) führte zu vergleichbaren Resultaten. Auch hier waren die dominanten Banden bei erhitzten und nicht erhitzten Proben praktisch identisch.

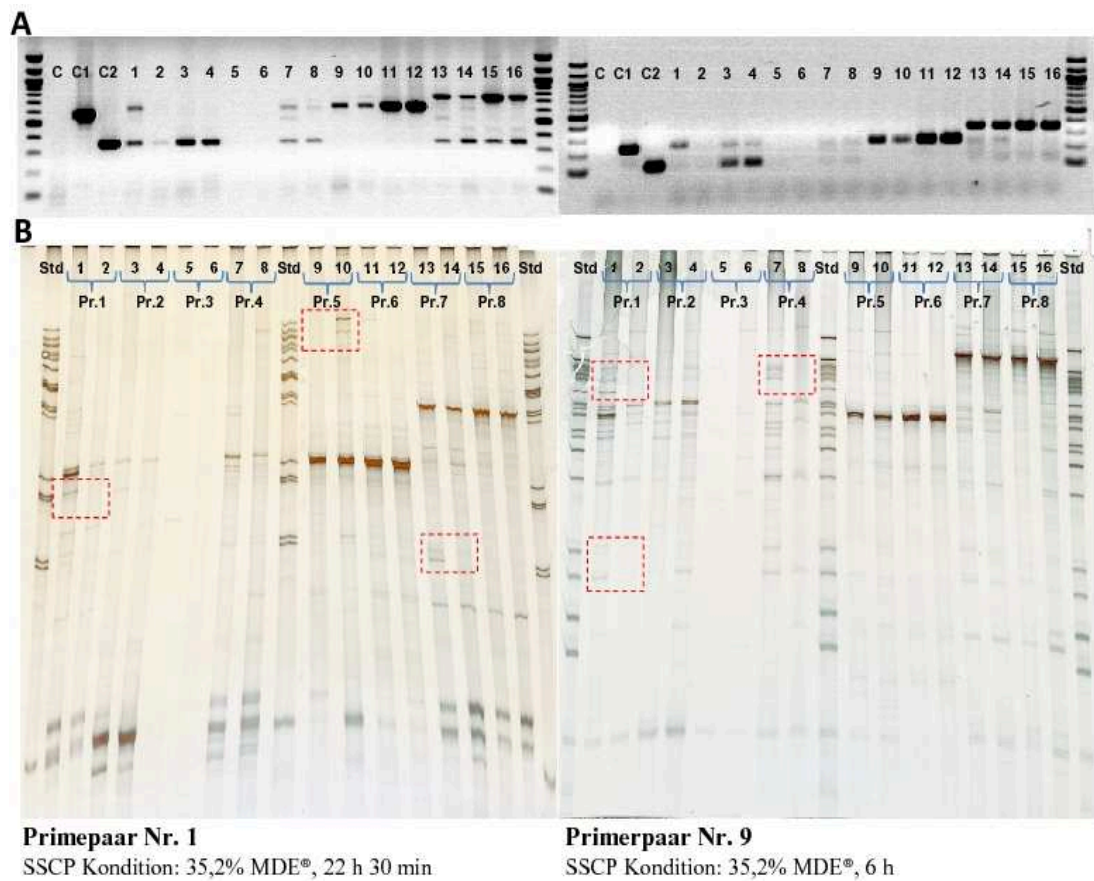


Abbildung 27: PCR-SSCP Ergebnis: Vergleich zwischen frischen und erhitzten Fleischproben 1-8 nach Anwendung der Primerpaare 1 und 9

A: Agarosegel: C: Negativ-Kontrolle; C1: *P. chrysogenum*; C2: *Y. lipolytica*

Zuordnung der Ziffern 1-16 siehe **B**

B: SSCP-Gel: Std.: Standard-Spezies; Fleischprobe

Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Pr. 5	Pr. 6	Pr. 7	Pr. 8
1 frisch	3 frisch	5 frisch	7 frisch	9 frisch	11 frisch	13 frisch	15 frisch
2 erhitzt	4 erhitzt	6 erhitzt	8 erhitzt	10 erhitzt	12 erhitzt	14 erhitzt	16 erhitzt

= zeigen die unterschiedlichen Banden

6.2.2 Frisches vs. verdorbenes Fleisch

Aliquote von vier Fleischproben (Pr. 5-8) hat der Untersucher verderben lassen. Von den nicht verdorbenen wie auch von den verdorbenen Proben wurde ein Teil erhitzt, der andere blieb unbehandelt. Die auf diese Weise entstandenen 16 Einzelproben wurden einer PCR-SSCP-Analyse unterzogen, wobei die Primerpaare Nr. 1 (ITS1/ITS4) und Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R) zum Einsatz kamen.

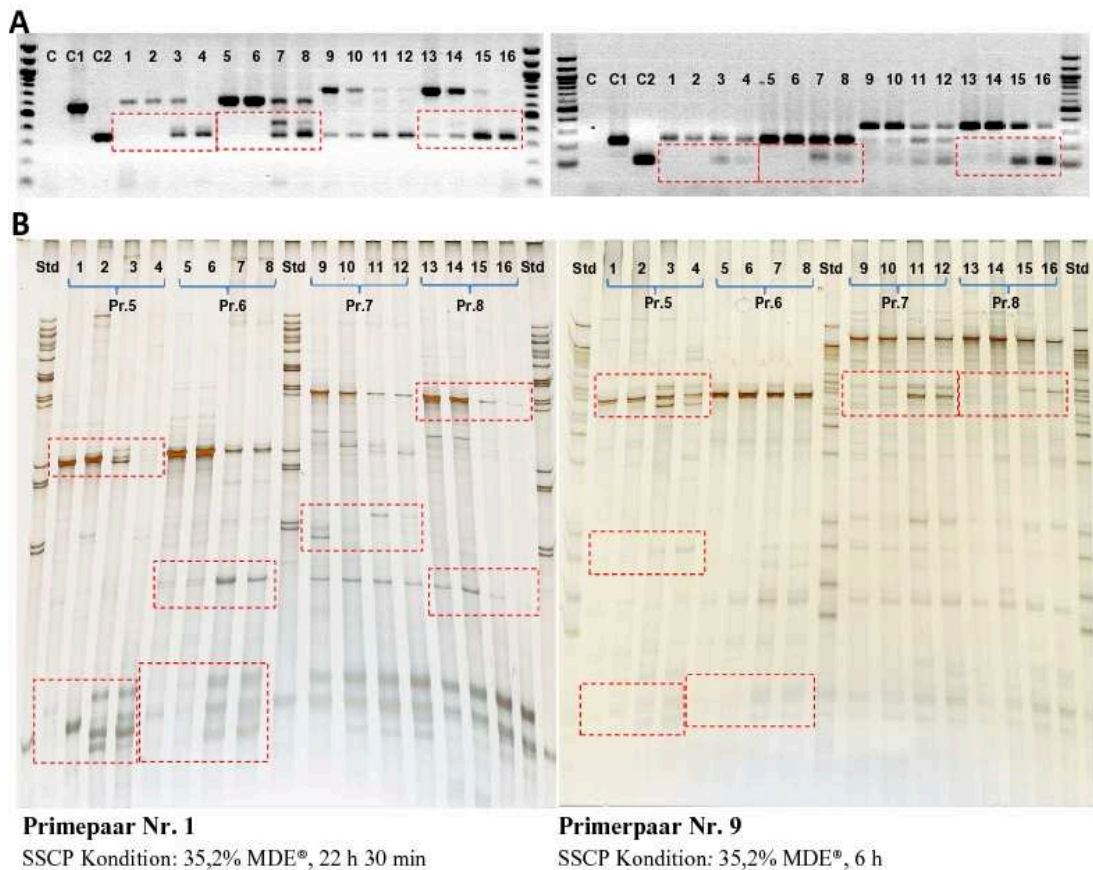


Abbildung 28: PCR-SSCP Ergebnis nach Anwendung der Primerpaare 1 und 9: Vergleich zwischen frischen und verdorbenen Fleischproben 5-8, jeweils vor und nach Erhitzung

A: Agarosegel: C: Negativ-Kontrolle; C1: *P. chrysogenum*; C2: *Y. lipolytica*

Zuordnung der Ziffern 1-16 siehe **B**

B: SSCP-Gel: Std.: Standard- Spezies; Fleischprobe

Pr.5	1 frisch	2 frisch & erhitzt	3 verdorben	4 verdorben & erhitzt
Pr.6	5 frisch	6 frisch & erhitzt	7 verdorben	8 verdorben & erhitzt
Pr.7	9 frisch	10 frisch & erhitzt	11 verdorben	12 verdorben & erhitzt
Pr.8	13 frisch	14 frisch & erhitzt	15 verdorben	16 verdorben & erhitzt

= zeigen die unterschiedlichen Banden

Abbildung 28 zeigt vergleichend die Ergebnisse der entsprechenden frischen und verdorbenen Proben jeweils vor und nach Erhitzung.

Betrachtet man zunächst die Agarosegele, so fällt auf, dass sowohl das Verderbgeschehen als auch der Erhitzungsprozess einen Einfluss auf die Bildung von Amplifikationsprodukten haben. So sind z. B. nach dem Verderben-lassen neue Banden zu beobachten (vgl. Laufspuren 1 und 2 mit 3 und 4); nach dem Erhitzungsprozess sind manche Banden schwächer oder fehlen ganz (vgl. Laufspuren 3 und 4). Dies hat natürlich Auswirkungen auf die Bandenmuster in SSCP-Gel: Banden, die bei frischem Fleisch relativ stark ausgebildet waren, waren bei verdorbenem Fleisch teilweise schwächer und, wenn das verdorbene

Fleisch erhitzt war, fast unkenntlich (Fleischproben 5 und 8, amplifiziert mit Primerpaar Nr. 1; siehe Markierung). Diese Unterschiede zeigten sich deutlich bei den mit Primerpaar Nr. 1 amplifizierten Proben. Bei den mit Primerpaar Nr. 9 amplifizierten Proben kamen die Haupt-Banden in frischem Fleisch auch bei verdorbenem Fleisch und bei erhitztem verdorbenem Fleisch vor.

7 Untersuchung der Feldproben

Insgesamt 50 Proben wurden getestet. Die Fleischproben 1-8 dienten der Validierung der Methode. Die Ergebnisse wurden in den vorhergehenden Abschnitten beschrieben. 40 Proben (Proben 9-24, 27-50) waren Fleischprodukte aus dem Handel, nur die Proben 25 und 26 waren Sojasauce (**Tabelle 28**).

Tabelle 28: Gruppen von getesteten Produkten

Fleischprobe	Gesamt	Beschreibung*
1,2; 4-8	7	Hackfleisch
3	1	Muskelfleisch (Fleischkern)
9-23	15	Pasteurisierte Fleischprodukte
24	1	Speck (vom Speck-Knödel)
25-26	2	Sojasauce
27-38	12	Dosenwurst aus Supermärkten
39-50	12	Dosenwurst aus Hausmacherkonserven
Gesamt	50	

* Name und Herkunft jeder Probe finden sich in **Tabelle 15** im Kapitel „Material und Methoden“. Die Nummern sind identisch.

7.1 Ergebnisse der qPCR

Die 50 Feldproben wurden von den Primerpaaren Nr. 1 (ITS1/ITS4) und Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R) mittels qPCR amplifiziert und quantifiziert. Das „Universal“-Primerpaar Nr. 1 (ITS1/ITS4) wurde mitgeführt, um festzustellen, inwieweit die Ergebnisse von pflanzlichen Beimengungen beeinflusst wurden. Die CP-Werte der Feldproben aus der qPCR wurden anhand der Standard-Spezies *Y. lipolytica* auf \log_{10} KbE-Äquivalent/g umgerechnet.

Die Untersuchung der Proben mit dem Primerpaar Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R, **Abbildung 29**) ergab KBE-Äquivalent-Werte zwischen „nicht nachweisbar“ (Fleischkern) und 10^6 pro Gramm (Speck). Die Produktgruppen „Hackfleisch“ und (wärmebehandelte) „Fleischprodukte aus dem Kühlregal“ wiesen deutlich höhere KBE-Äquivalent-Werte auf als Sojasaucen oder Dosenwurst.

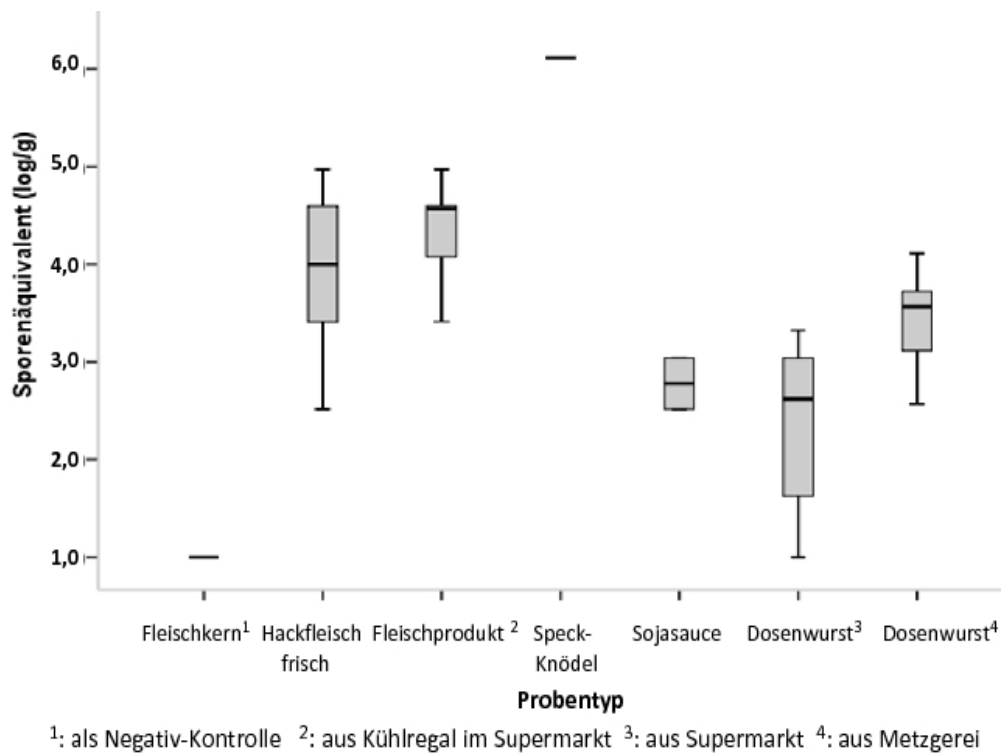


Abbildung 29: Kbe-Äquivalent-Werte (log/g) der Produkte (Gruppen): Feldproben Nr. 1-50: Errechnet nach Standard-Spezies *Y. lipolytica*, Primer Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R)

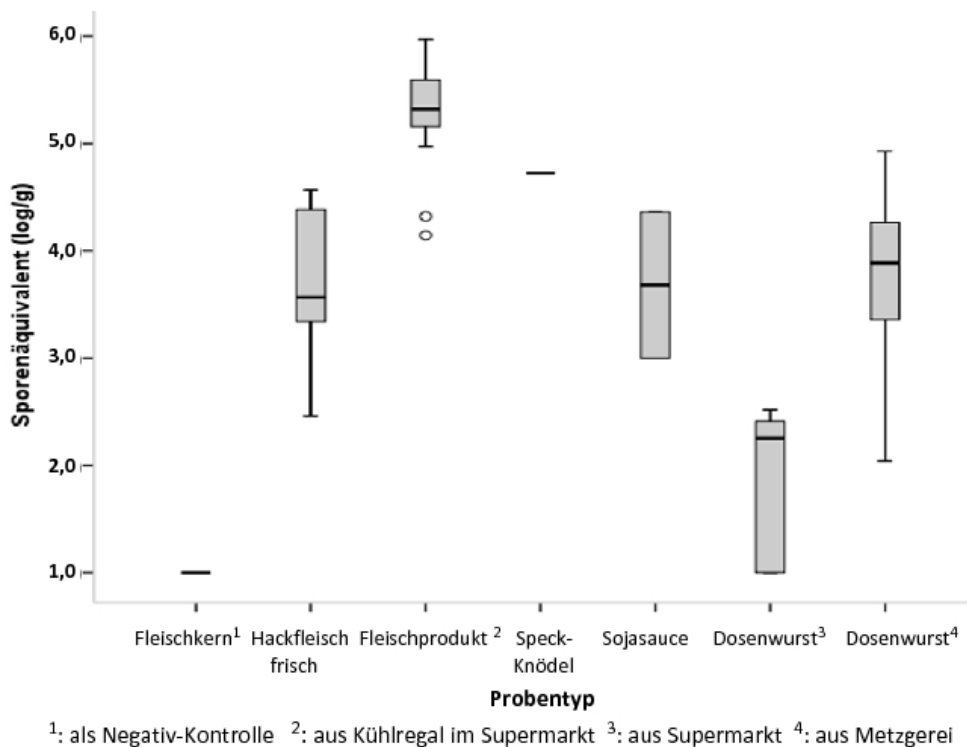


Abbildung 30: Kbe-Äquivalent-Werte (log/g) der Produkte (Gruppen): Feldproben Nr. 1-50: Errechnet nach Standard-Spezies *Y. lipolytica*, Primer Nr. 1 (ITS1/ITS4)

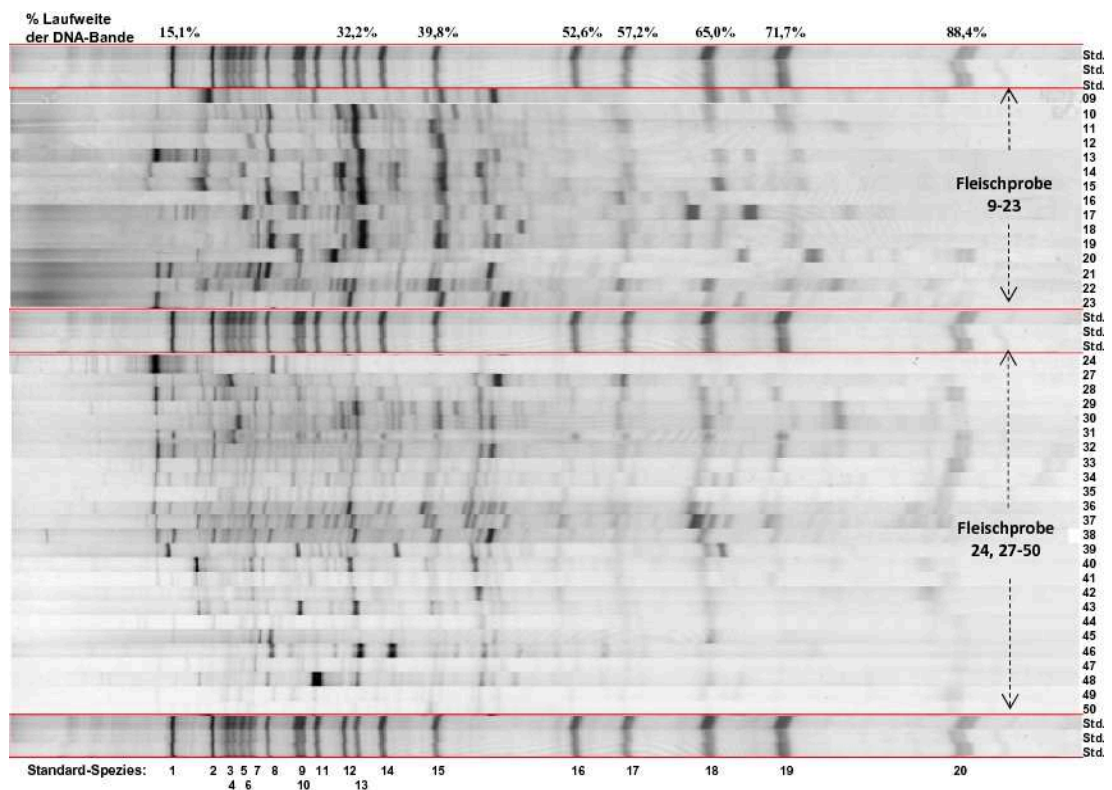
Die Verwendung des Primerpaares Nr. 1 (ITS1/ITS4, **Abbildung 30**) spiegelt im Prinzip die Resultate der Untersuchung mit Primerpaar Nr. 9 wieder. Allerdings waren insbesondere die KBE-Äquivalent-Werte für Fleischprodukte aus dem Kühlregal und Sojasaucen, teils auch für Dosenwurst, deutlich höher. Dieser Sachverhalt dürfte auf die Co-Amplifikation von DNA pflanzlichen Ursprungs zurückzuführen sein.

Die Graphiken der KBE-Äquivalent-Werte (log/g) von Einzelproben, die mit beiden Primerpaaren (Nr. 1: ITS1/ITS4 und Nr. 9: ITS1/ITS5.8R) untersucht wurden, finden sich im **Anhang 6**.

7.2 Ergebnisse der PCR-SSCP-Analyse

Die SSCP-Gele mit den PCR-Produkten aus den Feldproben, die vom Primerpaar Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R) amplifiziert wurden, wurden für 15 pasteurisierte und 25 sterilisierte Fleischprodukte mit GelCompar[®]-II ausgewertet. Die pasteurisierten Fleischproduktproben bildeten 16 bis 33 Banden, im Durchschnitt 24; sterilisierte Fleischproduktproben generierten im Durchschnitt 25 (19 bis 40) Banden. **Abbildung 31** zeigt die DNA-Banden der Feldproben und der Standard-Spezies im SSCP-Gel nach der Auswertung mit GelCompar[®]-II. Die Bilder im SSCP-Gel der Feldproben vor der Auswertung finden sich im **Anhang 7**.

Nach der Auswertung mit GelCompar[®]-II wurden alle DNA-Banden unterschiedlicher Laufweiten – sowohl solche mit hoher, als auch solche mit niedriger Prävalenz – für die Sequenzierung ausgewählt (siehe nächster Abschnitt: **7.2.1**)



Proben

Pasteurisierte Fleischprodukte: von Supermärkten

9 Leberkäse: Haudek	14 Leberkäse: Vinzenzmurr	19 Bio-Fleischkäse: Rewe-Bio
10 Lyoner: Schmäzle	15 Kalbfleischwurst: Vinzenzmurr	20 Würstchen: Ja!
11 Schinkenwurst: Schmitz	16 Bio-Schinkenwurst fein: Altdorfer	21 Leberkäse: Metzgerfrisch
12 Jagdwurst: Schmitz	17 Leberkäse: Sieber	22 Lyoner: Gebirgsjäger
13 Wiener Gewurschl: Vinzenzmurr	18 Lyoner: Wilhelm Brandenburg	23 Wiener Würstchen: Dulano

Dosenwurst: von Supermärkten

24 Speck Knödel: Pfanni	29 Schinkenwurst: Dietz	34 Jagdwurst: Müller
25 Sojasauce 1*	30 Lyoner: Dietz	35 Jagdwurst: Lutz
26 Sojasauce 2*	31 Lyoner Bio: Rewe	36 Bierwurst: Lutz
27 Eisbeinflisch in Aspik: Dreisterne	32 BIO Lyoner. Biolance	37 Bierwurst: Eidmann
28 Eisbeinflisch in Aspik: Simon	33 Jagdwurst: Eifel	38 Nürnberger Rostbratwürste*

Dosenwurst: von lokalen Metzgereien (Hausmacherkonserven)

39 Rotwurst*	43 Weißer Pressack*	47 Gekochte Mettwurst*
40 Fleischkäse*	44 Leberkäs*	48 Schinken Rotwurst*
41 Schinkenwurst*	45 Hausmacher Leberwurst*	49 Thalheimer Stadtwurst*
42 Bratwurstteig*	46 Bratwurstgehäck*	50 Oma's Bratwurstgehäck*

Standard-Spezies

1 <i>S. cerevisiae</i> (DSM 70451)	8 <i>Absidia glauca</i> (1 st Bande)	15 <i>E. rubrum</i>
2 <i>S. cerevisiae</i> (DSM 4531)	9 <i>A. ochraceus</i>	16 <i>Trichosporon gracile</i>
3 <i>A. fumigatus</i>	10 <i>Absidia glauca</i> (2 nd Bande)	17 <i>Cryptococcus curvatus</i>
4 <i>P. chrysogenum</i>	11 <i>Acremonium</i> sp.	18 <i>Candida krusei</i>
5 <i>A. parasiticus</i>	12 <i>Rhizopus oryzae</i>	19 <i>Pichia membranaefaciens</i>
6 <i>A. flavus</i>	13 <i>Alt. alternata</i>	20 <i>Yarrowia lipolytica</i>
7 <i>Aureobasidium pullurans</i>	14 <i>A. vesicolor</i>	

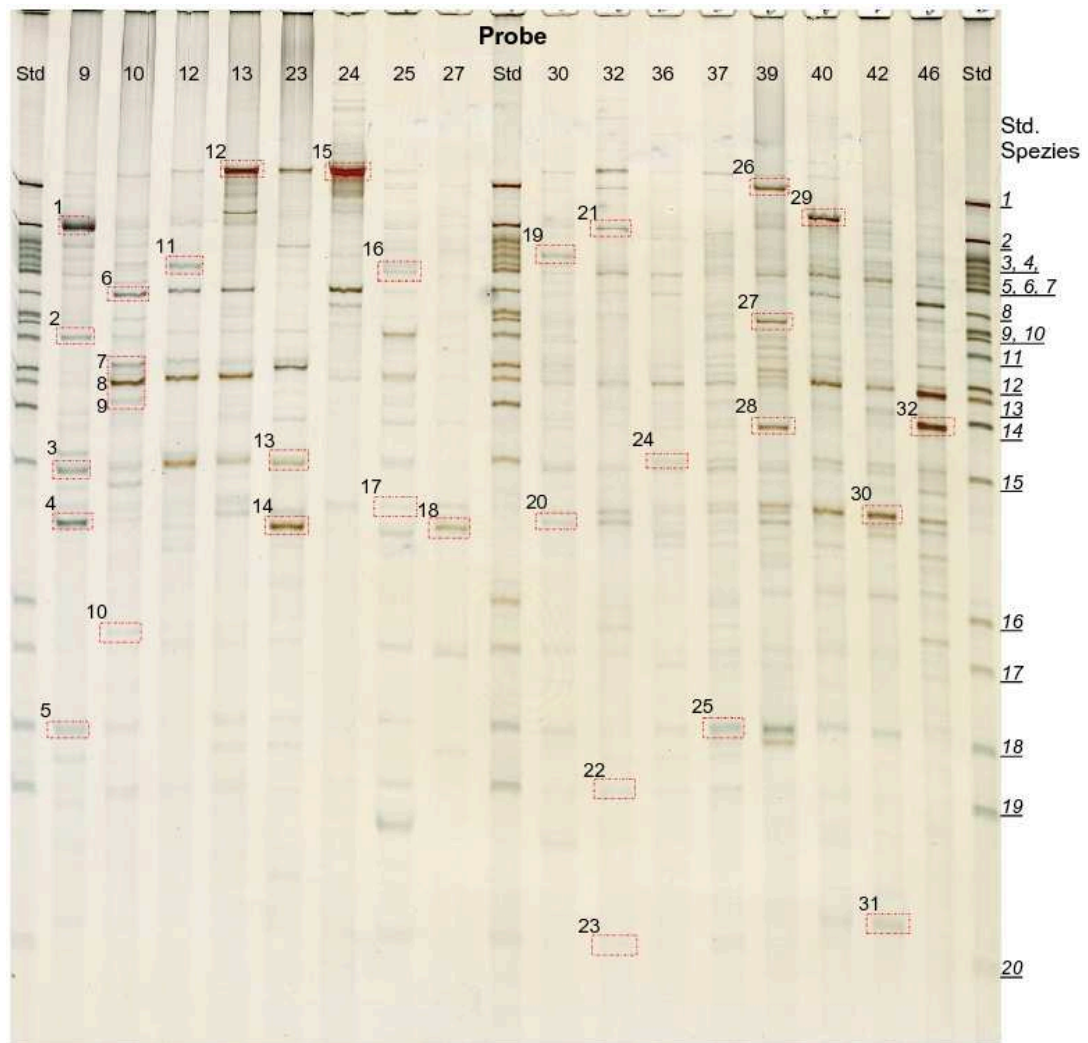
Abbildung 31: PCR-SSCP Ergebnisse nach Normalisierung mit der Software GelCompar[®]-II: DNA-Banden von Feldproben und von Standard-Spezies

* Hersteller, siehe Tabelle 15

7.2.1 Sequenzierungsergebnisse der DNA-Banden

Aus 16 Proben wurden 32 DNA-Banden der Amplifikate von Primerpaar Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R) mit unterschiedlichen Laufweiten (**Abbildung 32**) zur Identifizierung der Pilz-Spezies sequenziert. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 29** dargestellt. Alle 32 DNA-Banden stammten von Pilzen. Dieses Ergebnis bestätigt erneut die Pilz-Spezifität des Primerpaars Nr. 9. Darunter waren 10 Spezies, die Pflanzen als Endophyten (Bande 26) oder Pathogene (Bande 4, 6, 7, 9, 11, 19, 20, 24 und 32) befallen können. Die anderen identifizierten Pilze, die auch nach der Literatur häufig oder gelegentlich in Fleischwaren vorkommen, waren z. B. *A. penicillioides* (Bande 1), *Xeromyces bisporus* (Bande 2), *E. amstelodami* (Bande 3), *Alt. alternata* (Bande 8), *Issatchenkia orientalis* (Bande 5 und 25), *Wallemia sebi* (Bande 10), *C. tropicalis* (Bande 13), *Epicoccum nigrum* (Bande 17 und 30), *Pichia membranifaciens* (Bande 22), *Candida* spp. (Bande 23), *C. zeylanoides* (Bande 27), *Pichia caribbica* (Bande 28), *C. rugosa* (Bande 31). Auch die Backhefe *S. cerevisiae* (Banden 12, 15 und 21) wurde in einigen Fleischproben identifiziert.

Drei gewürzte Fleischprodukte wurden mit dem Primerpaar Nr. 1 (ITS1/ITS4) untersucht. Drei DNA-Banden (von den Fleischproben 9, 10 und 12) wurden sequenziert. Eine Bande erwies sich als *Aspergillus penicillioides* (99%ige Identität), eine als *Alternaria alternata* (100%ige Identität). Die dritte Bande aus Fleischprobe Nr. 10 (Lyoner) war in der Tat DNA von einem Gewürz, nämlich Koriander (*Coriandrum sativum*, 100%ige Identität).



Primerpaar Nr. 9: ITS1/ITS5.8R: SSCP Kondition: 35,2% MDE[®], 6 h

Abbildung 32: PCR-SSCP-Ergebnisse ausgewählter Produkte; die links neben den Laufspuren angebrachten Zahlen markieren die zur Sequenzierung aus dem SSCP-Gel ausgeschnittenen DNA-Banden (Spezies-Identifikation, siehe Tabelle 29)

Probe (oben)

9 Leberkäse: Haudek	25 Sojasauce: Kikkoman	39 Rotwurst: Oliver Holzheid
10 Lyoner: Schmälzle	27 Eisbeinfl Fleisch in Aspik: Dreisterne	40 Fleischkäse: Oliver Holzheid
12 Jagdwurst: Schmitz	30 Lyoner: Dietz	42 Bratwurstteig: Oliver Holzheid
13 Wiener Gewürschtl: Vinzenz Murr	32 BIO Lyoner. Biolance	46 Bratwurstgehäck: Metzgerei - Franz Rühl
23 Wiener Würstchen: Dulano	36 Bierwurst: Lutz	
24 Speck-Knödel: Pfanni	37 Bierwurst: Eidmann	

Standard-Spezies (recht)

1 <i>S. cerevisiae</i> (DSM 70451)	8 <i>Absidia glauca</i> (1 st Bande)	15 <i>E. rubrum</i>
2 <i>S. cerevisiae</i> (DSM 4531)	9 <i>A. ochraceus</i>	16 <i>Trichosporon gracile</i>
3 <i>A. fumigatus</i>	10 <i>Absidia glauca</i> (2 nd Bande)	17 <i>Cryptococcus curvatus</i>
4 <i>P. chrysogenum</i>	11 <i>Acremonium</i> sp.	18 <i>Candida krusei</i>
5 <i>A. parasiticus</i>	12 <i>Rhizopus oryzae</i>	19 <i>Pichia membranaefaciens</i>
6 <i>A. flavus</i>	13 <i>Alt. alternata</i>	20 <i>Yarrowia lipolytica</i>
7 <i>Aureobasidium pullurans</i>	14 <i>A. vesicolor</i>	

 Die zur Sequenzierung ausgeschnittenen DNA-Banden

Tabelle 29: Sequenzierungsergebnisse der Amplifikate vom Primerpaar Nr. 9 aus Feldproben

Ban de	Probe	Sequenzalignment	% Iden.	Gesamt*	Anmerkungen
1	9	<i>Aspergillus penicillioides</i>	98%	10	Xerophiler Schimmelpilz
2	9	<i>Xeromyces bisporus</i>	99%	3	Xerophiler Schimmelpilz; Habitat: Lebensmittel und Produkte mit niedriger Wasseraktivität z.B. Gewürze, Schokolade
3	9	<i>Eurotium amstelodami</i>	100%	28	<i>Eurotium amstelodami</i> = Teleomorphe Form von <i>Aspergillus glaucus</i>
4	9	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	100%	40	<i>Botryosphaeria rhodina</i> = Teleomorphe Form von <i>Lasiodiplodia theobromae</i> ; <u>Pflanzenpathogen</u>
		<i>Botryosphaeria rhodina</i>	100%	25	
5	9	<i>Issatchenkia orientalis</i>	100%	5	<i>Issatchenkia orientalis</i> : Synonym: <i>Candida</i>
		<i>Pichia kudriavzevii</i>	100%	2	<i>krusei</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Saccharomyces</i> sp.
		<i>Saccharomyces</i> spp.	100%	2	P1, <i>Candida acidothermophilum</i>
6	10	<i>Lewia infectoria</i>	100%	36	<i>Lewia infectoria</i> = Teleomorphe Form von <i>Alternaria infectoria</i> ; <u>Pflanzenpathogen</u>
		<i>Lewia ethzedia</i>	100%	2	
		<i>Alternaria</i> sp.	100%	9	
7	10	<i>Pleospora herbarum</i>	99%	9	<i>Pleospora herbarum</i> = Teleomorphe Form von <i>Stemphylium vesicarium</i> ; <u>Pflanzenpathogen</u> für z.B. Spargel, Zwiebel
		<i>Stemphylium vesicarium</i>	99%	7	
8	10	<i>Alternaria alternata</i>	100%	9	
9	10	<i>Botrytis aclada</i>	99%	3	<i>Botrytis</i> : Synonym = <i>Botryotinia</i> ; <u>Pflanzenpathogen</u> für Zwiebel und Knoblauch
10	10	<i>Wallemia sebi</i>	99%	11	Xerophiler Schimmelpilz; Habitat: Innenraumluft, Boden, Brot, Fisch, Fleisch, Speck
11	12	<i>Neofusicoccum parvum</i>	100%	79	<i>Botryosphaeria parva</i> = Teleomorphe Form von <i>Neofusicoccum parvum</i> ; <u>Pflanzenpathogen</u> für z.B. Muskatnuss
		<i>Neofusicoccum ribis</i>	100%	7	
		<i>Botryosphaeria parva</i>	100%	6	
12	13	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100%	33	
13	23	<i>Candida tropicalis</i>	99%	57	
14	23	<i>Pichia jadinii</i>	99%	2	<i>Pichia jadinii</i> : Synonym: <i>Cyberlindnera jadinii</i> , <i>Candida utilis</i> , <i>Torula utilis</i>
15	24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100%	32	
16	25**	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100%	39	
17	25**	<i>Epicoccum nigrum</i>	99%	31	<u>Saprophyter Pilz</u> : Weltweit verbreitet, findet sich bei Pflanzen, Innen- und Außenraumluft
18	27	<i>Phoma acetosellae</i>	100%	1	<i>Phoma</i> spp.: <u>Pflanzenmaterial</u> , Innenraumluft
19	30	<i>Macrophomina phaseolina</i>	100%	85	<u>Pflanzenpathogen</u> für z.B. Sojabohnen, Mais
20	30	<i>Lasiodiplodia parva</i>	100%	7	<i>Botryosphaeria rhodina</i> = Teleomorphe Form von <i>Lasiodiplodia theobromae</i> ; <u>Pflanzenpathogen</u>
		<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	100%	6	
		<i>Botryosphaeria rhodina</i>	100%	5	
21	32	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98%	41	
22	32	<i>Pichia membranifaciens</i>	100%	18	
23	32	<i>Candida</i> spp.	99%	8	
24	36	<i>Itersonilia perplexans</i>	100%	1	<u>Pflanzenpathogen</u> für z.B. Dillkraut
25	37	<i>Issatchenkia orientalis</i>	100%	7	siehe Bande Nr. 5
26	39	<i>Guignardia mangiferae</i>	99%	71	<u>Endophyt</u> für viele Pflanzen
27	39	<i>Candida zeylanoides</i>	99%	16	
28	39	<i>Pichia caribbica</i>	99%	17	<i>Pichia caribbica</i> : Synonym: <i>Candida fermentati</i> , <i>Meyerozyma caribbica</i> , <i>Torula fermentati</i>
		<i>Meyerozyma caribbica</i>	99%	7	
		<i>Candida fermentati</i>	99%	2	
29	40	Pilz-DNA	100%	2	(Accession Nr. in Genbank: AM711413 und AM711444)
30	42	<i>Epicoccum nigrum</i>	99%	28	siehe Bande Nr. 17
31	42	<i>Candida rugosa</i>	92%	3	
32	46	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	100%	37	<u>Pflanzenpathogen</u>

* Gesamtzahl der in Genbank enthaltenen Einträge mit der angegebenen Identität

** Sojasauce

7.2.2 Orientierende Daten zur Prävalenz von Pilzen in Feldproben

Zur Auswertung der SSCP-Gele wurden die einzelnen Gele mit Hilfe der Software GelCompar[®]-II anhand des Speziestands „normalisiert“. Die Zuordnung der Banden erfolgte aufgrund der „relativen Laufweite“ im Vergleich zum Speziestandard und im Vergleich zu den sequenzierten Banden (siehe 7.2.1). Bei einem solchen Vorgehen muss man sich bewusst sein, dass ein Resultat nur einen orientierenden Charakter hat, da die produzierten Einzelstränge unterschiedlicher Pilzarten durchaus gleiche relative Laufweiten aufweisen können. Diese Problematik könnte nur umgangen werden, wenn jede einzelne Bande eine Sequenzierung zugeführt werden würde, was aus Zeit- und Kostengründen nicht möglich war.

Trotz dieser Einschränkung wurde versucht, das Spektrum der Pilzflora in den untersuchten Lebensmitteln tierischen Ursprungs zu charakterisieren. Insgesamt konnten 37 Banden identifiziert werden, die aufgrund der vorher angegebenen Kriterien und unter Berücksichtigung möglicher Doppelt- und Dreifachbelegung mindestens 54 unterschiedliche Pilzarten repräsentieren können.

Dabei handelt es sich sowohl um Arten, die ihren primären Standort auf Pflanzen haben und somit vermutlich via „Gewürze“ in die Produkte gelangten, wie auch um Arten, die als „ubiquitär“ gelten und somit als Kontaminanten der Ausgangsprodukte in Betracht kommen.

Am häufigsten scheinen *Epicoccum nigrum*, *Eurotium rubrum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Alternaria alternata*, *Acremonium* sp. und *Absidia glauca* bzw. *Lewia infectoria* vorzukommen (**Tabelle 30**). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass sich z. B. hinter *Alternaria alternata* auch noch *Cla. herbarum*, *M. spinosus* oder *Rhodotorula* sp. verbergen könnte. Vergleicht man die Resultate der pasteurisierten Proben mit denen von sterilisierten, so fällt auf, dass allem Anschein nach vor allem die DNA von *Candida krusei* oder *Yarrowia lipolytica* häufig in sterilisierten Proben nachweisbar ist.

Tabelle 30: Zuordnung der DNA-Banden aus SSCP-Analysen von Feldproben zur Laufweite der Referenz-Pilz-Spezies und der sequenzierten Banden; Auswertung mit GelCompar®-II

Bande	% Laufweite im SSCP-Gel	Referenz-Pilz-Spezies (von Reinkultur und Sequenzierung*)		Prävalenz in Fleischprodukten					
		in Fleisch Vorkommen	in Gewürze Vorkommen	Pasteurisiert (n=15)		Sterilisiert (n=25)		Alle Probe (n=40)	
				n	%	n	%	n	%
1	13,4%	<i>S. cerevisiae</i> *	-	4	27%	2	8%	6	15%
2	13,7%	<i>S. cerevisiae</i> *	-	8	53%	18	72%	26	65%
3	15,1%	<i>S. cerevisiae</i> (DSM 70451)	<i>Guignardia mangiferae</i> *	5	33%	14	56%	19	48%
4**	17,5%	Pilz-DNA (Accession Nr. in Genbank: AM711444)		5	33%	16	64%	21	53%
5**	18,2%	<i>Aspergillus penicillioides</i> *	-	12	80%	15	60%	27	68%
6**	19,0%	<i>S. cerevisiae</i> (DSM 4531)	-	3	20%	14	56%	17	43%
7**	20,1%	<i>Aspergillus fumigatus</i> ¹	-	6	40%	17	68%	23	58%
8**	20,9%	<i>Penicillium chrysogenum</i> ²	<i>Macrophomina phaseolina</i> *	8	53%	13	52%	21	53%
9**	21,7%	<i>Aspergillus parasiticus</i>	-	6	40%	14	56%	20	50%
10**	22,6%	<i>Aspergillus flavus</i> ³	<i>Neofusicoccum parvum</i> *	8	53%	21	84%	29	73%
11**	23,0%	<i>Aureobasidium pullurans</i>	-	11	73%	15	60%	26	65%
12	24,0%	<i>Absidia glauca</i> (1 st Bande)	<i>Lewia infectoria</i> *	12	80%	18	72%	30	75%
13	26,7%	<i>Candida zeylanoides</i> * ⁴	-	11	73%	16	64%	27	68%
14	27,5%	<i>Absidia glauca</i> (2 nd Bande)	-	6	40%	16	64%	22	55%
15	28,4%	<i>Acremonium</i> spp. ⁵	-	11	73%	20	80%	31	78%
16	30,2%	-	<i>Pleospora herbarum</i> *	10	67%	15	60%	25	63%
17	31,1%	<i>Rhizopus oryzae</i>	-	11	73%	16	64%	27	68%
18	32,2%	<i>Alternaria alternata</i> ⁶	-	9	60%	21	84%	30	75%
19	32,8%	-	<i>Botrytis aclada</i> *	10	67%	3	12%	13	33%
20	34,8%	<i>Aspergillus vesicolor</i>	-	7	47%	14	56%	21	53%
21	35,6%	-	<i>Botryotinia fuckeliana</i> *	11	73%	9	36%	20	50%
22	36,4%	<i>Pichia caribbica</i> *	-	12	80%	16	64%	28	70%
23	39,1%	-	<i>Itersonilia perplexans</i> *	6	40%	14	56%	20	50%
24	39,8%	<i>Eurotium rubrum</i> ⁷	-	11	73%	21	84%	32	80%
25	40,5%	<i>Candida tropicalis</i> *	-	8	53%	4	16%	12	30%
26	43,9%	<i>Epicoccum nigrum</i> *	-	10	67%	24	96%	34	85%
27	45,0%	-	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> *	11	73%	20	80%	31	78%
28	45,7%	<i>Phoma acetosellae</i> *	-	2	13%	11	44%	13	33%
29	46,4%	<i>Pichia jadinii</i> *	-	3	20%	3	12%	6	15%
30	52,6%	<i>Trichosporon gracile</i>	-	0	0%	3	12%	3	8%
31	56,5%	<i>Wallemia sebi</i> *	-	4	27%	8	32%	12	30%
32	57,2%	<i>Cryptococcus curvatus</i> ⁸	***	7	47%	11	44%	18	45%
33	63,7%	<i>Issatchenkia orientalis</i> ⁹ *	***	1	7%	5	20%	6	15%
34	65,0%	<i>Candida krusei</i> ⁹	-	5	33%	18	72%	23	58%
35	71,7%	<i>Pichia membranaefaciens</i>	-	3	20%	6	24%	9	23%
36	85,7%	<i>Candida rugosa</i>	-	1	7%	5	20%	6	15%
37	88,4%	<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	1	7%	15	60%	16	40%

Pilze, die nach Erkenntnissen dieser Studie gleiche Laufweiten wie die Referenz-Pilz-Spezies aufweisen

¹ *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*

² *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium verrucosum*

³ *Penicillium expansum*, *Penicillium roqueforti*

⁴ *Aspergillus ochraceus*

⁵ *Fusarium* spp., *Xeromyces bisporus**

⁶ *Cladosporium herbarum*, *Mucor spinosus*, *Rhodotorula* spp.

⁷ *Aspergillus glaucus*, *Candida albicans*, *Eurotium amstelodami*

⁸ *Wallemia sebi* (DSM 5329)

⁹ *Candida krusei*: Synonym: *Issatchenkia orientalis**

- keine Information

* Bande aus SSCP-Gel, sequenziert

** Banden 4-11: schwierig zu differenzieren

*** DNA-Banden von beiden Pilzen sind gelegentlich auf gleiche Laufweite

■ Zeigen der große Prävalenz-Unterschied zwischen pasteurisierten und sterilisierten Fleischproben

Tabelle 31: Zuordnung bedeutender DNA-Banden aus SSCP-Analysen von Feldproben mittels GelCompar®-II-Auswertung

Fleisch- Probe	Gesamt- Bande/Pr.	Bedeutende-DNA-Bande (in SSCP-Gel auf gleiche Höhe von:)		
		Haupt-Bande 1	Haupt-Bande 2	Haupt-Bande 3
Pr.09	22	<i>Aspergillus penicillioides</i> *	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> *	<i>Eurotium rubrum</i> ⁷
Pr.10	30	<i>Alternaria alternata</i> ⁶	<i>Lewia infectoria</i> *	<i>Pleospora herbarum</i> *
Pr.11	29	<i>Alternaria alternata</i> ⁶	<i>Itersonia perplexans</i> *	<i>Lewia infectoria</i> *
Pr.12	16	<i>Alternaria alternata</i> ⁶	<i>Candida tropicalis</i> *	<i>Lewia infectoria</i> *
Pr.13	21	<i>S. cerevisiae</i> *	<i>Alternaria alternata</i> ⁶	<i>Lewia infectoria</i> *
Pr.14	20	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Botrytis aclada</i> *	<i>Candida tropicalis</i> *
Pr.15	24	<i>Alternaria alternata</i> ⁶	<i>Eurotium rubrum</i> ⁷	<i>Pleospora herbarum</i> *
Pr.16	19	<i>Botrytis aclada</i> *	<i>Lewia infectoria</i> *	<i>Candida zeylanoides</i> *· ⁴
Pr.17	30	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i> * ⁹	<i>Pleospora herbarum</i> *
Pr.18	16	<i>Botrytis aclada</i> *	<i>Lewia infectoria</i> *	<i>Aureobasidium pullurans</i>
Pr.19	21	<i>Botrytis aclada</i> *	<i>Lewia infectoria</i> *	<i>Eurotium rubrum</i> ⁷
Pr.20	24	<i>Pleospora herbarum</i> *	<i>Candida zeylanoides</i> *· ⁴	-
Pr.21	23	<i>Lewia infectoria</i> *	<i>Aureobasidium pullurans</i>	<i>S. cerevisiae</i> (DSM 70451) ¹⁰
Pr.22	33	<i>Eurotium rubrum</i> ⁷	<i>Alternaria alternata</i> ⁶	<i>Rhizopus oryzae</i>
Pr.23	26	<i>Pichia jadinii</i> *	<i>Alternaria alternata</i> ⁶	<i>S. cerevisiae</i> *
Pr.24	19	<i>S. cerevisiae</i> *	-	-
Pr.27	22	<i>Phoma acetosellae</i> *	<i>Penicillium chrysogenum</i> ²	<i>Cryptococcus curvatus</i> ⁸
Pr.28	30	<i>S. cerevisiae</i> *	<i>Aspergillus penicillioides</i> *	<i>Aureobasidium pullurans</i>
Pr.29	31	<i>Alternaria alternata</i> ⁶	<i>Eurotium rubrum</i> ⁷	<i>Epicoccum nigrum</i> *
Pr.30	29	<i>Penicillium chrysogenum</i> ²	<i>Eurotium rubrum</i> ⁷	<i>Alternaria alternata</i> ⁶
Pr.31	30	<i>S. cerevisiae</i> (DSM 70451) ¹⁰	<i>S. cerevisiae</i> (DSM 4531)	<i>Penicillium chrysogenum</i> ²
Pr.32	26	<i>S. cerevisiae</i> *	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> *	<i>S. cerevisiae</i> (DSM 70451) ¹⁰
Pr.33	25	<i>S. cerevisiae</i> *	<i>Pichia caribbica</i> *	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Pr.34	26	<i>S. cerevisiae</i> *	<i>Candida zeylanoides</i> *· ⁴	<i>Pleospora herbarum</i> *
Pr.35	23	<i>Alternaria alternata</i> ⁶	<i>Epicoccum nigrum</i> *	<i>Issatchenkia orientalis</i> * ⁹
Pr.36	30	<i>Alternaria alternata</i> ⁶	<i>Itersonia perplexans</i> *	<i>Issatchenkia orientalis</i> * ⁹
Pr.37	40	<i>Issatchenkia orientalis</i> * ⁹	<i>Candida krusei</i> ⁹	<i>Alternaria alternata</i> ⁶
Pr.38	26	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> *	<i>Alternaria alternata</i> ⁶	<i>S. cerevisiae</i> (DSM 70451) ¹⁰
Pr.39	26	<i>S. cerevisiae</i> (DSM 70451) ¹⁰	<i>Candida zeylanoides</i> *· ⁴	<i>Pichia caribbica</i> *
Pr.40	25	<i>Alternaria alternata</i> ⁶	<i>Epicoccum nigrum</i> *	<i>Aspergillus flavus</i> ³
Pr.41	21	<i>Candida krusei</i> ⁹	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Alternaria alternata</i> ⁶
Pr.42	25	<i>Epicoccum nigrum</i> *	<i>Alternaria alternata</i> ⁶	<i>Candida rugosa</i>
Pr.43	24	<i>Candida zeylanoides</i> *· ⁴	<i>Alternaria alternata</i> ⁶	-
Pr.44	17	<i>Epicoccum nigrum</i> *	<i>Candida krusei</i> ⁹	<i>Aspergillus flavus</i> ³
Pr.45	23	<i>Lewia infectoria</i> *	<i>Aureobasidium pullurans</i>	<i>Candida krusei</i> ⁹
Pr.46	21	<i>Botrytis aclada</i> *	<i>Botrytinia fuckeliana</i> *	<i>Lewia infectoria</i> *
Pr.47	19	<i>Aspergillus flavus</i> ³	<i>Epicoccum nigrum</i> *	<i>Botrytis aclada</i> *
Pr.48	22	<i>Absidia glauca</i> (2 nd Bande)	<i>Acremonium</i> spp. ⁵	<i>Alternaria alternata</i> ⁶
Pr.49	19	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Candida krusei</i> ⁹	-
Pr.50	15	<i>Itersonia perplexans</i> *	<i>Yarrowia lipolytica</i>	-

Pilze, die nach Erkenntnissen dieser Studie gleiche Laufweiten wie die Referenz-Pilz-Spezies aufweisen

² *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium verrucosum*, *Macrophomina phaseolina**

³ *Penicillium expansum*, *Penicillium roqueforti*, *Neofusicoccum parvum**

⁴ *Aspergillus ochraceus*

⁵ *Fusarium* spp., *Xeromyces bisporus* *

⁶ *Cladosporium herbarum*, *Mucor spinosus*, *Rhodotorula* spp.

⁷ *Aspergillus glaucus*, *Candida albicans*, *Eurotium amstelodami*

⁹ *Candida krusei* : Synonym: *Issatchenkia orientalis**

¹⁰ *Guignardia mangiferae**

* Bande aus SSCP-Gel, sequenziert

Tabelle 32: Prävalenz bedeutender DNA-Banden in PCR-SSCP-Analysen von Lebensmitteln tierischen Ursprungs (nach Tabelle 31)

Nr.	Spezies	Anzahl der bedeutenden Banden			%
		Pasteurisiert n=15	Sterilisiert n=25	Alle n= 40	
1	<i>Alternaria alternata</i> ⁶	7	11	18	45%
2	<i>Lewia infectoria</i> *	8	2	10	25%
3	<i>Candida krusei</i> ⁹	1	8	9	23%
4	<i>Botrytis aclada</i> *	4	2	6	15%
5	<i>Epicoccum nigrum</i> *	0	6	6	15%
6	<i>Eurotium rubrum</i> ⁷	4	2	6	15%
7	<i>Candida zeylanoides</i> *. ⁴	2	3	5	13%
8	<i>Pleospora herbarum</i> *	4	1	5	13%
9	<i>Aureobasidium pullurans</i>	2	2	4	10%
10	<i>Yarrowia lipolytica</i>	0	4	4	10%
11	<i>S. cerevisiae</i> *	2	5	7	18%
12	<i>S. cerevisiae</i> (DSM 70451) ¹⁰	1	4	5	13%
13	<i>S. cerevisiae</i> (DSM 4531)	0	1	1	3%

Pilze, die nach Erkenntnissen dieser Studie gleiche Laufweiten wie die Referenz-Pilz-Spezies aufweisen

⁴ *Aspergillus ochraceus*

⁶ *Cladosporium herbarum*, *Mucor spinosus*, *Rhodotorula* spp.

⁷ *Aspergillus glaucus*, *Candida albicans*, *Eurotium amstelodami*

⁹ *Candida krusei*: Synonym: *Issatchenkia orientalis**

¹⁰ *Guignardia mangiferae**

* Bande aus SSCP-Gel, sequenziert

Wertet man mit dem gleichen Verfahren die drei dominierenden Banden aus, so ergibt sich das in **Tabelle 31** aufgelistete Pilz-Spektrum. Dabei dominieren die Arten *Alternaria alternata*, *Lewia infectoria*, *Candida krusei*, *Botrytis aclada* oder *Epicoccum nigrum* (vgl. **Tabelle 32**). Auch hier ist – wie in den **Tabelle 31** und **Tabelle 32** dargestellt - zu berücksichtigen, dass eine Bande auch andere Pilzarten repräsentieren kann.

V DISKUSSION

1 DNA-Extraktionsmethode

Vier DNA Kits wurden auf ihre Eignung zum Einsatz in dieser Untersuchung getestet: Kit 1: High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science), Kit 2: QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), Kit 3: GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) und Kit 4: DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN). Alle vier sind nach Herstellerangaben zur Gewinnung tierischer DNA aus Gewebeproben bestimmt. Zur Extraktion pilzlicher oder bakterieller DNA empfehlen die Hersteller das Anzüchten von Kulturen vor dem Einsatz der Kits. Diese Vorgehensweise ließ sich in dieser Studie nicht umsetzen, weil Pilze in hitzebehandelten Fleischprodukten inaktiviert sind. Die 4 DNA-Extraktions-Kits wurden trotzdem zum Test für den Einsatz in dieser Studie ausgewählt, weil sie die Matrix biologischer Proben erschließen können auf Inhibitoren der Fleischmatrix abgestimmt sind. Um sie zur DNA-Extraktion aus Pilz-Sporen zu optimieren wurden bei der Extraktion für alle Kits zwei zusätzliche Zell-Lyse-Schritte zugefügt: 1. Die physikalische Behandlung mit Glass Beads zur mechanischen Spaltung der Zellwände der Pilz-Sporen; 2. Die enzymatische Behandlung mit dem Enzym Lyticase, um die Zellwände aufzuschließen und zu destabilisieren. Die in Folge dieser Behandlung instabilen Zellen wurden in Lysepuffer lysiert und gaben ihre DNA frei.

Bei der Auswahl des DNA-Extraktions-Kits wurde die Effizienz der Kits nur durch die Amplifizierung der gewonnenen DNA im Thermocycler und die Prüfung der PCR-Produkte im Agarosegel, also mit qualitativen bzw. semi-quantitativen Methoden, beurteilt, da die qPCR in dieser frühen Phase der Studie noch nicht zum Einsatz kam. Bei der Extraktion der DNA aus 20 Pilzarten (Reinkulturen, Keimzahl zwischen 10^5 und 10^6 Sporen/Probe) zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Kits. Die Auswahl des DNA-Extraktions-Kits basierte deshalb auf den Ergebnissen der Thermocycler-Amplifikation und der anschließenden SSCP-Analyse von Fleischproben.

In Fleisch und Fleischprodukten können mindestens 30 Hefe-Arten aus 10 Gattungen (Deak und Beuchat, 1996) und mindesten 61 Schimmelpilzarten aus 18 Gattungen (Weidenbörner, 1999) vorkommen. Auswahl-Kriterien für das

geeignete DNA-Extraktions-Kit waren daher die Fähigkeit, DNA aus einem breiten Spektrum Fleisch-relevanter Pilzarten extrahieren zu können, die Amplifizierbarkeit der DNA-Extrakte und das Lauf- und Trennungsverhalten der PCR-Produkte im PCR-SSCP-Verfahren. Daher war die quantitative Ausbeute an DNA nur von zweitrangiger Bedeutung.

Die Menge der extrahierten DNA aus den Fleischproben wurde mit dem Spektrophotometer (Nano-Drop[®] ND-1000) anhand der Menge der aufgereinigten Produkte der Thermocycler-PCR ermittelt. Im Gegensatz zu den anderen getesteten Kits beinhaltet nur Kit 1 einen Schritt zur Reduktion von PCR-Inhibitoren. Tatsächlich konnte dieses Kit mehr DNA extrahieren als die anderen, gefolgt von Kit 3 und Kit 4. Kit 2 war den anderen unterlegen. Kit 4 konnte zwar weniger DNA-Menge extrahieren als die Kits 1 und 3. Die aus der extrahierten DNA erhaltenen PCR-Produkte bildeten aber mehr DNA-Banden im SSCP-Gel. Dies weist darauf hin, dass mit Kit Nr. 4 DNA aus mehreren Pilzarten extrahiert wurde als mit den anderen Kits. Weil die Anzahl der getesteten Fleischproben pro Kit ($n = 8$; 2 naive und 6 mit Pilzen künstlich kontaminierte Fleischproben) relativ niedrig war, kann nicht verallgemeinert werden, dass Kit 4 zur Untersuchung von Pilz-DNA in allen Fällen den anderen überlegen wäre. Der Befund in dieser Untersuchung bedürfte zu seiner allgemeinen Gültigkeit der Bestätigung durch eine höhere Anzahl von Testproben.

Die Hersteller der Kits begrenzen das Gewicht von Fleischproben zur Extraktion tierischer DNA auf maximal 25 mg (Kit 2, 3 und 4) bzw. 50 mg (Kit 1). Zur Gewinnung der Pilz-DNA wurde Fleischgewicht (Hackfleisch) von 50, 100 und 250 mg in allen DNA-Extraktions-Kits getestet. Es zeigte sich folgende Tendenz: je höher das Fleischgewicht, desto weniger DNA konnte extrahiert und amplifiziert werden. Ähnliche Befunde berichten Ariefdjohan et al., (2010), die unabhängig von der DNA-Extraktionsmethode aus einer 10 mg Probe von humanen Faeces mehr Bakterien-DNA extrahieren konnten als aus Proben mit 25, 50, 100 und 200 mg. In der vorliegenden Studie führte ein höheres Gewicht der Fleischproben bei der Extraktion möglicherweise zur Verstopfung der Säule, weil das Fleisch nicht komplett verdaut war und/oder weil die Probe zu viel Fett enthielt. Möglicherweise spielten auch PCR-Inhibitoren eine Rolle, so dass extrahierte Pilz-DNA weniger gut amplifiziert werden konnte. So fanden Al-Soud und Rådström (1998) bei Untersuchungen mit 9 thermostabilen DNA-

Polymerasen von unterschiedlichen Herstellern, dass alle von ihnen in ihrer Aktivität durch eine hohe Konzentration von Fleischmatrix in den Proben beeinträchtigt wurden.

2 Primerauswahl

In den Proben lag nicht nur DNA von Pilzen vor, sondern auch DNA von Fleisch, Gewürzen und anderen Mikroorganismen wie Bakterien. Bakterien gehören zu den Prokaryoten mit einer anderen Zell- und DNA-Struktur. Die Zellen von Tieren, Pflanzen und Pilzen gehören zur Gruppe der Eukaryoten. Deshalb ist es möglich, dass die Primerpaare, die DNA von Pilzen amplifizieren, auch DNA von Pflanzen und tierischen Zellen amplifizieren (Hagn et al., 2003; White et al., 1990). Deshalb wurden die zur Prüfung ausgewählten Primerpaare auf folgende Eigenschaften getestet: dass sie (i) die DNA möglichst aller Pilz-Spezies amplifizieren, die häufig im Fleisch, aber auch in Gewürzen vorkommen, (ii) keine DNA vom Pflanzen bzw. von Gewürzen und keine DNA von Fleisch amplifizieren und (iii) dass ihre PCR-Produkte von verschiedenen Pilzen sich im SSCP-Gel gut oder ausreichend trennen, um die Identifizierung der Pilzarten zu ermöglichen.

Insgesamt 22 Primerpaare wurden getestet. Alle Primer wurden der Literatur entnommen, außer dem Reverse-Primer ITS5.8R (GAGATCCGTTGTTGAAAGTT). Dieser wurde vom Autor als für Pilz-DNA spezifischer Primer für diese Studie entwickelt.

Acht Primerpaare, sechs aus dem Abschnitt ITS (ITS1/ITS4, ITS1/ITS2, ITS5/ITS2, ITS3/ITS4, ITS5/ITS4 (White et al., 1990) und Fun18Sf/ITS4 (Pitkäranta et al., 2008) und zwei aus dem Abschnitt 18S rDNA (NS7/NS8, NS1/NS4, White et al., 1990) amplifizierten sowohl Pilz-DNA als auch pflanzliche DNA gut. Die Primerpaare NS1/NS4 und NS7/NS8 amplifizieren mit hoher Wahrscheinlichkeit tierische DNA gut, denn ihre PCR-Produkte aus pilzfleien Schweinefleisch-Proben (Negativ-Kontrolle) bildeten dicke Banden im Agarosegel. Auf die Sequenzierung dieser Banden wurde verzichtet, da das Primerpaar NS7/NS8 bekanntermassen die DNA einiger Pflanzen und Wirbeltiere amplifiziert (White et al., 1990). Nach White et al. (1990) ist der Forward-Primer ITS1 die Komplementär-Sequenz des Reverse-Primers NS8. Für den Einsatz in

dieser Untersuchung wäre der Forward-Primer ITS1 demnach nur in Kombination mit einem Pilz-DNA spezifischen Reverse-Primer geeignet.

Das universale Primerpaar ITS1/ITS4 (White et al., 1990) ist das wohl am häufigsten zur Amplifizierung von Pilz-DNA verwendete Primerpaar (Vilgalys lab, Duke University). Leider kann dieses Primerpaar nach den Erkenntnissen der vorliegenden Studie auch pflanzliche DNA gut amplifizieren. Es wurde in dieser Studie trotzdem als Standard-Primer mitverwendet, um die Labor-Methode zu optimieren, zu validieren (z. B. DNA-Extraktionsmethode und PCR-Protokoll) und um Vergleichswerte zu den Ergebnissen des selbst entwickelten Reverse-Primers ITS5.8R zu erheben.

Die für Pilz-DNA spezifischen Primerpaare NSI1/NLB3, NS1/NLB4 und NSI1/58A2R (Martin und Rygiel, 2005), die den DNA-Abschnitt ITS amplifizieren, und die Primerpaare aus dem Abschnitt 18S rDNA (0817/1536, Borneman und Hartin, 2000; P1/P2, Einsele, et al., 1997; FF2/FR1, Zhou et al., 2000 und EF4/Fung5, Smit et al., 1999) amplifizierten zwar die DNA der getesteten Gewürze nicht oder nur leicht, sie konnten in dieser Studie aber auch die DNA einiger getesteten Pilze, die häufig oder gelegentlich in Fleisch vorkommen, nicht oder nur eingeschränkt amplifizieren, z. B. *Cryptococcus curvatus*, *Trichosporon gracile*, *Y. lipolytica* und Pilze aus der Unterabteilung Mucoromycotina.

Der bekannte Pilz-spezifische Forward-Primer ITS1F, der den DNA-Abschnitt ITS amplifiziert, wurde von Gardes und Bruns (1993) entwickelt und wurde gelegentlich zur Untersuchung der Pilz-Zusammensetzung in Böden (Anderson et al., 2003; Manter und Vivanco, 2007; Okubo und Sugiyama, 2009; Robinson et al., 2009) oder zur Identifizierung arbuskulärer Mykorrhizapilze (Redecker, 2000) verwendet. Dieser Primer amplifiziert nach den Erkenntnissen dieser Studie tatsächlich pflanzliche DNA nicht (zusammen mit dem Reverse-Primer ITS4) oder nur gering (mit dem Reverse-Primer ITS2). Leider konnte er in dieser Studie auch die DNA von getesteten Pilzen der Unterabteilung Mucoromycotina (*Absidia glauca*, *Mucor spinosus* und *Rhizopus oryzae*) nur eingeschränkt amplifizieren.

Der vom Autor entwickelte Reverse-Primer ITS5.8R führt zu ähnlichen Ergebnissen wie Primer ITS1F. Vorteil des Primers ITS5.8R ist, dass er in

Kombination mit dem Forward-Primer ITS1 die DNA aller drei getesteten Pilze aus der Unterabteilung Mucoromycotina gut amplifizieren kann.

Das Primerpaar U1/U2 aus dem Abschnitt 28S rDNA wurde von Sandhu et al., (1995) entwickelt, um Pilz-Infektionen bei Patienten zu diagnostizieren. Dieses Primerpaar führte zu ähnlich guten Ergebnissen bei der PCR-Amplifikation wie das Primerpaar ITS1/ITS5.8R, abgesehen davon, dass es wahrscheinlich die DNA einiger Pflanzen leicht amplifiziert, denn die PCR-Produkte einiger Gewürzproben bildeten schwache DNA-Banden im Agarosegel.

Die Trennung der DNA in SSCP-Gel entschied letztendlich die Auswahl der Primerpaare. Die Trennung der PCR-Produkte des Primerpaars U1/U2 aus dem Abschnitt 28S rDNA war schlecht und erlaubte es nicht, ohne weitere Schritte – wie z. B. die Verdauung der PCR-Produkte mit Restriktionsenzymen oder Restriktionsendonukleasen (Kumar und Shukla, 2006) – unterschiedliche Pilzarten in den Fleischprodukten zu erkennen und zu identifizieren. Die PCR-Produkte von Pilz-DNA aus dem rDNA-Abschnitt ITS konnten sich im SSCP-Gel gut trennen (Primerpaare: ITS1/ITS4, ITS1F/ITS2, ITS1/ITS5.8R und ITS1F/ITS5.8R). Mit dem Primerpaar ITS1/ITS5.8R wurden insgesamt 33 Pilz-Spezies getestet. Das Primerpaar hat – wie auch einige der anderen untersuchten Primerpaare, z.B. ITS1/ITS4 – die Schwäche, die DNA von Pilzarten der Gattungen *Aspergillus* spp. und *Penicillium* spp. nicht gut zu trennen. Die PCR-Produkte erreichen bei einigen Pilz-Spezies/-Gattungen im SSCP-Gel gleiche Laufweiten, z. B. bei *Alt. alternata*, *Cla. herbarum*, *M. spinosus* und *Rhodotorula* spp. oder bei *E. rubrum*, *E. amstelodami*, *A. glaucus* und *C. albicans*. Das erschwert die Identifizierung und Unterscheidung der Arten, wenn Proben von solchen Pilzen kontaminiert sind.

3 Optimierung der qPCR

In der Real-Time PCR (Quantitative PCR: qPCR) mit SYBR-Green-I erfolgt der Nachweis der DNA über den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green-I, der sich in die doppelsträngige DNA einlagert (interkaliert) und dadurch fluoreszent wird. Auch die Gegenwart anderer unspezifischer doppelsträngiger PCR-Produkte (z. B. Primer-Dimer) führt zum Ansteigen der Fluoreszenz. Die Methode ist von hoher Sensitivität, von Nachteil ist ihre geringe Spezifität. Deshalb ist es üblich, im Anschluss an die PCR die Spezifität der Amplifikation mit der Schmelzkurven-

Analyse zu überprüfen. Gleiche Primerpaare führen normalerweise zu PCR-Produkten von gleicher Basenabfolge und Größe und somit gleicher Schmelztemperatur. Der Einsatz der Schmelzkurven-Analyse zur Untersuchung der Proben war in dieser Studie nur eingeschränkt möglich, da die Primer aus dem rDNA-Abschnitt ITS bei verschiedenen Pilzarten zu PCR-Produkten ganz unterschiedlicher Größe und Basenabfolge führten, entsprechend unterschiedlich waren ihre Schmelztemperatur-Maxima (z. B. von Primerpaar ITS1/ITS4: *Penicillium* spp. und *Aspergillus* spp.: 94 °C, *E. rubrum* 92 °C, *Cla. herbarum*: 90 °C; *Y. lipolytica*: 89 °C und Pilze in der Unterabteilung Mucoromycotina: 84 °C und von Primerpaar ITS1/ITS5.8R: *P. chrysogenum*: 94 °C und *Y. lipolytica*: 76 °C). Lagen in einer Probe mehrere Pilzarten vor, so gab es eine Überlagerung der Schmelztemperatur-Kurven.

Der PCR-Ansatz und die PCR-Konditionen für die qPCR wurden deshalb so optimiert, dass nicht nur die Sensitivität des Test erhöht wurde, sondern auch die Spezifität. Dazu wurde die Annealing-Temperatur auf 62 °C erhöht, um die Spezifität der PCR-Amplifikation zu erhöhen (Weighardt et al., 1993). Dann wurden die anderen Komponenten des PCR-Ansatzes (Volumen und Konzentration von MgCl₂, Primer und DNA) und die PCR-Bedingungen (Elongationszeit) optimiert. Zur Optimierung des PCR-Ansatzes und der PCR-Bedingungen wurde nur die Standard-Spezies *P. chrysogenum* aus Reinkultur eingesetzt. Für andere Pilzarten könnten andere Bedingungen als optimal gelten, so eine längere Elongationszeit für Pilze mit großen DNA-Fragmenten (z. B. *S. cerevisiae*) oder aber eine kürzere für Pilze mit kleineren DNA-Fragmenten (z. B. *Pichia membranifaciens* und *Yarrowia lipolytica*). Beide Empfehlungen entstammen den Herstellerangaben zum „FastStart DNA Master SYBR-Green-I“ für LightCycler® (Roche). Bei einer Annealing-Temperatur von 62 °C und den für *P. chrysogenum* optimalen PCR-Bedingungen wurde zwar eine hohe Spezifität bei der PCR-Amplifikation erreicht, doch konnte bei diesen Konditionen die DNA einiger in Fleischprodukten vorkommender Pilzarten, z. B. *A. terreus* und *E. amstelodami* in dieser Studie nicht oder nicht gut amplifiziert werden (siehe Diskussions-Abschnitt 5). Dies könnte zur Unterschätzung der Gesamt-Pilz-DNA in den Fleischprodukt-Proben geführt haben. Das Ziel dieser Untersuchung, eine komplexe pilzliche Mischflora möglichst vollständig zu amplifizieren und zu

erfassen, stand im Konflikt mit dem Ziel, für jede Pilzart optimale PCR-Bedingungen zu gewährleisten.

4 Standard-Spezies für die qPCR

Zwei Pilze, die Schimmelpilzart *P. chrysogenum* und die Hefeart *Y. lipolytica* wurden als Standard-Spezies für die qPCR eingesetzt, weil beide nach der Literatur häufig in Fleisch und Fleischprodukten vorkommen (Deak und Beuchat, 1996; Weidenböcker, 1999). *P. chrysogenum* (DSM 844) stammte ursprünglich von der DSMZ und befand sich bereits in der Stammsammlung des Lehrstuhls für Tierhygiene. Die Hefe *Y. lipolytica* wurde aus 2 Fleischproben kultiviert und per Sequenzierung identifiziert. Die Anzahl der Sporen/Probe wurde mit der KbE-Methode bestimmt.

Da die Fleischmatrix die DNA-Extraktion und die PCR-Amplifikation beeinflusst, wurden die Standardproben mit bestrahltem Fleisch (sogenannter „Matrix-matched-Standard“) zur Quantifikation der Pilz-DNA mittels qPCR eingesetzt, um unter ähnlichen Matrix-Konditionen wie in den Feldproben zu quantifizieren. Pro Probe wurde eine Verdünnungsreihe von 5 bis 5×10^5 Sporen/50 mg Fleisch (entspricht 10^2 - 10^7 Sporen/g) angesetzt, beide Pilzarten wurden mit vier Primerpaaren (ITS1/ITS4, ITS1F/ITS2, ITS1/ITS5.8R und ITS1F/ITS5.8R) getestet. Auf Grund der Ergebnisse wurde *Y. lipolytica* zur Standard-Spezies für die qPCR ausgewählt, weil sie bei gleicher Verdünnung den Crossing Point um 3,5 bis 4,0 PCR-Zyklen schneller als *P. chrysogenum* erreichte und deshalb bis zur Konzentration von 10^2 Sporen/g Fleisch nachgewiesen werden konnte. *P. chrysogenum* war erst ab 10^3 Sporen/g Fleisch nachweisbar. Die Steigung (Slope) von *P. chrysogenum* ist -3,38; dies entspricht einer PCR-Effizienz von 97 %, errechnet aus der Verdünnungsreihe von 10^3 - 10^7 Sporen/g Fleisch. Die PCR-Effizienz der Probe mit Standard-Spezies *Y. lipolytica* ist 95 % (Steigung -3,46), dies ist zwar geringfügig niedriger, wurde aber aus 10^2 - 10^7 Sporen/g Fleisch berechnet und gilt somit für einen größeren Untersuchungsbereich.

Nach Eisgruber und Bülte (2006, Rechtsvorschriften, Referenzverfahren und Empfehlungen in der EU und der Schweiz) gibt es für die Belastung mit Schimmelpilzen keinen klar bestimmten Grenzwert, die Toleranzgrenze wird lediglich als „von bloßem Auge nicht erkennbar“ beschrieben. Für Hefen gibt es produktspezifische und klare Grenzwerte, sie liegen zwischen 10^3 und 10^6 KbE/g

(Eisgruber und Bülte, 2006). Auch dies sprach für die Verwendung der Hefe *Y. lipolytica* als Standard.

Die Hefe *Y. lipolytica* wurde zwar als Standard-Spezies ausgewählt, die quantitativen Ergebnisse der qPCR können aber nicht zwischen Hefen und Schimmelpilzen unterscheiden, sondern geben ggf. die Mischkontamination an. Schimmelpilze wie *P. chrysogenum*, die anhand der Standard-Spezies *Y. lipolytica* quantifiziert werden, werden um den Faktor 10 unterschätzt. *Y. lipolytica* kann keinesfalls als der einzig ideale oder universal-repräsentative Vertreter für alle wichtigen Pilze gelten, die im Fleisch vorkommen (Deak und Beuchat, 1996; Weidenbömer, 1999). Pilze haben eigene und individuelle Eigenschaften, ihre DNA lässt sich unterschiedlich effektiv extrahieren und per PCR amplifizieren (Karakousis et al., 2006). Die Identifizierung einer Pilz-Spezies als ideal-typischer Vertreter aller kontaminierenden Pilze in Fleischprodukten bleibt deshalb eine Herausforderung.

5 Optimierung der Annealing-Temperatur

Eine hohe Annealing-Temperatur führt zu höherer Spezifität (Weighardt et al., 1993). Wenn das zu entsprechenden Einbußen an Sensitivität führte, musste befürchtet werden, manche Pilzarten in den Fleischproben nicht nachweisen zu können. Aus diesem Grund wurde die Annealing-Temperatur im Thermocycler von 62 °C auf 56 °C herabgesetzt, um eine höhere Sensitivität zu gewährleisten und mehr Menge an DNA für den SSCP Durchlauf zu gewinnen.

Zur Prüfung der Spezifität wurden zwei DNA-Banden der PCR-Produkte des Primerpaars ITS1/ITS4 im SSCP-Gel, die sich nur bei der Annealing-Temperatur von 56 °C, nicht aber bei 62 °C bildeten, per Sequenzierung identifiziert. Die beiden Banden waren jedoch nicht etwa unspezifisch, sondern DNA von *Aspergillus terreus* und *Eurotium amstelodami*. Beide Pilzarten wurden zufällig auch aus Reinkultur untersucht. Auch bei der Annealing-Temperatur von 62 °C wurde ihre DNA aus Reinkultur sehr gut amplifiziert. Es ist möglich, dass in den Fleischproben mehr PCR-Inhibitoren vorhanden sind, die die PCR-Amplifikation beeinträchtigen (Al-Soud und Rådström, 1998). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die niedrige Annealing-Temperatur von 56 °C diese Beeinträchtigungen vermindern kann.

Das Primerpaar ITS1/ITS4 wird nach der Literatur bei Annealing-Temperaturen von 50 °C bis 62 °C (im Durchschnitt 55 °C) eingesetzt (Referenz: siehe **Tabelle 11**). Für das Primerpaar ITS1/ITS5.8R war die gewählte Annealing-Temperatur von 56 °C im Thermocycler und 62 °C im Lightcycler grenzwertig hoch, die Schmelztemperatur des Primers ITS5.8R liegt bei nur 54 °C. Die Annealing-Temperatur eines Primers sollte eigentlich unter seiner Schmelztemperatur liegen (nach Herstellerangaben für den Roche „FastStart DNA Master SYBR-Green-I“ für LightCycler®). Dennoch wurde eine höhere Annealing-Temperatur (56 °C bzw. 62 °C) ausgewählt, um die Spezifität der Amplifikation zu erhöhen. Das Abweichen von der Herstellerempfehlung, d. h. die Wahl einer Annealing-Temperatur nahe bei oder sogar über der Schmelztemperatur, hat auch bei anderen Autoren je nach den Zielen und Umständen der Untersuchungen zu guten Resultaten geführt. Zum Beispiel liegt die Schmelztemperatur für den Forward-Primer ITS1 bei 62 °C und für den Reverse-Primer ITS4 bei 56 °C. Untersucher, die mit diesem Primerpaar gearbeitet haben, setzten die Annealing-Temperatur auf z. B. 62 °C (Wu et al., 2002), 58-60 °C (Luo und Mitchell, 2002; Petersen et al., 2001) oder auf 55-56 °C (Hendolin et al., 2000; Korabecna, 2007; Kumar und Shukla, 2005; Leinberger et al., 2005; López et al., 2006, Mirhendi et al., 2006). White et al., 1990, die das Primerpaar entwickelt haben, empfehlen eine Annealing-Temperatur zwischen 50 und 60 °C.

6 Validierung der Methode

6.1 Fleisch, Fleischsuspension und KbE-Anzahl

Ein alternativer Weg zur Gewinnung der Pilz-DNA aus Fleisch ist die Extraktion aus Fleischsuspension, wie sie zur KbE-Bestimmung verwendet wurde, statt aus Fleischstücken. Im Vergleich zum 50 mg Fleisch-Stück hat die Fleischsuspensionsprobe den Vorteil, dass hierfür ein größeres Probenaliquot homogenisiert werden kann. Zur DNA-Extraktion wurden Proben von 0,5 und 1,0 ml der Suspension (äquivalent zu Fleischstücken mit einem Gewicht von 50 bzw. 100 mg) untersucht.

Die Haupt-DNA-Banden der Proben im SSCP-Gel waren identisch. Die CP-Werte der Proben wurden anhand der Standard-Spezies *Y. lipolytica* auf \log_{10} KbE pro g umgerechnet. Die Ergebnisse zeigten folgende Tendenz: das KbE-Äquivalent von 0,5 ml Fleischsuspension (entspricht 50 mg Fleisch) lag über dem von 50 mg

Fleisch. Dies kann zwei Ursachen haben: (i) es gab tatsächlich mehr nachweisbare DNA in 0,5 ml Fleischsuspension als in 50 mg Fleisch, (ii) die PCR-Amplifikation von Fleischsuspension war effizienter, da im nicht suspendierten Fleisch die Konzentration von Fleischmatrix-Material und somit auch die Konzentration von PCR-Inhibitoren höher als in Fleischsuspension ist (Al-Soud und Rådström, 1998). Dennoch ist der log-Stufen-Unterschied gering und die Korrelation der KbE-Äquivalent-Werte zwischen beiden Proben-zubereitungen, die mit dem Primerpaar ITS1/ITS5.8R amplifiziert wurden, war nach Pearson auf dem Niveau 0,01 signifikant.

Die Korrelation zwischen den „kulturell ermittelten-“, und den „errechneten“ \log_{10} KbE/g-Werten der 50 mg Fleischproben, die von den Primerpaaren ITS1/ITS4 und ITS1/ITS5.8R amplifiziert wurden, wurde ebenfalls nach Pearson geprüft. Trotz der geringen Anzahl der Proben ($n = 8$, frisches Fleischproben 1-8) war die Korrelation zwischen beiden Werten auch auf dem Niveau von 0,01 signifikant.

6.2 Frisches vs. erhitztes Fleisch, naive vs. erhitzte Sporen,

Der Vergleich der PCR-Produkte von naiven und erhitzten Sporen sowie von frischem und erhitztem Fleisch sollte die Frage beantworten, ob Hitze-Behandlung die DNA der Pilz-Sporen zerstört. Zur Hitze-Behandlung wurden die Fleischproben (jeweils 50 mg) im Eppendorf-Gefäß bei 90 °C für 1 Stunde im Wasserbad erhitzt. Diese Temperatur wurde als ausreichend angenommen, weil nach Krämer (1997) und Weber (2003) die Kerntemperatur pasteurisierter Wurstwaren (z. B. Brühwürste und Kochwurst) während der Hitzebehandlung grundsätzlich nur 70-75 °C erreicht.

Die Haupt-DNA-Banden von frischem und erhitztem Fleisch im PCR-SSCP waren identisch. Schwache Bande waren gelegentlich in frischem, gelegentlich aber auch in erhitztem Fleisch stärker ausgeprägt.

Der CP-Wert-Vergleich zwischen naiven und erhitzten Sporen, mit denen bestrahltes Fleisch künstlich kontaminiert wurde, ergab, dass bei *P. chrysogenum* DNA aus den Proben mit erhitzten Sporen besser extrahiert und/oder amplifiziert werden konnte. Bei *Y. lipolytica* führten die Primerpaare zu unterschiedlichen Ergebnissen. Mit dem Primerpaar ITS1/ITS5.8R waren die Werte von Proben mit naiven und erhitzten Sporen fast gleich.

Für die Proben mit nicht bestrahltem, natürlich kontaminiertem Fleisch waren die Ergebnisse uneinheitlich: Bei der Untersuchung von Fleisch erreichten die CP-Wert-Abstände zwischen frischen und erhitzten Proben maximal 2 PCR-Zyklen (entspricht $0,6 \log_{10} \text{KbE}$). Demnach konnte das Erhitzen auf 90°C über eine Stunde im Wasserbad den Nachweis der kontaminierenden Pilze im Fleisch nicht wesentlich beeinträchtigen, kontaminierende Pilze können also auch in erhitztem Fleisch nachgewiesen werden.

Ob die DNA-Konzentration oder die Anzahl der DNA-Banden im SSCP-Gel für die erhitzten Proben höher oder niedriger ausfallen, hängt von der Zusammensetzung der kontaminierenden Pilzarten und ihrem Entwicklungszustand ab. Die DNA von Hefen lässt sich einfacher als die von Schimmelpilzen extrahieren (Karakousis et al., 2006). In der Wachstumsphase (vegetative Phase) sind die Mikroorganismen hitzeempfindlich (Wijnands et al., 2009). Deshalb kann die Hitzebehandlung die DNA-Extraktion sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Dies hängt wesentlich auch von der Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung (Simmon et al., 2004) und von der Lebensmittel-Matrix (Hanna et al., 2005; Wijnands et al., 2009) ab. Durch die Hitzebehandlung können PCR-Inhibitoren deaktiviert werden, das kann zu besserer PCR-Amplifikation führen. Simmon et al. (2004) machten die Erfahrung, dass das Autoklavieren von Proben über eine Minute die Extraktion bakterieller DNA nicht beeinträchtigte und die Amplifikation in der PCR verbesserte. Als Ursache vermuten die Autoren, dass die Hitzebehandlung zelluläre Proteine, die normalerweise die PCR beeinträchtigen, denaturiert habe. Hingegen konnte nur wenig DNA nachgewiesen werden, wenn lange autoklaviert wurde, da die DNA durch die längere Einwirkung von Hitze und Druck zum Teil zerstört wurde (Simmon et al., 2004).

6.3 Frisches vs. verdorbenes Fleisch

Vier Fleischproben hat der Untersucher über 3 Tage verderben lassen. Dann wurde die DNA extrahiert. Die Ergebnisse im SSCP-Gel und aus der qPCR wurden mit denen von frischen Fleischproben verglichen.

Der Pilzgehalt der Proben mit verdorbenem Fleisch, quantifiziert mittels qPCR, war nicht deutlich höher als der von frischem Fleisch. Im Vergleich zur Standard-Spezies *Y. lipolytica* gab es in 3 von 4 verdorbenen Proben weniger DNA, als es dem Gehalt von 10^5 Sporen/g Fleisch entspricht. Der Befund steht im

Widerspruch zum optischen Eindruck der Proben. Dies ist erklärlich, da Pilze weniger zum Verderben von Fleisch beitragen als Bakterien. Für Weidenbömer (1999) sind Bakterien von weit größerer Bedeutung für die Kontaminierung von Hackfleisch, Schimmelpilze fand er nur sehr selten und Hefen konnte er nur in einer Keimzahl bis $6,2 \times 10^4$ KbE/g nachweisen. Deak und Beuchat (1996) hingegen haben in Hackfleisch, Geflügelfleisch und Rohwürsten eine Kontaminierung von Hefen mit bis zu 10^6 KbE/g gefunden. Pilze wachsen langsamer als Bakterien. Bei der Anlage von Pilzkulturen in dieser Studie bedurfte es mindestens einer Inkubationszeit von 2-3 Tagen, bis die Kolonien sichtbar wurden; viele Bakterienarten bilden in weniger als 24 Stunden deutlich sichtbare Kolonien. In einer Studie von Deak und Beuchat (1996) brauchten Hefen mit niedriger Gesamtkeimzahl in verschiedenen Fleischprodukten 7 Tage, um sich auf eine Keimzahl von 10^5 bis 10^6 KbE/g zu vermehren, bis zur Keimzahl von 10^6 bis 10^7 KbE/g dauerte es 14 Tage. Solange die Wachstumsbedingungen für Bakterien noch optimal sind, wie in Hackfleisch, können sich Pilze nur schwer gegen die Konkurrenz der Bakterien durchsetzen (Deak und Beuchat, 1996; Gill und Lowry, 1982). Deshalb hat sich die Anzahl der Pilz-KbEs in den drei Tagen, in denen der Untersucher die Fleischproben verderben ließ, nur leicht erhöht.

Die PCR-Produkte von verdorbenem Fleisch bildeten andere DNA-Bandenprofile sowohl im Agarosegel als auch im SSCP-Gel. So waren z. B. im Agarosegel die Banden aus ähnlich großen DNA Fragmenten, wie sie von der Standard-Spezies *Y. lipolytica* gebildet werden (~350-370 bp bei Primerpaar ITS1/ITS4 und ~110 bp bei Primerpaar ITS1/ITS5.8R) bei verdorbenem Fleisch stärker als in frischem Fleisch. Die entsprechende Bande hatte stets die kleinste Fragmentgröße aller vorliegenden Pilze. Eine Sequenzanalyse von Pilzen aus der Genbank-Datenbank (NCBI) ergab, dass *Y. lipolytica* unter den Produkten des Primerpaars ITS1/ITS4 die kleinste Fragmentgröße hat. Eine Studie von Bockelmann et al. (2008) zeigte ebenfalls, dass unter 90 Pilzstämmen, die sich in Milchprodukten finden, bei der Amplifizierung mit Primerpaar ITS1/ITS4 die DNA-Banden mit der kleinsten Fragmentgröße (370 bp) von *Y. lipolytica* (Synonym: *Candida lipolytica*) stammen. Deak und Beuchat (1996) haben verschiedene Hefearten aus verdorbenem Rinderhackfleisch kultiviert. Die dominierenden Spezies waren *Candida zeylanoides*, *Pichia fermentans* und *Y. lipolytica*. Manche Pilze scheinen sich also in verdorbenem Fleisch besser

vermehrten zu können. Die bedeutendsten Besiedler von verdorbenem Fleisch zu kennen eröffnet die Möglichkeit, solche Spezies als Indikatoren zur Beurteilung des hygienischen Zustands von Fleisch zu nutzen.

7 Feldproben

Insgesamt 42 Feldproben wurden getestet, 15 davon waren mit normalen Erhitzungsverfahren (z. B. Pasteurisierung) hergestellte Fleischprodukte mit nur kurzer Haltbarkeit und einer empfohlenen Aufbewahrungstemperatur von unter +8 °C. Weitere Proben waren mit Sterilisierungsverfahren hergestellte Fleischprodukte (z. B. Dosenwurst), darunter 12 Proben aus Supermärkten und 12 Proben aus Metzgereien (Hausmacher-Konserven). Die Haltbarkeit dieser Produkte bei Zimmer-Temperatur war mit 2 bis 4 Jahren angegeben. Ferner wurden untersucht: eine Probe von getrocknetem Speck (in Speck-Knödel) mit langer Haltbarkeit bei Zimmertemperatur und zwei Proben von verschiedenen traditionell hergestellten Sojasaucen, die als Proben mit hoher Nachweiswahrscheinlichkeit gelten. Bei der traditionellen Herstellung von Sojasauce werden Sojabohnen von den Schimmelpilzen *Aspergillus oryzae* oder *Aspergillus soyae*, Hefen und auch Bakterien fermentiert (Bleisch, 2006). Deshalb ist es wahrscheinlich, Pilz-DNA in traditionell hergestellter Sojasauce nachweisen zu können.

7.1 Pilz-DNA-Quantifizierung mittels qPCR

Die Ergebnisse der qPCR des Primerpaars ITS1/ITS5.8R weisen für alle untersuchten Fleischprodukte eine Gesamtkonzentration von weniger als 10^5 KbE-Äquivalenten/g Fleisch aus, quantifiziert anhand der Standard-Spezies *Y. lipolytica*. Diese Gesamtkonzentration errechnete sich aber bis zu 10^6 KbE-Äquivalenten/g Fleisch, wenn sie anhand der Standard-Spezies *P. chrysogenum* quantifiziert wurde. Die pasteurisierten Fleischproduktproben zeigten höhere Konzentrationen als frische Fleischproben, es gab also mehr nachweisbare Pilz-DNA in den pasteurisierten Fleischprodukten. Dies lässt sich entweder auf das belastete Fleisch oder, wenn die beigemengten Gewürze ebenfalls mit Pilzen kontaminiert waren, auf die Gewürze zurückführen (siehe Diskussions-Abschnitt 7.2). Die Pilz-DNA-Konzentrationen der pasteurisierten Produkte lagen im Bereich von 10^3 bis 10^5 Sporen/g Fleisch.

Die sterilisierten Fleischprodukte (Dosenwurst) aus den Supermärkten enthielten nur sehr geringe Konzentrationen an Pilz-DNA; die nachweisbare DNA in allen

getesteten Proben lag unter dem Äquivalent von 10^3 Sporen/g Probe.

In der Dosenwurst aus den verschiedenen Metzgereien (Hausmacher Konserven) war mehr nachweisbare Pilz-DNA als in der Dosenwurst aus den Supermärkten und zwar bis zum Äquivalent von 10^4 Sporen/g Fleisch im Vergleich zur Standard-Spezies *Y. lipolytica*, bzw. 10^5 Sporen/g im Vergleich zur Standard-Spezies *P. chrysogenum*. Das war immer noch weniger als in den pasteurisierten Produkten. Dass es so wenig nachweisbare Pilz-DNA in Dosenwurst gibt, liegt möglicherweise am Herstellungsverfahren. Die Dosenwurst wurde mit Sterilisierungsverfahren hergestellt, die selbst alle hitzetoleranten Mikroorganismen abtöten. Nach den halboffiziellen Herstellungsempfehlungen wird Dosenwurst mit einer Temperatur von 100 bis 121 °C bei einem Druck von 1-2 bar behandelt (Salzer, 2011; FAO Corporate Document Repository, 2011). Das Verfahren gewährleistet die Haltbarkeit der Produkte bei Zimmertemperatur für 3-4 Jahre. Küng und Thalmann (2004) zufolge gehört zur Standard-Prozedur der Sterilisierung von Lebensmitteln das Erhitzen auf 121°C über 15-20 min bei einem Druck von 2 bar; dabei werden selbst *Bacillus stearothermophilus*-Sporen, die zu den hitzeresistentesten Keimen gehören, abgetötet, freie DNA wird unter diesen Bedingungen ebenfalls zerstört. Auch Untersuchungen von Simmon et al. (2004) zeigen, dass durch die Standard-Autoklavierung bei 121 °C über 15-20 min die Bakterien-DNA zerstört wird: je länger autoklaviert wird, desto weniger Bakterien-DNA bleibt nachweisbar. Bei der untersuchten Dosenwurst hingegen wurden alle Pilz-Sporen zwar abgetötet, die DNA wurde aber nicht vollständig zerstört. Entweder war das Sterilisierungsverfahren nicht intensiv genug, oder die biologische Matrix konnte einen Teil der Sporen oder der DNA vor der kompletten Zerstörung durch die Hitze schützen (Wijnands et al., 2009). Auch das Volumen der Konserven könnte die Effizienz des Sterilisierungsverfahrens beeinflusst haben (FAO Corporate Document Repository, 2011).

Mit den verfügbaren Methoden kann im Fall einer Konzentration $< 10^5$ KBE-Äquivalent/g nicht ausgeschlossen werden, dass verdorbenes Fleisch als Rohmaterial zur Herstellung von Dosenwurst verwendet wurde. Die Interpretation der Untersuchungsbefunde wird durch zu viele unbekannte Faktoren erschwert: die Sterilisierungsverfahren (Temperatur, Druck und Dauer) der jeweiligen Hersteller und Produkte und die Frage, welcher Prozentsatz der DNA und/oder Sporen bei welchen Sterilisierungsbedingungen zerstört werden. Die Entwicklung

einer für alle sterilisierten Fleischprodukte geeigneten Methode oder eines Untersuchungsverfahrens zum Nachweis und zur Quantifizierung der Pilz-DNA ist deshalb eine weitere Herausforderung. Im Fall eines qPCR-Nachweises von $>10^5$ KbE-Äquivalent/g ist jedoch von der Verwendung hoch mit Pilzen kontaminierter Rohware auszugehen, bedenkt man, dass die relevanten Richtwerte für Fleischprodukte mit wenigen Ausnahmen $\leq 10^5$ KbE/g liegen (vgl. **Tabelle 5**).

7.2 PCR-SSCP und Sequenzierung

Die SSCP-Gele von Feldproben wurden nach Silbernitratfärbung gescannt und mittels der Software GelCompar[®]-II normalisiert und ausgewertet. Alle DNA-Banden unterschiedlicher Laufweiten – sowohl solche mit hoher, als auch solche mit niedriger Prävalenz – wurden für die Sequenzierung ausgewählt.

Die Sequenzierung diente der Identifizierung der gefundenen Arten, aber auch dem Nachweis, dass die Primerpaare ITS1/ITS4 und ITS1/ITS5.8R und die angewandten methodischen Verfahren und Verfahrensbedingungen zur Amplifikation identifizierbarer DNA-Fragmente geeignet sind.

Auch wenn das Primerpaar ITS1/ITS4 pflanzliche DNA amplifizierte, war es fraglich, ob diese Eigenschaft aufgrund des geringen Gewürzgehalts in Fleischprodukten die Ergebnisse verfälschen kann. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Proben von drei gewürzten Fleischprodukten extrahiert und mit dem Primerpaar amplifiziert. Drei klare Banden unterschiedlicher Laufweite wurden sequenziert. Eine der Banden stammte von Koriander (*Coriandrum sativum*). Der Befund disqualifiziert das Primerpaar ITS1/ITS4 letztendlich als nicht spezifisch für den Nachweis von Pilz-DNA in gewürzten Fleischprodukten.

Für die PCR-Produkte des Primerpaars ITS1/ITS5.8R wurden 32 DNA-Banden nach der Auswertung mit GelCompar[®]-II per Sequenzierung identifiziert (30 Banden von 15 Fleischproben und 2 Banden von Sojasauce). Neun Banden stammten von Pilzen, die als Endophyten (*Guignardia mangiferae*, Romão et al., 2011) und Pflanzenpathogene bekannt sind. So ist z. B. *Pleospora herbarum* ein Pflanzenpathogen für Zwiebeln (Köhl et al., 2008), *Botrytis aclada* für Knoblauch und Zwiebeln (Chilvers und Du Toit, 2006; Yohalem et al. 2004), *Neofusicoccum parvum* für Muskatnuss (Jayakumar et al., 2011) und *Itersonilia perplexans* für Dillkraut, Pastinake, Petersilie und Kümmel (Aldaoud et al., 2009; Rodeva et al., 2009). *Epicoccum nigrum* wurde gelegentlich in der Außen- und Innenraum-Luft

nachgewiesen (Bundesgesundheitsblatt, 2007) ist aber auch als Saprophyt für Pflanzen bekannt (Fávaro et al., 2011; Samson et al., 2000). Drei identifizierte Pilze waren xerophile Schimmelpilze (*A. penicillioides*, *Xeromyces bisporus*, *Wallemia sebi*), die in der Luft und in Produkten mit sehr geringem verfügbarem Wassergehalt (a_w) wie Gewürzen vorkommen (Leong et al. 2011; Gabrio, 2008; Samson et al., 2000). Die anderen identifizierten Pilze kommen nach der Literatur häufig oder gelegentlich in Fleisch oder in Lebensmitteln vor: *Aureobasidium pullulans*, *E. amstelodami*, *Alt. alternata*, *Candida* spp., *C. zeylanoides*, *C. tropicalis*, *C. rugosa*, *Issatchenkia orientalis* (*C. krusei*), *Pichia membranifaciens* und *Pichia caribbica* (*C. fermentati*). Letztere wurde im Verlauf der Herstellung fermentierter Produkte wie Sojasauce, Miso (Suezawa und Suzuki, 2007) und alkoholischer Getränke (Nova et al., 2009) relativ häufig isoliert, stammte in der vorliegenden Untersuchung aber aus Dosenwurst. Eine DNA-Bande (Probe: Dosenwurst) stammte von *Phoma acetosellae*. Es gibt nur wenig Informationen über diese Spezies, ihre Gattung wurde jedoch aus Boden, Pflanzenmaterial, Raum-Luft (Samson et al., 2000), Umfeld von Schlachthöfen (Ismail et al., 1995) und fleischverarbeitenden Betrieben (Sørensen et al., 2005) häufig isoliert

Drei der sequenzierten DNA-Banden stammten von der Hefe *S. cerevisiae* und eine von der Hefe *Pichia jadinii* (*C. utilis*). *S. cerevisiae* wurde nach der Literatur nur selten aus Fleisch und Fleischprodukten kultiviert, ihr Vorkommen dort geht wahrscheinlich auf die Zutaten der Produkte zurück, wie z. B. Hefeextrakt und Backerzeugnisse, eventuell auch Milcheiweiß und Molkenerzeugnisse. Die Herstellung von Hefeextrakt erfolgt durch Anzucht und Autolyse von Hefe, meist *S. cerevisiae* oder *Pichia jadinii* (*C. utilis*); Hefeextrakt wird als Würzstoff oder Lebensmittel-Additiv verwendet (Pollmer, 2011). Nach der Auswertung mit GelCompar[®]-II gab es in 26 der 40 untersuchten Proben Banden mit der gleichen Laufweite wie *S. cerevisiae*. In 11 Proben waren diese Banden sehr ausgeprägt: Probe 13 (Wiener Gewürschtl), Probe 21 (Leberkäs), Probe 23 (Wiener Würstchen), Probe 24 (Speck-Knödel), Probe 28 (Eisbeinflisch in Aspik), Probe 31 (Lyoner Bio), Probe 32 (BIO Lyoner), Probe 33 (Jagdwurst, Eifel), Probe 34 (Jagdwurst, Müller) Probe 38 (Original Nürnberger Rostbratwürste) und Probe 39 (Rotwurst). Proben 21 und 28 wurden nach Herstellerangaben unter Verwendung von Hefeextrakt hergestellt. In den Herstellerangaben der anderen Proben finden sich keine Hinweise. Doch darf bei den Speck-Knödeln (Probe 24) das zur

Herstellung verwendete Semmelbrot als Quelle für *S. cerevisiae* angenommen werden.

Wie die Sequenzierungsergebnisse der PCR-Produkte des Primerpaars ITS1-/ITS5.8R zeigen, gibt es in hitzebehandelten Fleischprodukten nicht nur die Pilze, die normalerweise in frischem Fleisch vorkommen, sondern auch die Pilze, die aus den bei der Herstellung beigemengten Gewürzen stammen. Es ist wichtig, diesen Befund bei der Interpretation der Ergebnisse der quantitativen PCR zu berücksichtigen. Eine hohe Menge an Pilz-DNA in den Fleischprodukten resultiert nicht unbedingt oder ausschließlich aus einer hohen Pilz-Belastung des Rohmaterials „Fleisch“. Auch die Gewürze, die bei der Herstellung beigemischt werden, können stark mit Pilzen kontaminiert sein und zur Pilz-Belastung der Produkte beitragen. Mižáková et al. (2002) fanden, dass die Gewürze zur Herstellung fermentierter Rohfleischprodukte hoch mit Schimmelpilzen belastet waren, z. B. mit *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. und *Mucor* spp.; hoch mit Pilzen kontaminiert waren Knoblauchpulver, schwarzer Pfeffer, Muskatnuss und Kümmel. Auch Reiß (1986) berichtet, dass in verschiedenen Gewürzen am häufigsten *Aspergillus* spp. isoliert wurden; andere kontaminierende Spezies waren *Penicillium* spp., *Alternaria* spp. und *Rhizopus* spp.

Nach der Auswertung mit GelCompar[®]-II weisen viele Proben DNA-Banden gleicher Laufweite auf, unter anderem auf Höhe der Referenz-Spezies *Alt. alternata*. Das bedeutet nicht, dass unbedingt nur *Alt. alternata* in den Proben vorkommt, da es nach den Erkenntnissen dieser Studie noch 3 Pilzarten gibt (*Cla. herbarum*, *M. spinosus*, *Rhodotorula* spp.), deren DNA-Banden die gleiche Laufweite erreichen. Die DNA-Banden einiger im Fleisch vorkommenden Pilze haben ähnliche Laufweiten wie die von in Gewürzen vorkommenden Pilzarten, z. B. *S. cerevisiae* vs. *Guignardia mangiferae*, *P. chrysogenum* vs. *Macrophomina phaseolina*, *A. flavus* vs. *Neofusicoccum parvum*. Die präzise Identifizierung der Pilzarten der DNA-Banden im SSCP-Gel kann deshalb nur durch die Sequenzierung erfolgen. Dies dürfte kaum für die Hefe *Y. lipolytica* (*C. lipolytica*) gelten, da sie nach der Literatur (Bockelmann et al. 2008) und den Erkenntnissen dieser Studie stets die geringste Fragmentgröße hat (~110 bp bzw. ~370 bp, amplifiziert mit dem Primerpaar ITS1/ITS5.8R bzw. ITS1/ITS4). Ihre DNA erreichte im SSCP-Gel durchgehend die größte Laufweite. Demnach darf man annehmen, dass DNA-Banden aus den Feldproben mit dieser Laufweite von

Y. lipolytica oder zumindest von *Candida* spp. stammen. In einem Vorversuch zum Vergleich von frischem und verdorbenem Fleisch war diese Bande im verdorbenen Fleisch stark ausgeprägt. Deak und Beuchat (1996) berichten, dass die Hefe *Y. lipolytica* eine der häufigsten vorkommenden Pilzarten in verdorbenem Rinderhackfleisch ist. Sie kam nach der Ergebnisse dieser Studie nur in 7 % der pasteurisierten, aber in 60 % der sterilisierten Fleischproben vor. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Befund auf einen geringen Hygienestandard der zur Herstellung dieser Fleischprodukte verwendeten Rohmaterialien hinweist.

8 Schlussfolgerungen

Das entwickelte Pilz-DNA spezifische Primerpaar ITS1/ITS5.8R ermöglicht die Anwendung der PCR-SSCP-Methode zur Identifizierung der Pilzarten und die Anwendung der quantitativen PCR mit SYBR-Green-I zur Quantifizierung der Pilz-DNA in hitzebehandelten Fleischprodukten. Die Beziehung zwischen der mittels qPCR bestimmten DNA-Menge und der tatsächlichen Gesamtkeimzahl in der Probe muss je nach Produkt sorgfältig interpretiert werden, da Herstellungsbedingungen wie Temperatur, Druck und Dauer den Zerstörungs-Grad von Pilz-DNA beeinflussen und diese Verfahren sich nach Herstellern und Produkten unterscheiden. Unter Berücksichtigung der Zutaten kann eine durch qPCR ermittelte Konzentration $>10^5$ KBE/g eine hohe Kontamination der Rohwaren indizieren. In dieser Untersuchung wurde beobachtet, dass sich einige Pilzarten (z. B. *Y. lipolytica*) in verdorbenem Fleisch schneller vermehren als andere. Es sollte in weiteren Untersuchungen geprüft werden, ob die quantitative Bestimmung solcher Pilzarten als Indikator für den Verderb geeignet ist.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Die Standard-Methode zur Identifizierung und zur Quantifizierung von kontaminierenden Pilzen in Lebensmitteln ist bislang die kulturelle Anzucht. Diese kann aber nur vermehrungsfähige Pilze nachweisen. Wenn die Pilze bei der Herstellung eines Lebensmittels inaktiviert wurden, wie das bei hitzebehandelten Fleischprodukten der Fall ist, können sie bislang nicht nachgewiesen werden. Inaktivierte Pilze sind zwar nicht gesundheitsschädlich, doch verbindet sich ihr Vorkommen mit dem Risiko einer Kontamination durch hitzestabile Mykotoxine. Außerdem ist zur Herstellung von Lebensmitteln die Verwendung verdorbenen Fleisches – unabhängig von seiner Gesundheitsschädlichkeit – verboten, um den Verbraucher weder Ekel noch Täuschung auszusetzen. Deshalb wurden molekularbiologische Methoden entwickelt und angewendet, um auch inaktivierte Pilze in hitzebehandelten Fleischprodukten quantifizieren und identifizieren zu können. Grundlage dieser Methode ist die PCR (Polymerase Chain Reaction). Das Pilz-DNA-spezifische Primerpaar ITS1/ITS5.8R wurde entwickelt und verwendet, um PCR-Produkte für die SSCP-Methode zu gewinnen (SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism). In Polyacrylamidgel trennen sich die einzelsträngigen DNA-Fragmente der Pilze in Abhängigkeit von ihrer Faltung auf; dies, ergänzt durch die Sequenzierung, ermöglicht die Identifizierung der Pilzarten. In dieser Studie waren alle 32 sequenzierten DNA-Banden von 16 Proben Pilzarten zuzuordnen, z. B. *Candida tropicalis*, *Candida zeylanoides*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Alternaria alternata*, *Eurotium amstelodami*, *Wallemia sebi*, *Epicoccum nigrum*, *Lewia infectoria* und *Botrytis aclada*.

Zur Quantifizierung der Pilz-DNA wurde die quantitative PCR mit SYBR-Green-I im LightCycler[®] verwendet. Die Korrelation zwischen den kulturell ermittelten und den aus der qPCR errechneten \log_{10} KbE/g-Werten von acht getesteten frischen Fleischproben ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant. Insgesamt wurden 40 hitzebehandelte Fleischprodukte aus dem Handel in dieser Studie untersucht. Fast alle getesteten Proben wiesen eine Pilzkontamination unter 10^5 KbE-Äquivalent pro Gramm. Die Ergebnisse der Quantifizierung müssen jedoch sorgfältig interpretiert werden, aus folgenden Gründen: Eine hohe Menge an Pilz-DNA in den hitzebehandelten Fleischprodukten bedeutet nicht zwingend,

dass das Fleisch als Rohmaterial hoch mit Pilzen belastet ist; auch Gewürze kommen als Quelle in Frage. Dabei muss es sich nicht nur um Verderb erregende Schimmelpilzarten oder Hefen handeln, auch Endophyten und Pflanzenpathogene können nachgewiesen werden. Andererseits kann bei sterilisierten Fleischprodukten die DNA zum Teil zerstört sein, was insbesondere das qPCR-Ergebnis beeinträchtigen kann. Diese Einschränkung ist bei pasteurisierten Produkten weniger gegeben, so dass das Ergebnis der qPCR die Gesamtkeimzahl im Rohmaterial widerspiegelt.

VII SUMMARY

Studies on the reconstruction of the original fungal flora of heat-processed foods by qPCR and PCR-SSCP

Cultivation is a standard method to quantify fungal contamination in meat. This method is not applicable to products exposed to high temperatures, such as heat treated meat products, since fungi and fungal spores are deactivated by this process. Although inactivated fungi are not harmful to humans, their presence may still pose the risk of mycotoxin contamination, since mycotoxins are often heat resistant. In addition, the processing of spoiled meat - even if not harmful to human health - is prohibited by law, since the consumer would feel disgusted, as well as deceived. Therefore, a molecular biological method has been developed and applied in order to identify and quantify these deactivated fungi. PCR (Polymerase Chain Reaction) is the base method for this purpose. The fungal DNA specific primer pair ITS1/ITS5.8R was used to produce PCR-Amplicons for the SSCP-method (Single Strand Conformation Polymorphism). The fungal DNA is separated in a polyacrylamide gel according to the folding of the single strand DNA, which allows the identification of fungal species by a following sequence analysis. In this study, 32 DNA bands from 16 products were sequenced, and all of them represented fungal species, e.g. *Candida tropicalis*, *Candida zeylanoides*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Alternaria alternata*, *Eurotium amstelodami*, *Wallemia sebi*, *Epicoccum nigrum*, *Lewia infectoria* and *Botrytis aclada*.

Quantitative PCR with SYBR-Green-I in the LightCycler[®] was applied to quantify fungal DNA in the meat products. The \log_{10} CFU/g from culturing and the log equivalent calculated from qPCR of eight raw meat samples were significantly correlated ($p < 0.01$). In total, 40 heat processed meat products from the retail markets were investigated. The fungal contamination in most of these samples was below 10^5 CFU-equivalent per gram. However, the results of quantification must be interpreted with care, since a high contamination with fungal DNA may not only be due to the contamination of the raw meat, but also to the contamination of spices which are used to flavor the meat products. Such fungi are not necessarily food spoilage fungi, since endophytes and plant-

pathogens might be detected as well. For the sterilized products, the DNA was partly destroyed and this compromises the qPCR-results. The DNA in pasteurized products is less exposed to thermogenic damage, therefore the result of DNA-quantification with qPCR still reflects the total fungal plate count in the raw material for pasteurized products.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

Aldaoud, R., Saliba, S., Cunnington, J.H. (2009): First record of *Itersonilia perplexans* on *Anethum graveolens* (dill) in Australia. Australasian Plant Disease Notes 4, 60-61

Al-Soud, W.A., Rådström, P. (1998): Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples 64(10), 3748-3753

Anchordoquy, T.J., Molina, M.C. (2007): Preservation of DNA; Frontiers in clinical research. Cell Preservation Technology 5 (4), 180

Andersen, B., Smedsgaard, J., Jørring, I., Skouboe, P., Pedersen, L.H. (2006): Real-time PCR quantification of the AM-toxin gene and HPLC qualification of toxigenic metabolites from *Alternaria* species from Apples. International Journal of Food Microbiology 111, 105-111

Anderson, I.C., Campbell, C.D., Prosser, J.I. (2003): Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. Environmental Microbiology 5(1), 36-47

Ariefdjohan, M.W., Savaiano, D.A., Nakatsu, C.H. (2010): Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. Nutritional Journal 9(23), (<http://www.nutritionj.com/content/9/1/3>)

Asefa, D.T., Gjerde, R.O., Sidhu, M.S., Langsrud, S., Kure, C.F., Nesbakken, T., Skaar, I. (2009)a: Moulds contaminants on Norwegian dry-cured meat products. International Journal of Food Microbiology 128, 435-439

Asefa, D.T., Møretrø, T., Gjerde, R.O., Langsrud, S., Kure, C.F., Sidhu, M.S., Nesbakken, T., Skaar, I. (2009)b: Yeast diversity and dynamics in the production processes of Norwegian dry-cured meat products. International Journal of Food Microbiology 133, 135–140

Aubry, A., Porcher, R., Bottero, J., Touratier, S., Leblanc, T., Brethon, B., Rousselot, P., Raffoux, E., Menotti, J., Derouin, F., Ribaud, P., Sulahian, A. (2006): Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus galactomannan* test results following treatment with β -lactam antibiotics in patients with hematological disorders. Journal of Clinical Microbiology 44(2), 389-394

Banks, J.G., Board, R.G. (1987): Some factors influencing the recovery of yeasts and moulds from chilled foods. *Journal of Food Microbiology* 4, 197-206

Black, J. (2009): Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) of filamentous fungi in carpet. RTI Press publication No. MR-00011-0909. Research Triangle Park, NC: RTI International. (<http://www.rti.org/rtipress>)

Black, J.A., Foarde, K.K. (2007): Comparison of four different methods for extraction of *Stachybotrys chartarum* spore DNA and verification by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 70, 75-81

Bleisch, C. (2006): In wie fern beeinflusst *Aspergillus oryzae* die Produktion von Sojasauce? (Geht es auch ohne?). Fallstudie, Wahlfachmodul Mikrobiologie: Diversität der Mikroorganismen, Universität Zürich Irchel

Bockelmann, W., Heller, M., Heller, K.J. (2008): Identification of yeasts of dairy origin by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *International Dairy Journal* 18, 1066-1071

Borneman, J., Hartin, R.J. (2000): PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 66(10), 4356-4360

Brito, E.H., Brillhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Sidrim, J.J.C., Fontenelle, R.O.S., Melo, L.M., Albuquerque, E.S., Rocha, M.F.G. (2009): PCR-AGE, automated and manual methods to identify *Candida* strains from veterinary sources: A comparative approach. *Veterinary Microbiology* 139, 318-322

Brooks, F.T., Hansford, C.G. (1923): Mould growths upon cold-storage meat. *Transactions of the British Mycological Society* 8, 113-142

Bullerman, L.B., Bianchini, A., (2007): Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology* 119(1-2), 140-146

Bullerman, L.B., Hartman, P.A., Ayres, J. (1969): Aflatoxin production in meats. *Applied Microbiology* 18(5), 714-717

Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz (2007): Empfehlung des Robert Koch-Instituts; Schimmelpilzbelastung in Innenräumen – Befunderhebung, gesundheitliche Bewertung und Maßnahmen Mitteilung der Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“. 50,

1308–1323. DOI 10.1007/s00103-007-0339-y

Cabañes, F.J., Bragulat, M.R., Castellá, G. (2010): Ochratoxin A producing species in the genus *Penicillium*. *Toxins* 2, 1111-1120

Carvalho, C.M., Rocha, A., Estevinho, M.L.F., Choupina, A. (2005): Identification of honey yeast species based on RFLP analysis of the ITS region. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 5, 11-17

Chang, H.C., Leaw, S.N., Huang, A.H., Wu, T.S., Chang, T.C. (2001): Rapid identification of yeast in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *Journal of Clinical Microbiology* 39(10), 3466-3471

Chen, B.T., Keswani, J., Zhou, G., Ong, T. (2002): Using PCR to detect indoor fungi. *Proceedings: Indoor Air 2002*, 63-68

Chilvers, M.I., Du Toit, L.J. (2006): Detection and identification of *Botrytis* species associated with neck rot, scape blight, and umbel blight of onion. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2006-1127-01-DG

Comi, G., Orlic, S., Rezepovic, S., Urso, R., Iacumin, L. (2004): Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. *International Journal of Food Microbiology* 96, 29-34

Cvetnić, Z., Pepeljnjak, S. (1997): Distribution and mycotoxin-producing ability of some fungal isolates from the air. *Atmospheric Environment* 31(3), 491-495

Dalton, H.K., Board, R.G., Davenport, R.R. (1984): The yeasts of British fresh sausage and minced beef. *Antonie van Leeuwenhoek* 50, 227-248

Deak, T., Beuchat, L.R. (1996): Handbook of food spoilage yeasts. CRC Press, Inc. Boca Raton, USA

Deak, T., Chen, J., Beuchat, L.R. (2000): Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. *Applied and Environmental Microbiology* 66(10), 4340-4344

Dean, T.R., Roop, B., Betancourt, D., Menetrez, M.Y. (2005): A simple multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of four environmentally relevant fungal contaminants. *Journal of Microbiological Methods* 61, 9-16

Edel-Hermann, V., Dreumont, C., Pérez-Piqueres, A., Steinberg, C. (2004): Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal RNA genes to assess changes in fungal community structure in soils. *FEMS Microbiology Ecology* 47, 397-404

Edwards, S.G., O'Callaghan, J., Dobson, A.D.W. (2002): Review: PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycological Research* 106(9), 1005-1025

Einsele, H., Hebart, H., Roller, G., Löffler, J., Rothenhöfer, I., Müller, C., Bowden, R., van Burik, J.A., Engelhard, D., Kanz, L., Schumacher, U. (1997): Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *Journal of Clinical Microbiology* 35(6), 1353-1360

Eisgruber, H., Bülte, M. (2006): Mikrobiologische Kriterien und Mycotoxin-Höchstgehalte für Lebensmittel. (Rechtsvorschriften, Referenzverfahren und Empfehlungen in der EU und der Schweiz). Behr'S Verlag, Hamburg

Encinas, J.P., López-Díaz, T.-M., Garcíá-López, M.-L., Otero, A. Moreno, B. (2000): Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Science* 54, 203-208

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations, (2010):

http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf;

<http://www.fao.org/DOCREP/MEETING/004/y7022e/y7022e00.htm>

<http://www.fao.org/docrep/012/i0680e/i0680e02.pdf> ;

<http://www.fao.org/DOCREP/005/AC911E/ac911e05.htm>

FAO Corporate Document Repository (Regional Office for Asia and the Pacific). Meat processing technology for small-to-medium-scale producers: Canning / Sterilization of meat products. <http://www.fao.org/docrep/010/ai407e/AI407E22.htm> (heruntergeladen am 05.12.2011)

Fávaro, L.C.L., Melo, F.L., Aguilar-Vildoso, C.I., Araújo, W.L. (2011): Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. *PLoS ONE* 6(8): e14828. doi:10.1371/journal.pone.0014828

- Filtenborg, O., Frisvad, J.C., Thrane, U. (1996):** Moulds in food spoilage. International Journal of Food Microbiology 33, 85-102
- Francesconi, A., Kasai, M., Harrington, S.M., Beveridge, M.G., Petraitiene, R., Petraitis, V., Schaufele, R.L., Walsh, T.J. (2008):** Automated and manual methods of DNA extraction for *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* analyzed by quantitative real-time PCR. Journal of Clinical Microbiology 46(6), 1978–1984
- Fredlund, E., Gidlund, A., Olsen, M., Börjesson, T., Spliid, N.H.H., Simonsson, M. (2008):** Method evaluation of Fusarium DNA extraction from mycelia and wheat for down-stream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. Journal of Microbiological Methods 73, 33-40
- Fredricks, D.N., Smith, C., Meier, A. (2005):** Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. Journal of Clinical Microbiology 43(10), 5122-5128
- Fujita, S-I., Senda, Y., Nakaguchi, S., Hashimoto, T. (2001):** Multiplex PCR using internal transcribed space 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. Journal of Clinical Microbiology 39(10), 3617-3622
- Gabrio, T. (2008):** Schimmelpilze in Innenräumen. www.analytik-news.de. Publikationsdatum 15.09.2008. heruntergeladen am 25.11.2011
- Gardes, M., Bruns, T.D. (1993):** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology 2, 113-118
- Gardini, F., Suzzi, G., Lombardi, A., Galgano, F., Crudele, M.A., Andrighetto, C., Schirone, M., Tofalo, R. (2001):** A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. FEMS Yeast Research 1, 161-167
- Gedek, B. (1974):** Möglichkeiten und Grenzen der mikrobiologischen Futtermittelkontrolle. Deutsche tierärztliche Wochenschrift 81, 37-40 und 65-69
- Gill, C.O., Lowry, P.D. (1982):** Growth at sub-zero temperatures of black spot fungi from meat. Journal of Applied Bacteriology 52, 245-250

Gill, C.O., Lowry, P.D., Di Menna, M.E. (1981): A note on the identities of organisms causing black spot spoilage of meat. *International Journal of Applied Bacteriology* 51, 183-187

Gil-Serna, J., González-Salgado, A., González-Jaén, M.T., Vázquez, C., Patiño, B. (2009): ITS-based detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* in grapes and green coffee beans by real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 131, 162-167

Gourama, H., Bullerman, L.B. (1995): Relationship between growth as measured aflatoxin production and mold by ergosterol and plate count. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 28, 185-189

Guidot, A., Debaud, J-C., Marmeisse, R. (2002): Spatial distribution of the below-ground mycelia of an ectomycorrhizal fungus inferred from specific quantification of its DNA in soil samples. *FEMS Microbiology Ecology* 42, 477-486

Guidot, A., Lumini, E., Debaud, J-C., Marmeisse, R. (1999): The nuclear ribosomal DNA Intergenic Spacer as a target sequence to study intraspecific diversity of the ectomycorrhizal basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* directly on Pinus root systems. *Applied and Environmental Microbiology* 65(3), 903-909

Hagn, A., Pritsch, K., Ludwig, W., Schloter, M. (2003): Theoretical and practical approaches to evaluate suitable primer sets for the analysis of soil fungal communities. *Acta Biotechnologica* 23(4), 373-381

Halliday, C., Wu, Q.X., James, G., Sorrell, T. (2005): Development of a nested qualitative real-time PCR assay to detect *Aspergillus* species DNA in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 43(10), 5366-5368

Hanna, S.E., Connor, C.J., Wang, H.H. (2005): Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations. *Journal of Food Science* 70(3), R49-R53

Haugland, R.A., Brinkman, N., Vesper, S.J. (2002): Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. *Journal of Microbiological Methods* 50, 319-323

Haugland, R.A., Heckman, J.L., Wymer, L.J. (1999): Evaluation of different methods for the extraction of DNA from fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis. *Journal of Microbiological Methods* 37, 165-176

Hendolin, P.H., Paulin, L., Koukila-Kähkölä, P., Anttila, V.J., Malmberg, H., Richardson, M., Ylikoski, J. (2000): Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 38(11), 4186-4192

Hsieh, D.Y., Jay, J.M. (1984): Characterization and identification of yeasts from fresh and spoiled ground beef. *International Journal of Food Microbiology* 1, 141-147

Hunt, J., Boddy, L., Randerson, P.F., Rogers, H.J. (2004): An evaluation of 18S rDNA approaches for the study of fungal diversity in grassland soils. *Microbial Ecology* 47(4), 385-395

Iacumin, L., Chiesa, L., Boscolo, D., Manzano, M., Cantoni, C., Orlic, S., Comi, G. (2009): Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. *Food Microbiology* 26, 65-70

Ismail, M.A., Abou Elala, A.-H., Nassar, A., Michail, D.G. (1995): Fungal contamination of beef carcasses and the environment in a slaughterhouse. *Food Microbiology* 12, 441-445

Ismail, M.A., Zaky, Z.M. (1999): Evaluation of mycological status of luncheon meat with special reference to aflatoxigenic moulds and aflatoxin residues. *Mycopathologia* 146, 147-154

Jayakumar, V., Rajalakshmi, S., Amaresan, N. (2011): Leaf spot caused by *Neofusicoccum parvum* reported on nutmeg in India. *New Disease Report* 23, 19 (doi:10.5197/j.2044-0588.2011.023.019)

Jørgensen, H.B., Johansson, T., Cabbäck, B., Hedlund, K., Tunlid, A. (2005): Selective foraging of fungi by collembolans in soil. *Biology Letters* 1, 243-246

Karakousis, A., Tan, L., Ellis, D., Alexiou, H., Wormald, P.J. (2006): An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *Journal of Microbiological Methods* 65, 38-48

Kasai, M., Harrington, S. M., Francesconi, A., Petraitis, V., Petraitiene, R., Beveridge, M.G., Knudsen, T., Milanovich, J., Cotton, M.P., Hughes, J., Schaufele, R.L., Sein, T., Bacher, J., Murray, P.R., Kontoyiannis, D.P., Walsh, T.J. (2008): Detection of a molecular biomarker for zygomycetes by quantitative PCR assays of plasma, bronchoalveolar lavage, and lung tissue in a rabbit model of experimental pulmonary zygomycosis. *Journal of Clinical Microbiology* 46(11), 3690-3702

Kasper, Y., Lenz, C. (2004): Stable 8-year storage of DNA purified with the QIAamp DNA Blood Mini Kit. *QIAGEN News* 2004 e10. (http://www.qiagen.com/literature/qiagennews/weeklyarticle/04_03/e10/default.aspx)

Köhl, J., Haas, B.G., de Geijn, H.G., Speksnijder, A., Kastelein, P., de Hoog, S., van den Ende, B.G. (2009): Pathogenicity of *Stemphylium vesicarium* from different hosts causing brown spot in pear. *European Journal of Plant Pathology* 124, 151-162

Korabecna, M. (2007): The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): its biological meaning and application in medical mycology. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Méndez-Vilas, A (Ed.), 783-787

Krämer, J. (1997): *Lebensmittel-Mikrobiologie*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

Kumar, M., Shukla, P.K. (2005): Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. *Journal of Clinical Microbiology* 43(2), 662-668

Kumar, M., Shukla, P.K. (2006): Single-stranded conformation polymorphism of large subunit of ribosomal RNA is best suited to diagnosing fungal infections and differentiating fungi at species level. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 56, 45-51

Küng, V., Thalmann, P. (2004): Faktenblatt: Autoklaven-Dampfinaktivierung. Kontrollstelle für Chemie- und Biosicherheit (KCB), Kantonales Laboratorium Basel-Stadt

Laich, F., Fierro, F., Martin, J.F. (2002): Production of penicillin by fungi growing on food products: Identification of a complete penicillin gene cluster in *Penicillium griseofulvum* and a truncated cluster in *Penicillium verrucosum*. Applied and Environmental Microbiology 68(3), 1211-1219

Lau, A., Chen, S., Sorrell, T., Carter, D., Malik, R., Martin, P. Halliday, C. (2007): Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens. Journal of Clinical Microbiology 45(2), 380-385

Le Dréan, G., Mounier, J., Vasseur, V., Arzur, D., Habrylo, O., Barbier, G. (2010): Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. International of Food Microbiology, 1-8

Leinberger, D.M., Schumacher, U., Autenrieth, I.B., Bachmann, T.T. (2005): Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. Journal of Clinical Microbiology 43(10), 4943-4953

Leong, S.L., Pettersson, O.V., Rice, T., Hocking, A.D., Schnürer, J. (2011): The extreme xerophilic mould *Xeromyces bisporus* – Growth and competition at various water activities. International Journal of Food Microbiology 145, 57-63

LMHV: Lebensmittelhygiene-Verordnung (2010): Verordnung über Anforderungen an die Hygiene beim Herstellen, Behandeln und Inverkehrbringen von Lebensmitteln. 8. August 2007, Bundesgesetzblatt Jahrgang 2007 Teil I Nr. 39, S. 1816, Art. 1 vom 14. August 2007, geändert am 11. Mai 2010 durch Bundesgesetzblatt Jahrgang 2010 Teil I Nr. 23, S. 612, Art. 1 vom 20. Mai 2010 und zuletzt geändert am 14. Juli 2010 durch Bundesgesetzblatt Jahrgang 2010 Teil I Nr. 37, S. 929, Art. 1 vom 21. Juli 2010

Löffler, J., Hebart, H., Brauchle, U., Schumacher, U., Einsele, H. (2000): Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA by PCR. Journal of Clinical Microbiology 38(10), 3830-3833

Löffler, J., Hebart, H., Schumacher, U., Reitze, H., Einsele, H. (1997): Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. Journal of Clinical Microbiology 35(12), 3311-3312

- López, F.N.A., Durán-Quintana, M.C., Ruiz-Barba, J.L., Querol, A., Garrido-Fernández, A. (2006):** Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology* 23, 791-796
- López-Díaz, T.M., González, C.J., Moreno, B., Otero, A. (2002):** Effect of temperature, water activity, pH and some antimicrobials on the growth of *Penicillium olsonii* isolated from the surface of Spanish fermented meat sausage. *Food Microbiolog* 19, 1-7
- López-Díaz, T.M., Santos, J.A., García- López, M.L., Otero, A. (2001):** Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. *International Journal of Food Microbiology* 68, 69-74
- Lowry, P.D., Gill, C.O. (1984):** Temperature and water activity minima for growth of spoilage moulds from meat. *Journal of Applied Bacteriology* 56, 193-199
- Lund, F., Frisvad, J.C. (2003):** *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology* 95, 1117–1123
- Luo, G., Mitchell, T.G. (2002):** Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 40(8), 2860-2865
- Madonna, A.J., Voorhees, K.J., Hadfield, T.L. (2001):** Rapid detection of taxonomically important fatty acid methyl ester and steroid biomarkers using in situ thermal hydrolysis/methylation mass spectrometry (THM-MS): implications for bioaerosol detection. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 61, 65-89
- Mahmoud, A.-L.E., Sayed, A.M., Abou El-Alla, A.A. (2001):** Mycoflora and natural occurrence of mycotoxins in some meat products and livers of poultry and imported bulls. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 4(5), 611-513
- Makino, H., Fujimoto, J., Watanabe, K. (2010):** Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for detection and enumeration of yeasts of public health interest in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 140, 76–83

Malvárez, G., Oliveira, V.L. (2003): A PCR/RFLP technique to characterize fungal species in *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden ectomycorrhizas. *Mycorrhiza* 13, 101–105

Mansour, N.K. (1986): Zum Vorkommen von Schimmelpilzen der Gattung *Cladosporium* Link ex Fries auf Schaffleisch. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, Germany

Manter, D.K., Vivanco, J.M. (2007): Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of Microbiological Methods* 71, 7-14

Marschall, M.N., Cocolin, L., Mills, D.A., VanderGheynst, J.S. (2003): Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost. *Journal of Applied Microbiology* 95, 934-948

Martin, C., Roberts, D., van der Weide, M., Rossau, R., Jannes, G., Smith, T., Maher, M. (2000): Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* 38(10), 3735-3742

Martin, F., Selosse, M-A., Tacon, F.L. (1999): The nuclear rDNA intergenic spacer of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*: structural analysis and allelic polymorphism. *Microbiology* 145, 1605-1611

Martin, K.J., Rygielwicz, P.T. (2005): Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 5(28)

Matos, T.J., Jensen, B.B., Bernado, F.M., Barreto, A.H., Hojberg, O. (2007): Mycoflora of two types of Portuguese dry-smoked sausages and inhibitory effect of sodium benzoate, potassium sorbate, and methyl p-hydroxybenzoate on mould growth rate. *Journal of Food Protection* 70(6), 1468-1474

Mello, A., Garnerio, L., Bonfante, P. (1999): Specific PCR-primers as a reliable tool for the detection of white truffles in mycorrhizal roots. *New Phytologist* 141, 511-516

Millar, B.C., Jirua, X., Moorea, J.E., Earle J.A.P. (2000): A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *Journal of Microbiological Methods* 42, 139–147

Mille-Lindblom, C. von Wachenfeldt, E., Tranvik, L.J. (2004): Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. *Journal of Microbiological Methods* 59, 253-262

Mirhendi, H., Makimura, K., Khoramizadeh, M., Yamaguchi, H. (2006): A one-Enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically Important *Candida* species. *Japanese Journal of Medical Mycology* 47, 225-229

Mizáková, A., Pipová, M., Turek, P. (2002): The occurrence of moulds in fermented raw meat products. *Czech Journal of Food Science* 20(3), 89-94

Müller, F.-M.C., Werner, K.E., Kasai, M., Francesconi, A., Chanock, S.J., Walsh, T.J. (1998): Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption. *Journal of Clinical Microbiology* 36(6), 1625-1629

Newell, S.Y., Miller, J.D., Fallon, R.D. (1987): Ergosterol content of salt-marsh fungi: effect of growth conditions and mycelial age. *Mycologia* 79(5), 688-695

Nieguitsila, A., Deville, M., Jamal, T., Halos, L., Berthelemy, M., Chermette, R., Latouche, S., Arné, P., Guillot, J. (2007): Evaluation of fungal aerosols using Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE) and comparison with culture. *Journal of Microbiological Methods* 70, 86-95

Nielsen, D.S., Jakobsen, T., Jespersen, L., Koch, A.G., Arneborg, N. (2008): Occurrence and growth of yeasts in processed meat products: Implications for potential spoilage. *Meat Science* 80(3), 919-926

Nova, M.X.V., Schuler, A.R.P., Brasileiro, B.T.R.V., Morais J., M.A. (2009): Yeast species involved in artisanal cachaca fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. *Food Microbiology* 26(5), 460-466

Núñez, F., Rodríguez, M.M., Bermúdez, M.E., Córdoba, J.J. (1996): Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham. *International Journal of Food Microbiology* 32, 185-197

- Okubo, A., Sugiyama, S. (2009):** Comparison of molecular fingerprinting methods for analysis of soil microbial community structure. *Ecological Research* 24, 1399-1405
- Palmas, F., Meloni, V. (1997):** Fungi as an occupational health hazard in seasoned-food-industry workers. *Environmental Monitoring and Assessment* 48, 273-284
- Papagianni, M., Ambrosiadis, I., Filioussis, G. (2007):** Mould growth on traditional Greek sausages and penicillin production by *Penicillium* isolates. *Meat Science* 76(4), 653-657
- Pardo, E., Martín, S., Ramos, A.J., Sanchis, V. (2006):** Ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* isolates. Predictive models for fungal spoilage prevention – a review. *Food Additives and Contaminants* 23(4), 398-410
- Parsi, Z., Górecki, T. (2006):** Determination of ergosterol as an indicator of fungal biomass in various samples using non-discriminating flash pyrolysis. *Journal of Chromatography A* 1130, 145-150
- Peintner, U., Geiger, J., Pöder, R. (2000):** The microbiota of speck, traditional Tyrolean smoked and cured ham. *Journal of Food Protection* 63(10), 1399-1403
- Peters, S., Koschinsky, S., Schwieger, F., Tebbe, C.C. (2000):** Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single strand conformation polymorphism based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 66(3), 930-936
- Petersen, K.M., Møller, P.L., Jespersen, L. (2001):** DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 69, 11–24
- Pitkäranta, M., Meklin, T., Hyvärinen, A., Paulin, L., Auvinen, P., Nevalainen, A., Rintala, H. (2008):** Analysis of fungal flora in indoor dust by ribosomal DNA sequence analysis, quantitative PCR and culture. *Applied and Environmental Microbiology* 74(1), 233-244

- Pollmer, U. (2011):** Europäisches Institut für Lebensmittel- und Ernährungswissenschaften e.V.. Deutsches Zusatzstoff-Museum.
<http://www.zusatzstoffmuseum.de/lexikon-der-zusatzstoffe/begriff/hefeextrakt.html>
- Ramírez, M., Castro, C., Palomares, J.C., Torres, M.J., Aller, A.I., Ruiz, M., Aznar, J., Martín-Mazuelos, E. (2008):** Molecular detection and identification of *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Mycoses* 52, 129-134
- Rao, A.K., Mathers, P.H., Ramadan, H.H. (2006):** Detection of fungi in the sinus mucosa using polymerase chain reaction. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* 134(4), 581-585
- Rath, P.-M., Ansorg, R. (2000):** Identification of medically important *Aspergillus* species by single strand conformational polymorphism (SSCP) of the PCR-amplified intergenic spacer region. *Mycoses* 43, 381-386
- Redecker, D. (2000):** Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* 10, 73-80
- Reiß, J. (1986):** Schimmelpilze – Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. Springer-Verlag, Berlin
- Renard, A., Gómez di Marco, P., Egea-Cortines, M., Weiss, J. (2008):** Application of whole genome amplification and quantitative PCR for detection and quantification of spoilage yeasts in orange juice. *International Journal of Food Microbiology* 126, 195-201
- Robinson, C.H., Szaro, T.M., Izzo, A.D., Anderson, I.C., Parkin, P.I., Bruns, T.D. (2009):** Spatial distribution of fungal communities in a coastal grassland soil. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 414-416
- Rodeva, R., Gabler, J., Stoyanova, Z. (2009):** First evidence of *Itersonilia perplexans* on dill (*Anethum graveolens*) in Bulgaria. *Scientific works of the Lithuanian institute of horticulture and Lithuanian university of agriculture. Sodininkystė ir daržininkystė* 28(3), 193-198

Rojas, F.J., Jodral, M., Gosalvez, F., Pozo, R. (1991): Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish dry-cured ham. International Journal of Food Microbiology 13, 249-256

Romão, A.S., Spósito, M.B., Andreote, F.D., Azevedo, J.L., Araújo, W.L. (2011): Enzymatic differences between the endophyte *Guignardia mangiferae* (Botryosphaeriaceae) and the citrus pathogen *G. citricarpa*. Genetics and Molecular Research 10(1), 243-252

Saldanha-da-Gama, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (1997): Characterization of yeasts associated with Portuguese pork-based products. International Journal of Food Microbiology 37, 201-207

Salzer, D. (2011): Technologie Konserven-Herstellung.
<http://hagesued.eu/cms/deutsch/fachinformation/technologie/technologie-konserven.html> (heruntergeladen am 05.12.2011)

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O. (2000): Introduction to food- and airborne fungi. 6th Edition. Ponsen & Looyen, Wageningen

Sandhu, G.S., Kline, B.C., Stockman, L., Roberts, G.D. (1995): Molecular probes for diagnosis of fungal infections. Journal of Clinical Microbiology 33(11), 2913-2919

Sanguinetti, M., Posteraro, B., Pagano, L., Pagliari, G., Fianchi, L., Mele, L., La Sorda, M., Franco, A., Fadda, G. (2003): Comparison of real-time PCR, conventional PCR, and galactomannan antigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Journal of Clinical Microbiology 41(8), 3922-3925

Saxena, J., Munimbazi, C., Bullerman, L.B. (2001): Relationship of mould count, ergosterol and ochratoxin A production. International Journal of Food Microbiology 71, 29-34

Schabereiter-Gurtner, C., Selitsch, B., Rotter, M.L., Hirschl, A.M., Willinger, B. (2007): Development of novel real-time PCR assay for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology 45(3), 906-914

Schnürer, J. (1993): Comparison of methods for estimating the biomass of three food-borne fungi with different growth patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 59(2), 552-555

Seitz, L.M., Mohr, H.E., Burroughs, R., Sauer, D.B. (1977): Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chemists* 54(6), 1207-1217

Simmon, K.E., Steadman, D.D., Durkin, S., Baldwin, A., Jeffrey, W.H., Sheridan, P., Horton, R., Shields, M.S. (2004): Autoclave method for rapid preparation of bacterial PCR-template DNA. *Journal of Microbiological Methods* 56, 143-149

Smit, E., Leeftang, P., Glandorf, B., van Elsas, J.D., Wernars, K. (1999): Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 65(6), 2614-2621

Sørensen, L.M., Jakobsen, T., Nielsen, P.V., Frisvad, J.C., Koch, A.G. (2008): Mycobiota in the processing areas of two different meat products. *International Journal of Food Microbiology* 124, 58-64

Spiess, B., Seifarth, W., Hummel, M., Frank, O., Fabarius, A., Zheng, C., Mörz, H., Hehlmann, R., Buchheidt, D. (2007): DNA microarray-based detection and identification of fungal pathogens in clinical samples from neutropenic patients. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 3743-3753

Suanthie, Y., Cousin, M.A., Woloshuk, C.P. (2009): Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *Journal of Stored Products Research* 45, 139-145

Suezawa, Y., Suzuki, M. (2007): Bioconversion of Ferulic Acid to 4-Vinylguaiacol and 4-Ethylguaiacol and of 4-Vinylguaiacol to 4-Ethylguaiacol by halotolerant yeasts belonging to the genus *Candida*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71(4), 1058-1062

Taniwaki, M.H., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Fleet, G.H. (2009): Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* 132, 100-108

Taniwaki, M.H., Pitt, J.I., Hocking, A.D., Fleet, G.H. (2006): Comparison of hyphal length, ergosterol, mycelium dry weight and colony diameter for quantifying growth of fungi from foods. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 571(2), 49–67

Thomsen, L., Jensen, A.B. (2002): Application of nested-PCR technique to resting spores from the *Entomophthora muscae* species complex: implications for analyses of hostpathogen population interactions. *Mycologia*, 94(5), 794-802

Van Elsas, J.D., Duarte, G.F., Keijzer-Wolters, A., Smit, E. (2000): Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological methods* 43, 133-151

Vilgalys, R. (Duke University): Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>, heruntergeladen am 23.06.2010

Vollmer, T., Störmer, M., Kleesiek, K., Dreier, J. (2008): Evaluation of novel broad-range real-time PCR assay for rapid detection of human pathogenic fungi in various clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 46(6), 1919-1926

Walsh, T.J., Francesconi, A., Kasai, M., Chanock, S.J. (1995): PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. *Journal of Clinical Microbiology* 33(12), 3216-3220

Weber, H. (2003): Mikrobiologie der Lebensmittel, Fleisch-Fisch-Feinkost. Behr's Verlag, Hamburg

Weidenbörner, M. (1999): Lebensmittel-Mykologie. Behr's Verlag, Hamburg

Weighardt, F., Biamonti, G., Riva, S. (1993): A Simple procedure for enhancing PCR specificity. *Genome Research* 3, 77-80

West, A.W., Grant, W.D. (1987): Use of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosamine contents of soils to monitor changes in microbial populations. *Soil Biology and Biochemistry* 19(5), 607-612

Wijnands, L.M., van der Meij-Florijn, A., Delfgou-van Asch, E.H.M., van Leusden, F.M. (2009): Heat sensitivity of *Clostridium perfringens*. RIVM Report 330371004

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 315-322

Wu, Z., Wang, X-R., Blomquist, G. (2002): Evaluation of PCR primers and PCR conditions for specific detection of common airborne fungi. Journal of Environmental Monitoring 4, 377-382

Yohalem, D.S., Nielsen, K., Green, H., Jensen, D.F. (2004): Biocontrol agents efficiently inhibit sporulation of *Botrytis aclada* on necrotic leaf tips but spread to adjacent living tissue is not prevented. FEMS Microbiology Ecology 47, 279-303

Zelles, L., Hund, K., Stepper, K. (1987): Methoden zur relativen Quantifizierung der pilzlichen Biomasse im Boden. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde 150, 249-252

Zeng, Q-Y., Westermarck, S-O., Rasmuson-Lestanderb, A., Wang, X-R. (2006): Detection and quantification of *Cladosporium* in aerosols by real-time PCR. Journal of Environmental Monitoring 8, 153–160

Zeng, X., Kong, F., Halliday, C., Chen, S., Lau, A., Playford, G., Sorrell1, T.C. (2007): Reverse line blot hybridization assay for identification of medically important fungi from culture and clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology 45(9), 2872-2880

Zhou, G., Whong, W.-Z., Ong, T., Chen, B. (2000): Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment. Molecular and Cellular Probes 14, 339-348

Zill, G., Engelhardt, G., Wallnöfer, P.R. (1988): Determination of ergosterol as a measure of fungal growth using Si 60 HPLC. Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und -Forschung 187, 246-249

IX ANHANG

1 Anwendung der DNA-Extraktions-Kit Nr. 1-3

1.1 Kit 1: High Pure PCR Template Preparation Kit

Vorbereitung des Kits vom Typ 100 Präparate

1. Proteinase K mit 4,5 ml PCR-H₂O auffüllen (nach Gebrauch bei -20 °C aufbewahren)
2. Wasch-Puffer mit 80 ml Ethanol vermischen
3. Inhibitor Removal Puffer mit 20 ml 96-100%igem Ethanol mischen

Vor jeder Extraktion: Elution Puffer erwärmen auf 70 °C

Reinkultur

+ 250 mg Glass Bead + 100 µl Sporen-Suspension



- Schütteln in TissueLyser II, 30 Hz, 1 min
- Vortexen 5-10 sec

+ 100 µl Tissue Lysis Puffer

+ 400 U Lyticase (20 µl)



- Vortexen 5-10 sec, kurz zentrifugieren (5 sec bei 8000 x g)
- Inkubation bei 37 °C, 60 min
- Vortexen 5-10 sec

+ 200 µl Binding Puffer + 40 µl Proteinase K



- Vortexen 5-10 sec
- Inkubation bei 70 °C, 10 min (in Eppendorf-Thermomixer)

+ 100 µl Isopropanol



- Vortexen 5-10 sec
- High Filter Tube (mitgeliefert) in eine Collection Tube (mitgeliefert) überführen
- Auftrag von 400 µl in Filter Tube
- Zentrifugation: 8000 x g, 1 min*
- Durchfluss und Collection Tube verwerfen
- Filter Tube in neue Collection Tube (mitgeliefert) überführen

+ 500 µl Inhibitor Removal Puffer (4a) in die Filter Tube



- Zentrifugation: 8000 x g, 1 min
- Durchfluss und Collection Tube verwerfen
- Filter Tube in neue Collection Tube (mitgeliefert) überführen

+ 500 µl Wash Puffer (1st Wash)



- Zentrifugation: 8000 x g, 1 min
- Durchfluss und Collection Tube verwerfen
- Filter Tube in neue Collection Tube (mitgeliefert) überführen

+ 500 µl Wash Puffer (2nd Wash)



- Zentrifugation: 8000 x g, 1 min
- Durchfluss verwerfen
- Filter Tube zurück in dieselbe Collection Tube
- Zentrifugation: 16000 x g, 2 min
- Durchfluss und Collection Tube verwerfen
- Filter Tube in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß

+ 200 µl vorgewärmter Elution Puffer (*Vorwärmen Elution Puffer auf 70 °C*)



- Zentrifugation: 8000 x g, 1 min
- Filter Tube verwerfen

DNA liegt im Eluat vor; Aufbewahrung bei +2 bis +8 °C oder bei -20 °C für 2 Jahren möglich (Anchordoquy und Molina, 2007).

Fleisch und künstlich kontaminiertes Fleisch

50 mg Probe zerkleinern und in 2 ml Reaktionsgefäß geben (zur künstlichen Kontamination: + 5-10 µl Pilz-Sporen-Suspension)

+ 250 mg Glass Bead + 200 µl Tissue Lysis Puffer



- Schütteln in TissueLyser II, 30 Hz, 1 min
- Zentrifugation: 16000 x g, 30 sec
- Vortexen 5-10 sec

+ 40 µl Proteinase K



- Vortexen 5-10 sec
- Inkubation bei 56 °C über 1,5 - 2 Stunden in Eppendorf-Thermomixer bis das Fleisch komplett verdaut ist. Während der Inkubation 2-3 Male pro Stunde vortexen

+ 400 U Lyticase (20 µl)



- Vortexen 5-10 sec, kurz zentrifugieren
- Inkubation bei 37 °C, 60 min

+ 200 µl Binding Puffer



- Vortexen 5-10 sec
- Inkubation bei 70 °C, 10 min (in Eppendorf-Thermomixer)

+ 100 µl Isopropanol, Waschen und Eluieren wie DNA-Extraktionsmethode für Reinkultur

* Wenn die Flüssigkeit nicht komplett aus der High Filter Tube gewaschen war, wurde erneut zentrifugiert (mit Geschwindigkeit 16000 x g, 2 min)

1.2 Kit 2: QIAamp DNA Mini Kit

Vorbereitung des Kits vom Typ 50 Präparate: Puffer AW1 und AW2 jeweils mit 96-100%igem Alkohol mischen, Menge nach Herstellerangaben.

Reinkultur

+ 250 mg Glass Bead, + 100 µl Sporen-Suspension



- Schütteln in TissueLyser II, 30 Hz, 1 min
- Vortexen 5-10 sec

+ 100 µl Puffer ATL (Tissue Lysis Puffer)

+ 400 U Lyticase (20 µl)



- Vortexen 5-10 sec, kurz zentrifugieren (5 sec bei 8000 x g)
- Inkubation bei 37 °C, 60 min
- Vortexen 5-10 sec

+ 200 µl Puffer AL (Lysis Puffer)* + 20 µl Proteinase K



- Vortexen 5-10 sec
- Inkubation bei 70 °C 10 min (in Eppendorf-Thermomixer)

+ 200 µl Ethanol (96-100 %)



- Vortexen 15 sec
- Auftrag von 500 µl in QIAamp Mini Spin Column
- Zentrifugation: 8000 x g, 1 min**
- Durchfluss und Collection Tube verwerfen
- QIAamp Mini Spin Column in neue Collection Tube (mitgeliefert) überführen

+ 500 µl Puffer AW1

- ↓
- Zentrifugation: 8000 x g, 1 min
 - Durchfluss und Collection Tube verwerfen
 - ▼ - QIAamp Mini Spin Column in neue Collection Tube (mitgeliefert) überführen

+ 500 µl Puffer AW2

- ↓
- Zentrifugation: 8000 x g, 1 min
 - Durchfluss verwerfen
 - QIAamp Mini Spin Column zurück in dieselbe Collection Tube
 - ▼ - Zentrifugation: 16000 x g, 2 min
 - Durchfluss und Collection Tube verwerfen
 - QIAamp Mini Spin Column in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß

+ 200 µl Puffer AE

- ↓
- Inkubation bei Zimmertemperatur (~ 25 °C) 1 min
 - Zentrifugation: 8000 x g, 1 min
 - ▼ - QIAamp Mini Spin Column verwerfen

DNA liegt in Eluat vor; Aufbewahrung bei +2 bis +8 °C oder bei -20 °C für 2 Jahre (Anchordoquy und Molina, 2007) oder bis zu 8 Jahren möglich (Kasper und Lenz, 2004)

Fleisch und künstlich kontaminiertes Fleisch

50 mg Probe zerkleinern und in 2 ml Reaktionsgefäß geben (zur künstlichen Kontamination: + 5-10 µl Pilz-Sporen-Suspension)

+ 250 mg Glass Bead + 80 µl PBS Puffer

- ↓
- Schütteln in TissueLyser II, 30 Hz, 1 min
 - Zentrifugation: 16000 x g, 30 sec
 - ▼ - Vortexen 5-10 sec

+ 120 µl Puffer ATL (Tissue Lysis Puffer) + 20 µl Proteinase K

- ↓
- Vortexen 5-10 sec
 - Inkubation bei 56 °C über 1,5 - 2 Stunden in Eppendorf-Thermomixer oder bis das Fleisch komplett verdaut ist, während der Inkubation 2-3 Mal pro Stunde vortexen***

+ 400 U Lyticase (20 µl)



- Vortexen 5-10 sec, kurz zentrifugieren (5 sec bei 8000 x g)
- Inkubation bei 37 °C, 60 min

+ 200 µl Puffer AL (Lysis Puffer)*



- Vortexen 15 sec
- Inkubation bei 70 °C, 10 min (in Eppendorf-Thermomixer)

+ 200 µl Ethanol (96-100 %), Waschen und Eluieren wie DNA-Extraktionsmethode für Reinkultur

* *Nachdem der Puffer AL zugefügt wurde, war gelegentlich ein weißes Präzipitat zu sehen, welches sich aber nach der Inkubation bei 70 °C löste*

** *Wenn die Flüssigkeit nicht komplett aus der QIAamp Mini Spin Column gewichen war, wurde erneut zentrifugiert (mit Geschwindigkeit 16000 x g, 2 min)*

*** *Übernachtinkubation ist möglich ohne Beeinträchtigung der DNA-Qualität*

1.3 Kit 3: GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit

Vorbereitung des Kits vom Typ 70 Präparate:

1. 10 mg Proteinase K mit 0,5 ml nukleasefreiem H₂O auffüllen (nach Gebrauch bei -20 °C aufbewahren)
2. Wash Solution mit 80 ml 100%igem Ethanol mischen

Reinkultur

+ 250 mg Glass Bead + 100 µl Spore-Lösung



- Schütteln in TissueLyser II, 30 Hz, 1 min
- Vortexen 5-10 sec

+ 100 µl Tissue Lysis Puffer

+ 400 U Lyticase (20 µl)




- Vortexen 5-10 sec, kurz zentrifugieren (5 sec bei 8000 x g)
- Inkubation bei 37 °C, 60 min
- Vortexen 5-10 sec

+ 200 µl Lysis Soluton C (B8803) + 20 µl Proteinase K




- Vortexen 5-10 sec
- Inkubation bei 70 °C, 10 min (in Eppendorf-Thermomixer)*


+ 200 µl Ethanol (95-100 %)

- 
- Vortexen 5-10 sec
 - Auftrag von 500 µl in Binding Column
 - Zentrifugation: 8000 x g, 1 min**
 - Durchfluss und Collection Tube verwerfen
 - Binding Column in neue Collection Tube (mitgeliefert) überführen


+ 500 µl Wash Solution (1st Wash)

- 
- Zentrifugation: 8000 x g, 1 min
 - Durchfluss und Collection Tube verwerfen
 - Binding Column in neue Collection Tube (mitgeliefert) überführen

+ 500 µl Wash Solution (2nd Wash)

- 
- Zentrifugation: 8000 x g, 1 min
 - Durchfluss verwerfen
 - Binding Column zurück in dieselbe Collection Tube
 - Zentrifugation: 16000 x g, 2 min
 - Durchfluss und Collection Tube verwerfen
 - Binding Column in neue 2 ml Collection Tube (mitgeliefert) überführen

+ 200 µl Elution


- 
- Inkubation bei Zimmertemperatur (~ 25 °C) 5 min
 - Zentrifugation: 8000 x g, 1 min
 - Binding Column verwerfen

DNA liegt im Eluat vor; Aufbewahrung bei +2 bis +8 °C oder bei -20 °C für 2 Jahren möglich (Anchordoquy und Molina, 2007).

Fleisch und künstlich kontaminiertes Fleisch

50 mg Probe zerkleinern und in 2 ml Reaktionsgefäß geben (zur künstlichen Kontamination: + 5-10 µl Pilz-Sporen-Suspension)

+ 250 mg Glass Bead, + 200 µl Tissue Lysis Puffer

- 
- Schütteln in TissueLyser II, 30 Hz, 1 min
 - Zentrifugation: 16000 x g, 30 sec
 - Vortexen 5-10 sec

+ 20 µl Proteinase K

- ↓
- Vortexen 5-10 sec
 - Inkubation bei 56 °C über 1,5 - 2 Stunden in Eppendorf-Thermomixer oder bis das Fleisch komplett verdaut ist, während der Inkubation 2-3 Mal pro Stunde vortexen

+ 400 U Lyticase (20 µl)

- ↓
- Vortexen 5-10 sec, kurz zentrifugieren (5 sec bei 8000 x g)
 - Inkubation bei 37 °C, 60 min

+ 200 µl Lysis Soluton C (B8803)

- ↓
- Vortexen 5-10 sec
 - Inkubation bei 70 °C, 10 min (in Eppendorf-Thermomixer)*

+ 200 µl Ethanol (96-100%), Waschen und Eluieren wie DNA-Extraktionsmethode für Reinkultur

* *Während der Inkubation: + 500 µl Column Preparation Solution in GenElute Miniprep Binding Column, 12,000 x g, 1 min zentrifugieren, Durchfluss verwerfen*

** *Wenn die Flüssigkeit nicht komplett aus der Binding Column gewichen war, wurde erneut zentrifugiert (mit Geschwindigkeit 16000 x g, 2 min)*

2 Design des Primers ITS5.8R

Tabelle 33: ITS-Sequenzen von Pilz-Spezies und Pflanzen

Sequenz Nr. 1*		<i>(zum Design des Primers ITS5.8R)</i>	
Nr. Spezies	Accession	Nr. Spezies	Accession
1 <i>Acremonium</i> sp. TMS-2011	HQ631064	20 <i>Penicillium chrysogenum</i>	JN020939
2 <i>Alternaria alternata</i>	HQ645083		HQ882177
	JF311960	21 <i>Penicillium commune</i>	JN217238
	HQ674661		GQ458026
3 <i>Aspergillus fumigatus</i>	JN169122	22 <i>Penicillium expansum</i>	AY373912
	GU566217		DQ339552
4 <i>Candida albicans</i>	EF567995	23 <i>Penicillium griseofulvum</i>	GU566224
5 <i>Candida intermedia</i>	HQ693784	24 <i>Penicillium nalgiovense</i>	AY371617
6 <i>Candida parapsilosis</i>	JF508435	25 <i>Penicillium olsonii</i>	AY373925
	EU564209	26 <i>Penicillium roqueforti</i>	HQ442348
7 <i>Candida rugosa</i>	GQ376074	27 <i>Penicillium solitum</i>	AY373932
	EF568037	28 <i>Penicillium verrucosum</i>	AY373938
	GU246265	29 <i>Pichia kudriavzevii</i>	AB305095
8 <i>Candida zeylanoides</i>	AB278160		AY235807
	DQ249203	30 <i>Pichia membranifaciens</i>	DQ104730
9 <i>Chrysosporium inops</i>	GU733340		EF061132
10 <i>Chrysosporium</i> sp.	FJ430727	31 <i>Rhodotorula glutinis</i>	AF444539
11 <i>Cryptococcus albidus</i>	AF444342		FJ345357
12 <i>Cryptococcus curvatus</i>	AF444458	32 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	EU149812
13 <i>Cryptococcus laurentii</i>	EF568051	33 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GQ376091
14 <i>Debaryomyces hansenii</i>	EU149789		AY939814
	EU569041	34 <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	FJ623269
	GQ458019	35 <i>Scopulariopsis chartarum</i>	AY625066
15 <i>Eurotium herbariorum</i>	AY373887	36 <i>Trichosporon lignicola</i>	AF444482
16 <i>Eurotium rubrum</i>	AY373891	1 <i>Alternaria alternata</i>	Isolated
17 <i>Fusarium oxysporum</i>	JF439472	2 <i>Aspergillus penicillioides</i>	Isolated
	HQ658969	3 <i>Cryptococcus curvatus</i>	Isolated
18 <i>Gibberella moniliformis</i>	JF499674	4 <i>Eurotium</i> spp.	Isolated
	EU364867	5 <i>Penicillium chrysogenum</i>	Isolated
19 <i>Penicillium aurantiogriseum</i>	JN097811	6 <i>Penicillium corylophilum</i>	Isolated
	GU566234		

Sequenz Nr. 2*		Sequenz Nr. 3*	
Nr. Spezies	Accession	Nr. Spezies	Accession
1 <i>Aspergillus flavus</i>	JF824682	1 <i>Cladosporium cladosporioides</i>	EU301112
	HQ340109		JF499834
2 <i>Aspergillus niger</i>	JF436885	2 <i>Cladosporium herbarum</i>	AF393707
	JF439461		EU343313
3 <i>Aspergillus ochraceus</i>	EU805804	3 <i>Mucor circinelloides</i>	JN227066
4 <i>Aspergillus parasiticus</i>	AY373859	4 <i>Mucor hiemalis</i>	JF303857
	HQ340102	5 <i>Mucor plumbeus</i>	EU484262
5 <i>Aspergillus terreus</i>	GQ338244		AF548078
6 <i>Aspergillus versicolor</i>	GU586852	6 <i>Mucor racemosus</i>	HQ285703
	GQ229082		AY625074
1 <i>Aspergillus flavus</i>	Isolated	7 <i>Rhizopus oryzae</i>	JF817314
2 <i>Aspergillus terreus</i>	Isolated	8 <i>Rhizopus stolonifer</i>	AY625075
		9 <i>Thamnidium elegans</i>	AB113024
		10 <i>Trichosporon gracile</i>	AF444456
		1 <i>Cladosporium oxysporum</i>	Isolated
		2 <i>Trichosporon gracile</i>	Isolated

Sequenz Nr.4*		Sequenz Nr. 5*	
Nr. Spezies	Accession	Nr. Spezies	Accession
1 <i>Absidia glauca</i>	HQ285606	1 <i>Yarrowia lipolytica</i>	GQ376068
2 <i>Absidia spinosa</i>	EU484214		EU252546
			EU603297
			GQ458037
		1 <i>Yarrowia lipolytica</i>	Isolated

Sequenz Nr. 6* (zum Design des Primers ITS5.8R)

Nr.	Name	Spezies	Accession
Gewürze			
1	Bohnenkraut	<i>Satureja hortensis</i>	AY227143
2	Karotte	<i>Daucus carota</i>	AF077779
3	Majoran	<i>Origanum majorana</i>	EU252134
4	Oregano	<i>Origanum vulgare</i>	DQ667243
5	Paprika	<i>Capsicum annuum</i>	GU944973
6	Piment	<i>Pimenta dioica</i>	AM234081
7	Rosmarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	DQ667241
8	Thymian	<i>Thymus vulgaris</i>	EU785939
9	Weißer Senf	<i>Sinapis alba</i>	FJ609733
10	Weißer Pfeffer	<i>Piper nigrum</i>	DQ868738
11	Zimt	<i>Cinnamomum verum</i>	AF272267
12	Zitrone	<i>Citrus limon</i>	FJ980439
Getreide			
1	Gerste	<i>Hordeum vulgare</i>	FJ593180
2	Hafer	<i>Avena sativa</i>	AY520821
3	Hirse	<i>Panicum miliaceum</i>	FJ606748
4	Mais	<i>Zea mays</i> subsp. Mexicana	AF019817
5	Reis	<i>Oryza sativa</i> Indica	FJ949064
		<i>Oryza sativa</i> Japonica Group	DQ143118
		<i>Oryza sativa</i>	AF169230
6	Roggen	<i>Secale cereale</i>	AJ409202
7	Sojabohne	<i>Glycine max</i>	EU118312
		<i>Glycine max</i>	FJ609734
		<i>Glycine max</i>	EF517917
8	Weizen	<i>Triticum aestivum</i> var. Albirubrinflatum	FJ196304
		<i>Triticum aestivum</i>	FJ609737

Sequenz Nr. 7* : Gewürze

Nr.	Name	Spezies	Accession
1	Koriander	<i>Coriandrum sativum</i>	HQ377205
2	Kümmel	<i>Carum carvi</i>	AF077878
3	Sellerie	<i>Apium graveolens</i>	GQ148789

Sequenz Nr. 8* : Gewürze

Nr.	Name	Spezies	Accession
1	Knoblauch	<i>Allium sativum</i>	EU626375
2	Zwiebel	<i>Allium cepa</i>	FJ664287

Sequenz Nr. 9* : Gewürze

Nr.	Name	Spezies	Accession
1	Ingwer	<i>Zingiber officinale</i>	DQ064590

1* : *Acremonium* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus fumigatus*, *Candida* spp., *Chrysosporium* spp., *Cryptococcus* spp., *Debaryomyces hansenii*, *Eurotium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Pichia* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Scopulariopsis* spp., *Trichosporon lignicola*,

2* : *Aspergillus* spp.

3* : *Cladosporium* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Thamnidium elegans*, *Trichosporon gracile*

4* : *Absidia* spp.

5* : *Yarrowia lipolytica*

6* : **Gewürze**: Bohnenkraut, Karotte, Majoran, Oregano, Paprika, Piment, Rosmarin, Thymian, Weißer Senf, Weißer Pfeffer, Zimt, Zitrone

Getreide: Gerste, Hafer, Hirse, Mais, Reis, Roggen, Sojabohne, Weizen

7*: Koriander, Kümmel, Sellerie

8*: Knoblauch, Zwiebel

9*: Ingwer

3 Primer Test: Ergebnis in Agarosegel

3.1 Primerpaare-Vergleich (Pilze, Gewürzen und Fleischproben)

Die DNA von allen getesteten Proben wurde mit 22 Primerpaaren per PCR im Thermocycler amplifiziert. Zum Nachweis der Amplifikation wurden 8 µl PCR-Produkte mit 2 µl Auftragpuffer gemischt und auf 0,5%iges Agarosegel aufgetragen.

Probe:

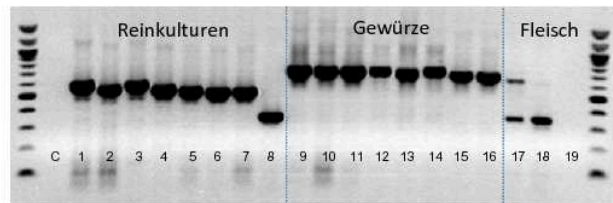
C	Negativ-Kontrolle	10	Zwiebel: <i>Allium cepa</i>
1	<i>Aspergillus flavus</i>	11	Knoblauch: <i>Allium sativum</i>
2	<i>Eurotium rubrum</i>	12	Zitrone: <i>Citrus limon</i>
3	<i>Penicillium chrysogenum</i>	13	Paprika: <i>Capsicum annum</i>
4	<i>Cladosporium herbarum</i>	14	Ingwer: <i>Zingiber officinale</i>
5	<i>Candida albicans</i>	15	Koriander: <i>Coriandrum sativum</i>
6	<i>Cryptococcus curvatus</i>	16	Sellerie: <i>Apium graveolens</i>
7	<i>Trichosporon gracile</i>	17	Hackfleisch 1 (Schweine&Rindfleisch)
8	<i>Yarrowia lipolytica</i>	18	Hackfleisch 2 (Schweinefleisch)
9	Lauch: <i>Allium spp.</i>	19	Schweinefleisch (als Negativ-Kontrolle)

Primer und Annealing-Temperatur:

1 ITS1 / ITS4

ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC

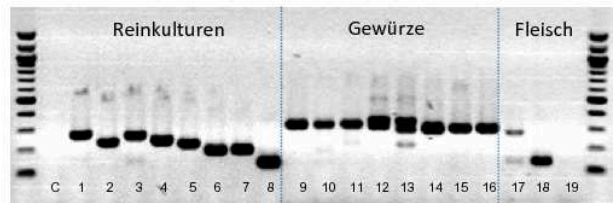
Annealing-Temperatur: 56 °C



2 ITS1 / ITS2

ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS2 GCTGCGTTCTTCATCGATGC

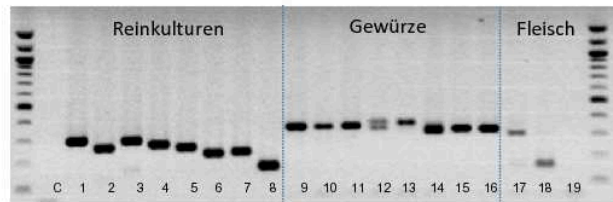
Annealing-Temperatur: 60 °C



3 ITS5 / ITS2

ITS5 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
ITS2 GCTGCGTTCTTCATCGATGC

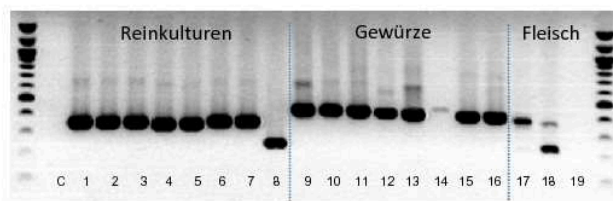
Annealing-Temperatur: 56 °C



4 ITS3 / ITS4

ITS3 GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC

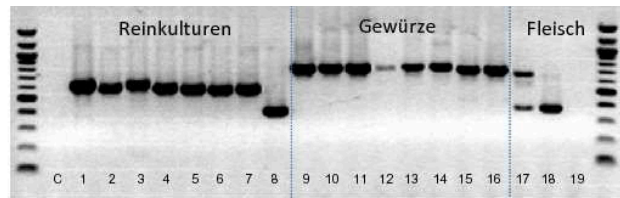
Annealing-Temperatur: 56 °C



5 ITS5 / ITS4

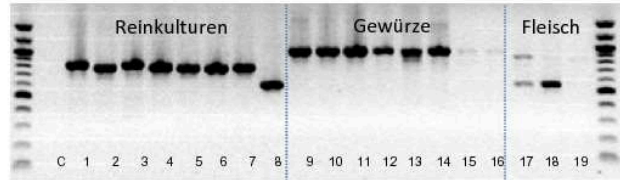
ITS5 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
 ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC

Annealing-Temperatur: 55 °C

**6 Fung18Sf / ITS4**

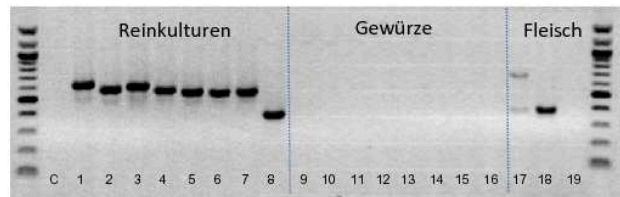
Fung18sf TTGCTCTCAACGAGGAAT
 ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC

Annealing-Temperatur: 50 °C

**7 ITS1F / ITS4**

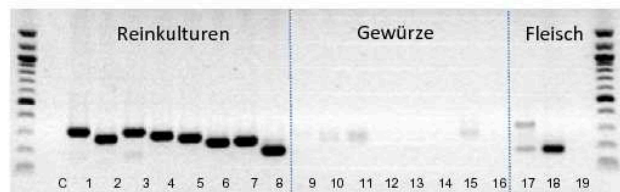
ITS1F CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
 ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC

Annealing-Temperatur: 55 °C

**8 ITS1F/ITS2**

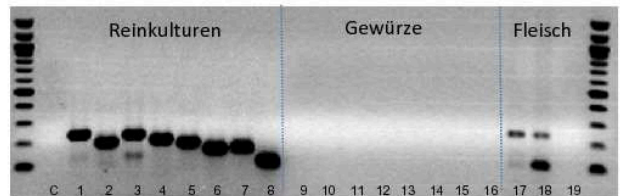
ITS1F CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
 ITS2 GCTGCGTTCTTCATCGATGC

Annealing-Temperatur: 56 °C

**9 ITS1/ITS5.8R**

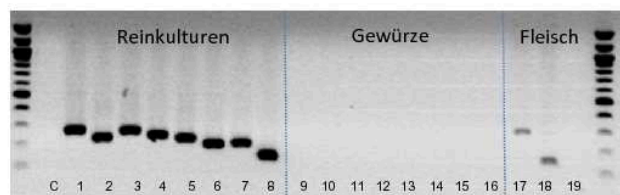
ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG
 ITS5.8R GAGATCCGTTGTTGAAAGTT

Annealing-Temperatur: 56 °C

**10 ITS1F/ITS5.8R**

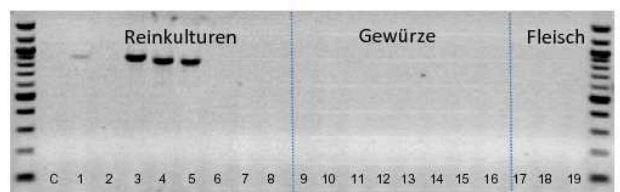
ITS1F CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
 ITS5.8R GAGATCCGTTGTTGAAAGTT

Annealing-Temperatur: 56 °C

**11 NSI1 / NLB3**

NSI1 GATTGAATGGCTTAGTGAGG
 NLB3 GGATTCTCACCCCTCTATGA

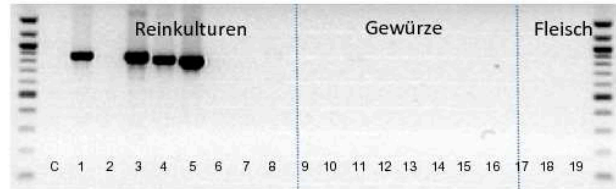
Annealing-Temperatur: 60 °C



12 NS11 / NLB4

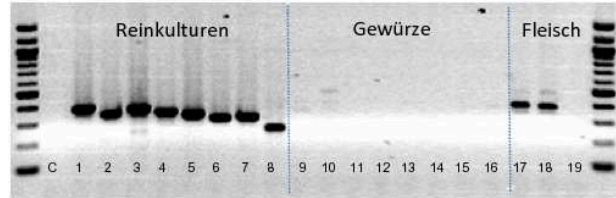
NS11 GATTGAATGGCTTAGTGAGG
 NLB4 GGATTCTCACCCCTCTATGAC

Annealing-Temperatur: 60 °C

**13 NS11 / 58A2R**

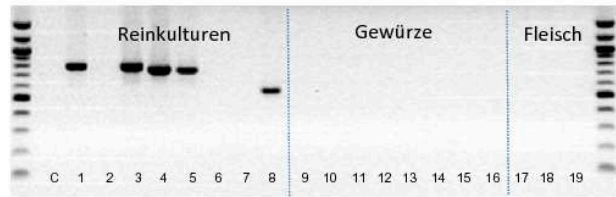
NS11 GATTGAATGGCTTAGTGAGG
 58A2R CTGCGTTCCTCATCGAT

Annealing-Temperatur: 60 °C

**14 ITS1F / NLB3**

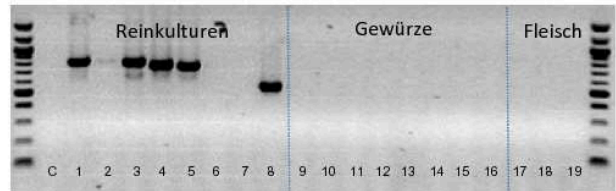
ITS1F CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
 NLB3 GGATTCTCACCCCTCTATGA

Annealing-Temperatur: 60 °C

**15 ITS1F / NLB4**

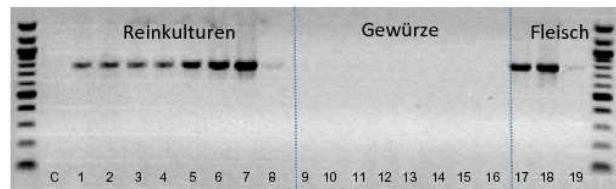
ITS1F CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
 NLB4 GGATTCTCACCCCTCTATGAC

Annealing-Temperatur: 60 °C

**16 0817F/1536R**

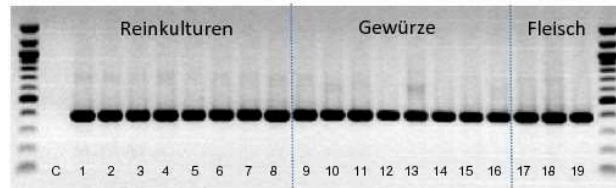
0817F TTAGCATGGAATAATRRAATAGGA
 1536R ATTGCAATGCYCTATCCCA

Annealing-Temperatur: 56 °C

**17 NS7 / NS8**

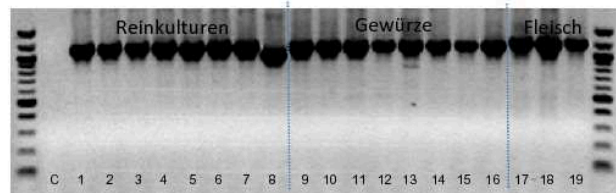
NS7 GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC
 NS8 TCCGCAGGTTACCTACGGA

Annealing-Temperatur: 50 °C

**18 NS1 / NS4**

NS1 GTAGTCATATGCTTGCTC
 NS4 CTTCCGTCATTCTTTAAG

Annealing-Temperatur: 50 °C

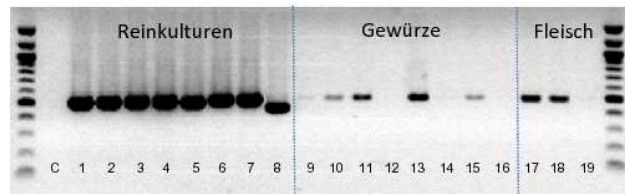


19 P1 / P2

P1 ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG

P2 CCGATCCCTAGTCGGCATAG

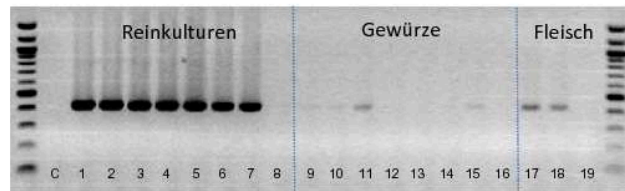
Annealing-Temperatur: 62 °C

**20 FF2 / FR1**

FF2 GGTTCATTTTGTGGTTTCTA

FR1 CTCTCAATCTGTCAATCCTTATT

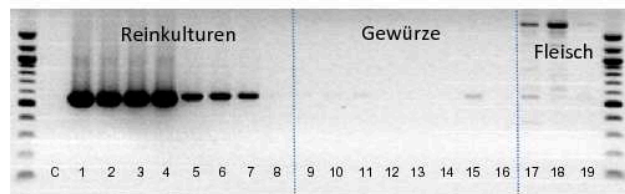
Annealing-Temperatur: 52 °C

**21 EF4 / Fung5**

EF4 GGAAGGGRTGTATTTATTAG

Fung 5 GTAAAAGTCCTGGTTCCC

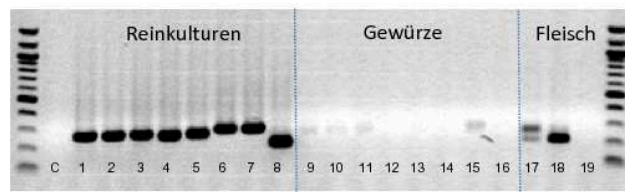
Annealing-Temperatur: 48 °C

**22 U1/U2**

U1 GTGAAATTGTTGAAAGGGAA

U2 GACTCCTTGGTCCGTGT

Annealing-Temperatur: 50 °C



3.2 Primerpaare-Vergleich (33 Pilzarten aus Reinkultur)

Insgesamt wurden sieben Primerpaare (Nr. 1, 7, 8, 9, 10, 13, 22), die in Vorversuchen DNA von acht getesteten Pilzarten gut aber nicht oder nur eingeschränkt pflanzliche- und tierische DNA amplifizierten (siehe Anhang 3.1), mit jeweils 33 Pilz-Spezies aus Reinkultur getestet.

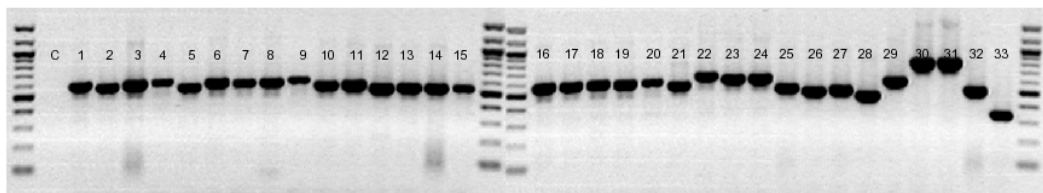
Probe: Pilze aus Reinkulturen

C	Negativ-Kontrolle	11	<i>Aureobasidium pullurans</i>	22	<i>Absidia glauca</i>	} Mucoro- mycotina
1	<i>Acremonium</i> sp.	12	<i>Cladosporium herbarum</i>	23	<i>Mucor spinosus</i>	
2	<i>Alternaria alternata</i>	13	<i>Eurotium amstelodami</i>	24	<i>Rhizopus oryzae</i>	
3	<i>Aspergillus flavus</i>	14	<i>Eurotium rubrum</i>	25	<i>Candida albicans</i>	
4	<i>Aspergillus fumigatus</i>	15	<i>Fusarium</i> sp.	26	<i>Candida krusei</i>	
5	<i>Aspergillus glaucus</i>	16	<i>Penicillium chrysogenum</i>	27	<i>Cryptococcus curvatus</i>	
6	<i>Aspergillus niger</i>	17	<i>Penicillium expansum</i>	28	<i>Pichia membranaefaciens</i>	
7	<i>Aspergillus ochraceus</i>	18	<i>Penicillium nalgiovense</i>	29	<i>Rhodotorula</i> sp.	
8	<i>Aspergillus parasiticus</i>	19	<i>Penicillium roqueforti</i>	30	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
9	<i>Aspergillus terreus</i>	20	<i>Penicillium verrucosum</i>	31	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
10	<i>Aspergillus vesicolor</i>	21	<i>Wallemia sebi</i>	32	<i>Trichosporon gracile</i>	
				33	<i>Yarrowia lipolytica</i>	

Primerpaar Nr.1: ITS1 / ITS4

ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC

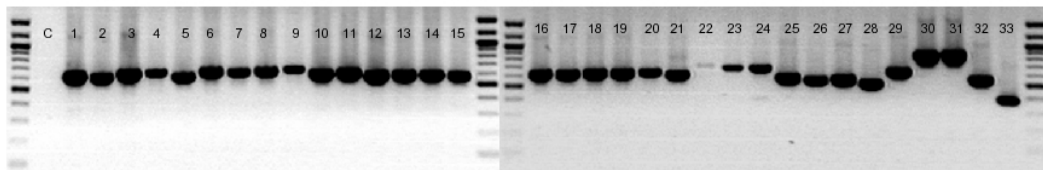
Annealing-Temperatur: 56 °C



Primerpaar Nr.7: ITS1F / ITS4

ITS1F CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA
ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC

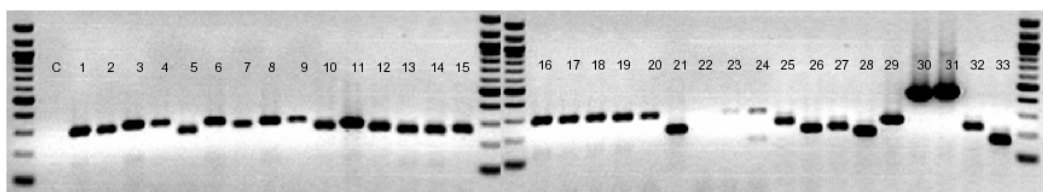
Annealing-Temperatur: 55 °C



Primerpaar Nr.8: ITS1F / ITS2

ITS1F CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA
ITS2 GCTGCGTTCTTCATCGATGC

Annealing-Temperatur: 56 °C

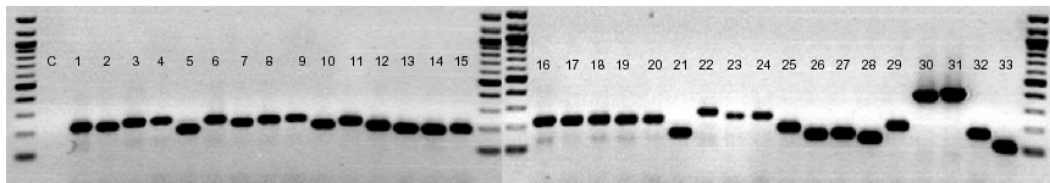


Primerpaar Nr.9: ITS1 / ITS5.8R

ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG

Annealing-Temperatur: 56 °C

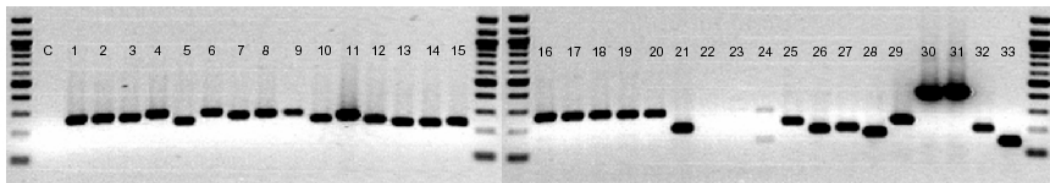
ITS5.8R GAGATCCGTTGTTGAAAGTT

**Primerpaar Nr.10: ITS1F / ITS5.8R**

ITS1F CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA

Annealing-Temperatur: 56 °C

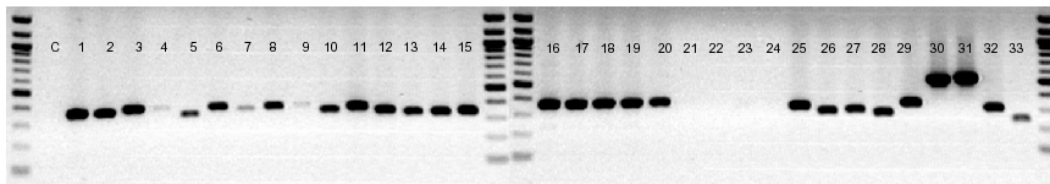
ITS5.8R GAGATCCGTTGTTGAAAGTT

**Primerpaar Nr.13: NS11 / 58A2R**

NS11 GATTGAATGGCTTAGTGAGG

Annealing-Temperatur: 60 °C

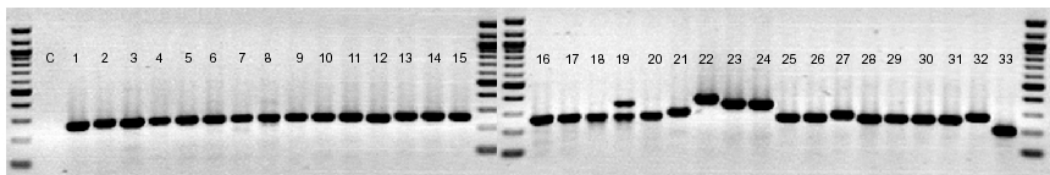
58A2R CTGCGTTCCTTCATCGAT

**Primerpaar Nr.22: U1 / U2**

U1 GTGAAATTGTTGAAAGGGAA

Annealing-Temperatur: 50 °C

U2 GACTCCTTGGTCCGTGTT



4 Optimierung der qPCR-Konditionen

Die Pilz-Spezies, die für alle Tests und Optimierungsschritte als Referenz-Standard diente, war *P. chrysogenum*. Ihre DNA wurde mit dem DNA-Extraktions-Kit „DNeasy Blood and Tissue Kit“ extrahiert und mit dem Primerpaar Nr. 1 (ITS1/ITS4) mittels qPCR amplifiziert. Die Sporen-Anzahl wurde in dieser Phase der Studie noch nicht mit der KBE-Methode bestimmt, sondern unter dem Mikroskop ausgezählt. Deshalb kann die Sporen-Anzahl/ml bei diesen frühen methodischen Untersuchungen nicht mit der Sporen-Anzahl/g Fleisch oder pro ml im Ergebniss-Teil verglichen werden. Die Proben in dieser Phase der Untersuchung dienten nur der Optimierung der qPCR. Das qPCR-Protokoll (hier nicht beschrieben) ist identisch mit der Darstellung im Methoden-Teil (siehe **Tabelle 21** und **Tabelle 22**)

4.1 Annealing-Temperatur

Als erstes Optimierungs-Verfahren für die qPCR diente die Auswahl der Annealing-Temperatur (56 °C vs. 62 °C).

- PCR-Ansatz von 10 µl:
 - 9 µl Mastermix (mit 0,5 µM Primer und 3,0 mM MgCl₂)
 - 1 µl DNA
- qPCR-Kondition: 50 PCR-Zyklen

Annealing-Temperatur	Sporen pro ml / Crossing Point		
	1x10 ⁶	1x10 ⁵	1x10 ⁴
56 °C	26,84	31,55	> 36,0
62 °C	25,80	34,25	36,99

Obwohl die CP-Werte beider Annealing-Temperaturen keine wesentlichen Unterschiede aufwiesen, hatte die Probe bei der Annealing-Temperatur von 62 °C die einheitlichere Schmelzkurve. Deshalb wurde die Annealing-Temperatur von 62 °C für die nächsten Optimierungs-Schritte gewählt.

4.2 Optimierung der Magnesiumchlorid (MgCl₂)-Konzentration

Im zweiten Schritt wurde die MgCl₂-Konzentration (3, 4 und 5 mM) optimiert.

- PCR-Ansatz von 10 µl:
 - 9 µl Mastermix (mit 0,5 µM Primer und 3-5 mM MgCl₂)
 - 1 µl DNA
- qPCR-Kondition: Annealing-Temperatur 62 °C, 50 PCR-Zyklen

MgCl ₂ -Konzentration	Sporen pro ml / Crossing Point		
	1x10 ⁶	1x10 ⁵	1x10 ⁴
3,0 mM	25,80	34,25	36,99
4,0 mM	23,31	29,58	32,12
5,0 mM	22,05	27,45	31,10

Die MgCl₂ Konzentration von 5,0 mM führte zu besseren CP-Werten, weshalb sie für die nächsten Optimierungsschritte gewählt wurde.

4.3 Optimierung der Primer-Konzentration und der DNA-Menge

Der dritte Schritt diente der Optimierung der Primer-Konzentration und der DNA-Menge.

- PCR-Ansatz von 10 µl:
 - 6-9 µl Mastermix (mit 0,5-1,0 µM Primer und 5,0 mM MgCl₂)
 - 1-4 µl DNA
- qPCR-Kondition: Annealing-Temperatur 62 °C, 50 PCR-Zyklen

Primer und DNA	Sporen pro ml / Crossing point		
	1x10 ⁶	1x10 ⁵	1x10 ⁴
1 0,5 µM Primer, 1 µl DNA	22,05	27,45	31,10
2 0,5 µM Primer, 2 µl DNA	21,61	26,45	30,16
3 0,5 µM Primer, 3 µl DNA	20,04	25,80	29,58
4 0,5 µM Primer, 4 µl DNA	19,25	24,57	28,63
5 1,0 µM Primer, 1 µl DNA	23,78	29,97	34,07
6 1,0 µM Primer, 4 µl DNA	18,08	22,64	27,01

Die Probe mit der Primer-Konzentration von 1,0 µM und 4 µl DNA hatte den niedrigsten Crossing Point; auch die Schmelzkurve war stabiler als die der anderen Proben.

Für die weitere Untersuchung wurde folgender qPCR-Ansatz und folgende Konditionen ausgewählt (identisch zu **Tabelle 21** und **Tabelle 22** in Methodenteil).

PCR-Ansatz 10 µl:

- PCR-Ansatz von 10 µl:
 - 6 µl Mastermix mit 1,0 µM Primer und 5,0 mM MgCl₂ (1 mM von SYBR-Green-I-Mastermix und zusätzlich 4 mM MgCl₂)
 - 4 µl DNA
- qPCR-Kondition: Die Annealing-Temperatur war 62 °C. Die PCR-Zyklen wurden von 50 Zyklen auf 40 Zykeln reduziert.

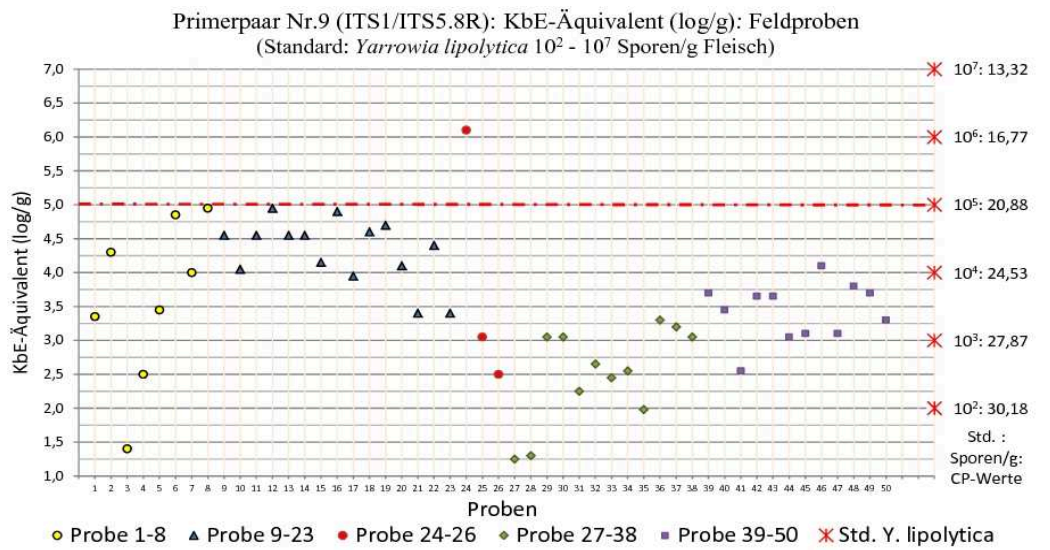
5 Optimierung der DNA-Extraktionen mit Lyticase

Die Literatur empfiehlt unterschiedlich hohe Konzentrationen von Lyticase pro Probe zur DNA-Extraktion (von 10 Units bis 400 Units pro Probe). Deshalb wurde in dieser Studie auch getestet, ob die verwendete Menge von 400 Units/Probe geeignet war. Die Sporen-Anzahl bei diesem Schritt wurde nach der KbE-Methode bestimmt. Eine Verdünnungsreihe von 10¹-10⁶ Sporen/Probe wurden vom DNA-Extraktions-Kit „DNeasy Blood and Tissue Kit“ zusammen mit Glass Bead DNA extrahiert. Alle DNA-Extraktionsbedingungen waren identisch außer der Konzentration von Lyticase pro Probe. PCR-Ansatz und -Konditionen sind identisch wie die optimierten Konditionen im Anhang 4.3 und im Methodenteil (**Tabelle 21** und **Tabelle 22**).

		Sporen pro ml / Crossing point					
Enzym Lyticase		1x10 ⁶	1x10 ⁵	1x10 ⁴	1x10 ³	1x10 ²	1x10 ¹
1	200 Units/Probe	14,44	19,65	23,09	27,88	30,66	31,04
2	400 Units/Probe	12,13	15,65	20,13	23,72	27,36	28,84

Da die CP-Werte der Proben, die mit 400 Units Lyticase/Probe behandelt wurden, viel niedriger waren, also es mehr DNA in den mit 400 Units Lyticase behandelten Proben gab als in den mit 200 Units behandelten Proben, wurde die Lyticase-Konzentration von 400 Units pro Probe ausgewählt.

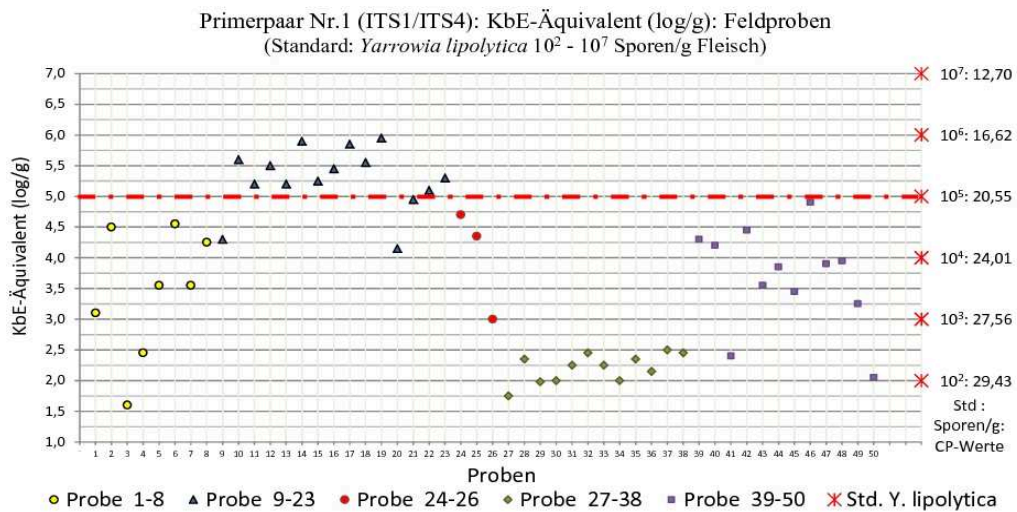
6 KbE-Äquivalent (log/g) der Feldproben (Einzelproben)



--- Orientierungswert der Gesamtkeimzahl von kontaminierenden Pilzen in Fleischprodukten (für diese Studie) = 1x10⁵ KbE/g

Probe	*KbE-Äquivalent (log/g) in der Probe / Anzahl (Prozent)	*KbE-Äquivalent (log/g) in der Probe / Anzahl (Prozent)					Gesamt
		≤10 ²	>10 ² -10 ³	>10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴ -10 ⁵	>10 ⁵ -10 ⁶	
1-2 & 4-8 Frisches Hackfleisch	- 1 (14%) 2 (29%) 4 (57%)	-	1 (14%)	2 (29%)	4 (57%)	-	7
3 Frisches Fleisch (Negativ-Kontrolle)	1 - -	1	-	-	-	-	1
9-23 Fleischprodukte aus Kühlregal	- - 3 (20%) 12 (80%)	-	-	3 (20%)	12 (80%)	-	15
24 Speck (vom Speckknödel)	- - - 1	-	-	-	-	1	1
25-26 Sojasauce	- 1 (50%) 1 (50%)	-	1 (50%)	1 (50%)	-	-	2
27-38 Dosenwurst (aus Supermarkt)	3 (25%) 4 (33%) 5 (42%)	3 (25%)	4 (33%)	5 (42%)	-	-	12
39-50 Dosenwurst (aus Metzgerei)	- 1 (8%) 10 (84%) 1 (8%)	-	1 (8%)	10 (84%)	1 (8%)	-	12
Gesamtproben	4 (8%) 7 (14%) 21 (42%) 17 (34%) 1 (2%)	4 (8%)	7 (14%)	21 (42%)	17 (34%)	1 (2%)	50

* errechnet anhand der Standard-Spezies *Y. lipolytica*



--- Orientierungswert der Gesamtkeimzahl von kontaminierenden Pilzen in Fleischprodukten (für diese Studie) = 1x10⁵ KbE/g

Probe	*KbE-Äquivalent (log/g) in der Probe / Anzahl (Prozent)	*KbE-Äquivalent (log/g) in der Probe / Anzahl (Prozent)					Gesamt
		≤10 ²	>10 ² -10 ³	>10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴ -10 ⁵	>10 ⁵ -10 ⁶	
1-2 & 4-8 Frisches Hackfleisch	- 1 (14%) 3 (43%) 3 (43%)	-	1 (14%)	3 (43%)	3 (43%)	-	7
3 Frisches Fleisch (Negativ-Kontrolle)	1 - -	1	-	-	-	-	1
9-23 Fleischprodukte aus Kühlregal	- - 3 (20%) 12 (80%)	-	-	3 (20%)	12 (80%)	-	15
24 Speck (vom Speckknödel)	- - - 1	-	-	-	1	-	1
25-26 Sojasauce	- - 1 (50%) 1 (50%)	-	-	1 (50%)	1 (50%)	-	2
27-38 Dosenwurst (aus Supermarkt)	4 (33%) 8 (67%)	4 (33%)	8 (67%)	-	-	-	12
39-50 Dosenwurst (aus Metzgerei)	- 2 (17%) 6 (50%) 4 (33%)	-	2 (17%)	6 (50%)	4 (33%)	-	12
Gesamtproben	6 (10%) 11 (22%) 10 (20%) 12 (24%) 12 (24%)	6 (10%)	11 (22%)	10 (20%)	12 (24%)	12 (24%)	50

* errechnet anhand der Standard-Spezies *Y. lipolytica*

Probe	1-8	Rohfleisch	27-38	Dosenwurst (aus Supermarkt)
	9-23	Fleischprodukte aus Kühlschrank	39-50	Dosenwurst (aus Metzgerei)
	24-26	24: Speck; 25&26 Sojasauce		

7 SSCP-Gele der Feldproben

Proben

Pasteurisierte Fleischprodukte: von Supermärkten

9 Leberkäse: Haudek	14 Leberkäse: Vinzenzmurr	19 Bio-Fleischkäse: Rewe-Bio
10 Lyoner: Schmärlze	15 Kalbfleischwurst: Vinzenzmurr	20 Würstchen: Ja!
11 Schinkenwurst: Schmitz	16 Bio-Schinkenwurst fein: Altdorfer	21 Leberkäse: Metzgerfrisch
12 Jagdwurst: Schmitz	17 Leberkäse: Sieber	22 Lyoner: Gebirgsjäger
13 Wiener Gewurschl: Vinzenzmurr	18 Lyoner: Wilhelm Brandenburg	23 Wiener Würstchen: Dulano

Dosenwurst: von Supermärkten

24 Speck Knödel: Pfanni	29 Schinkenwurst: Dietz	34 Jagdwurst: Müller
25 Sojasauce 1*	30 Lyoner: Dietz	35 Jagdwurst: Lutz
26 Sojasauce 2*	31 Lyoner Bio: Rewe	36 Bierwurst: Lutz
27 Eisbeinflfleisch in Aspik: Dreisterne	32 BIO Lyoner: Biolance	37 Bierwurst: Eidmann
28 Eisbeinflfleisch in Aspik: Simon	33 Jagdwurst: Eifel	38 Nürnberger Rostbratwürste*

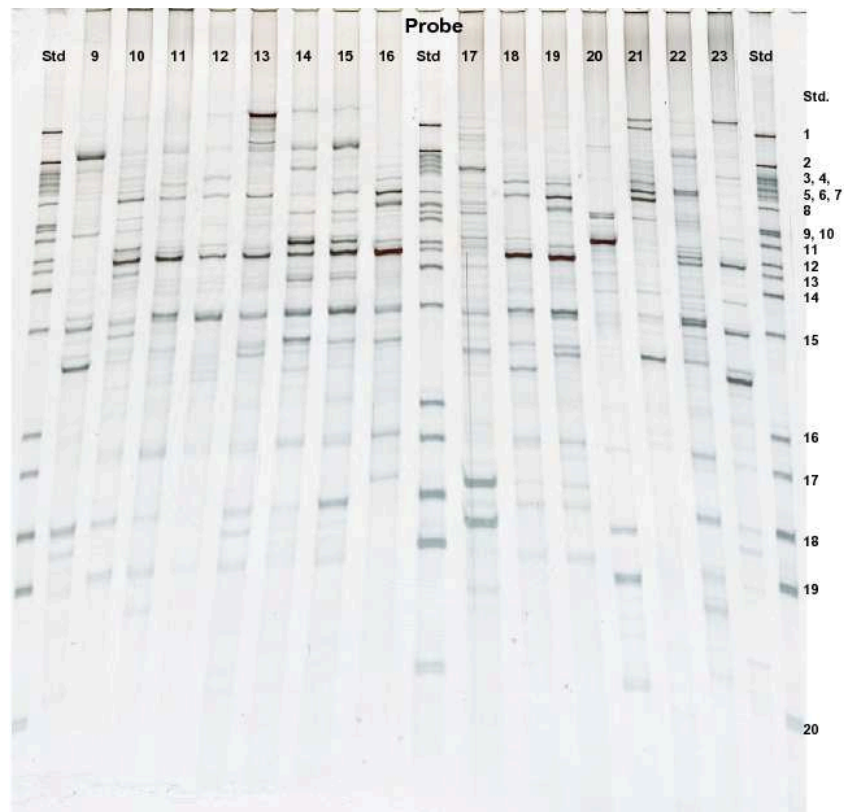
Dosenwurst: von lokalen Metzgereien (Hausmacherkonserven)

39 Rotwurst*	43 Weißer Pressack*	47 Gekochte Mettwurst*
40 Fleischkäse*	44 Leberkäs*	48 Schinken Rotwurst*
41 Schinkenwurst*	45 Hausmacher Leberwurst*	49 Thalheimer Stadtwurst*
42 Bratwurstteig*	46 Bratwurstgehäck*	50 Oma's Bratwurstgehäck*

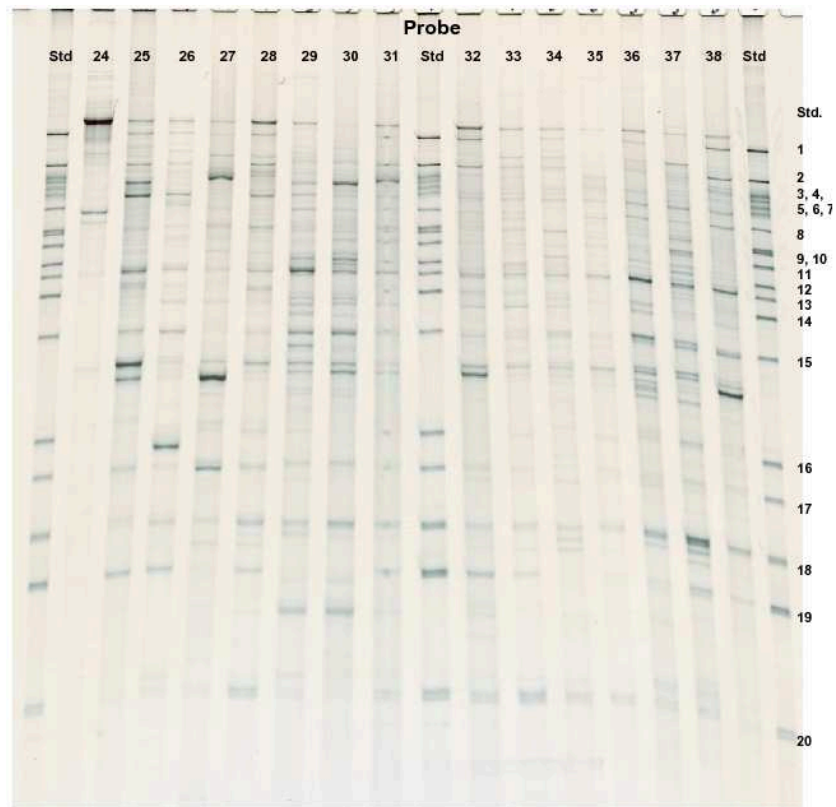
Standard-Spezies

1 <i>S. cerevisiae</i> (DSM 70451)	8 <i>Absidia glauca</i> (1 st Bande)	15 <i>E. rubrum</i>
2 <i>S. cerevisiae</i> (DSM 4531)	9 <i>A. ochraceus</i>	16 <i>Trichosporon gracile</i>
3 <i>A. fumigatus</i>	10 <i>Absidia glauca</i> (2 nd Bande)	17 <i>Cryptococcus Curvatus</i>
4 <i>P. chrysogenum</i>	11 <i>Acremonium</i> sp.	18 <i>Candida krusei</i>
5 <i>A. parasiticus</i>	12 <i>Rhizopus oryzae</i>	19 <i>Pichia membranaefaciens</i>
6 <i>A. flavus</i> ,	13 <i>Alt. Alternata</i>	20 <i>Yarrowia lipolytica</i>
7 <i>Aureobasidium pullurans</i>	14 <i>A. vesicolor</i>	

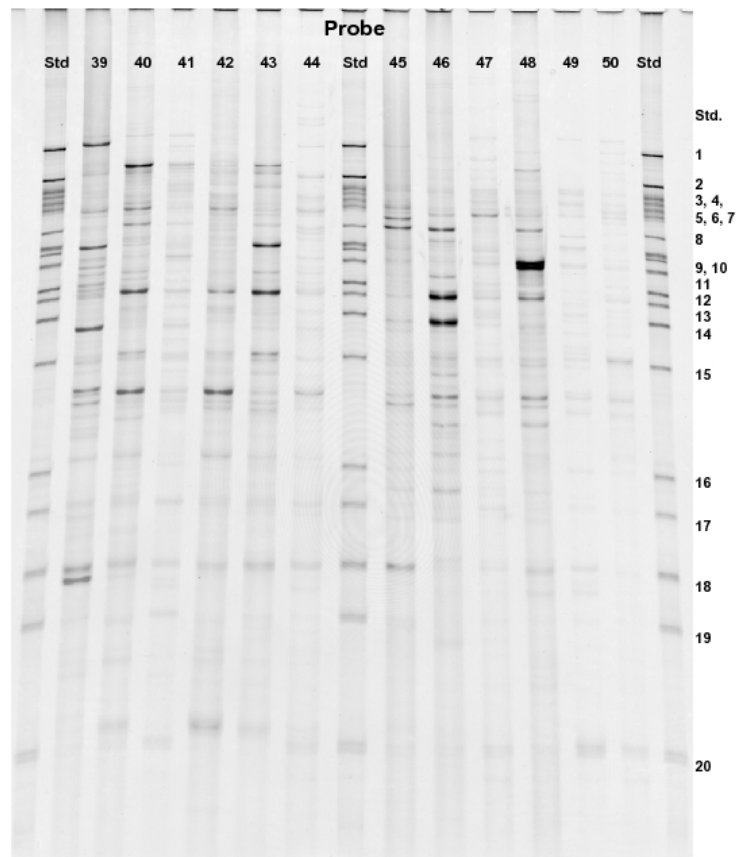
* Hersteller, siehe **Tabelle 15**



PCR-SSCP Ergebnis, Feldproben 9-23



PCR-SSCP Ergebnis, Feldproben 24-38



PCR-SSCP Ergebnis, Feldproben 39-50

X **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Aufbau der ribosomalen DNA (rDNA) von Pilzen	18
Abbildung 2: Primer ITS5.8R und Komplementär-Sequenzen von Pilzen und Pflanzen.....	28
Abbildung 3: Prinzip der PCR-SSCP-Analyse	43
Abbildung 4: DNA-Konzentration (ng/µl), gemessen mit NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer: Vergleich zwischen 4 Kits und 3 Probengewichten (Primerpaar Nr. 1, ITS1/ITS4)	56
Abbildung 5: SSCP-Ergebnis von Hackfleischproben (50 mg, nicht künstlich kontaminiert) nach Anwendung unterschiedlicher DNA-Extraktions-Kits	56
Abbildung 6: SSCP-Ergebnisse von künstlich mit Pilz-Sporen kontaminierten Hackfleischproben nach Anwendung unterschiedlicher DNA-Extraktions-Kits	57
Abbildung 7: Überprüfung der PCR-Produkte der Primerpaare Nr. 1, 8, 9 und 17 im Agarosegel. Proben: Pilze, Gewürze und Fleisch.....	58
Abbildung 8: Trennung von DNA-Amplifikaten verschiedener Pilzarten im SSCP-Gel. PCR-Produkte Primerpaar Nr. 22 (U1/U2)	61
Abbildung 9: Trennung der Pilz-DNA im SSCP-Gel. PCR-Produkte aus dem DNA-Abschnitt ITS (Primerpaar Nr. 9).....	62
Abbildung 10: qPCR: Anzahl der Zyklen bis zum Crossing-Point: Standard-Spezies <i>P. chrysogenum</i> und <i>Y. lipolytica</i> : ohne und mit Fleischmatrix.....	64
Abbildung 11: Einfluss der Konzentration von <i>P. chrysogenum</i> -Sporen auf den CP-Wert (Anzahl PCR-Zyklen): Vergleich von 4 Primerpaaren.....	66
Abbildung 12: Einfluss der Konzentration von <i>Y. lipolytica</i> -Sporen auf den CP-Wert (Anzahl PCR-Zyklen): Vergleich von 4 Primerpaaren.....	66
Abbildung 13: qPCR-Nachweis von <i>P. chrysogenum</i> und <i>Y. lipolytica</i> mit Primerpaar Nr. 1 (ITS1/ITS4): Verlauf der Fluoreszenz- und Schmelzkurve.....	67
Abbildung 14: qPCR-Nachweis von <i>P. chrysogenum</i> und <i>Y. lipolytica</i> mit Primerpaar Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R): Verlauf der Fluoreszenz- und Schmelzkurve.....	67

Abbildung 15: qPCR-Analyse von Gewürzen mit den Primerpaaren Nr. 1 (ITS1/ITS4) und Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R); Quantifizierungs- Standard: <i>Y. lipolytica</i>	68
Abbildung 16: qPCR-Ergebnisse, Vergleich der KbE-Äquivalente (log/g) nach unterschiedlicher Probenvorbereitung (Fleisch vs. Fleischsuspension); Primerpaar Nr. 1: ITS1/ITS4	69
Abbildung 17: qPCR-Ergebnisse, Vergleich der KbE-Äquivalente (log/g) nach unterschiedlicher Probenvorbereitung (Fleisch vs. Fleischsuspension); Primerpaar Nr. 9: ITS1/ITS5.8R.....	70
Abbildung 18: PCR-SSCP-Bandenprofile von Amplifikaten aus 4 Fleischproben: Vergleich der Primerpaare Nr. 1 (ITS1/ITS4), Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R) und der Annealing Temperaturen 56 und 62 Grad Celsius.....	71
Abbildung 19: Vergleich der PCR- (A) und SSCP-Ergebnisse (B) nach unterschiedlicher Probenvorbereitung (Fleisch vs. Fleischsuspension); Primerpaar Nr. 1: ITS1/ITS4	73
Abbildung 20: Vergleich der PCR- (A) und SSCP-Ergebnisse (B) nach unterschiedlicher Probenvorbereitung (Fleisch vs. Fleischsuspension); Primerpaar Nr. 9: ITS1/ITS5.8R.....	74
Abbildung 21: Vergleichende Darstellung der kulturell ermittelten und der aus den PCR-Ergebnissen errechneten KBE-Werte (log/g) nach unterschiedlicher Probenvorbereitung (Fleisch vs. Fleischsuspension); Primerpaar Nr. 1: ITS1/ITS4	75
Abbildung 22: Vergleichende Darstellung der kulturell ermittelten und der aus den PCR-Ergebnissen errechneten KBE-Werte (log/g) nach unterschiedlicher Probenvorbereitung (Fleisch vs. Fleischsuspension); Primerpaar Nr. 9: ITS1/ITS5.8R.....	75
Abbildung 23: Vergleich der CP-Werte von Amplifikaten naiver und hitzebehandelter <i>P. chrysogenum</i> -Sporen definierter Konzentration in bestrahlten Fleischproben; Primerpaar Nr. 1, ITS1/ITS4	77
Abbildung 24: Vergleich der CP-Werte von Amplifikaten naiver und hitzebehandelter <i>Y. lipolytica</i> -Sporen definierter Konzentrationen in bestrahlten Fleischproben; Primerpaar Nr. 9, ITS1/ITS5.8R.....	78

Abbildung 25: KbE-Äquivalent-Werte (log/g) von Fleischproben nach Anwendung des Primerpaars Nr. 1 (ITS1/ITS4): Vergleich zwischen frischen, erhitzten, verdorbenen und verdorbenen und erhitzten Fleischproben 1-8 (Quantifizierungs-Standard: <i>Y. lipolytica</i>)	79
Abbildung 26: KbE-Äquivalent-Werte (log/g) von Fleischproben nach Anwendung des Primerpaars Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R): Vergleich zwischen frischen, erhitzten, verdorbenen und verdorbenen und erhitzten Fleischproben 1-8 (Quantifizierungs-Standard: <i>Y. lipolytica</i>)	80
Abbildung 27: PCR-SSCP Ergebnis: Vergleich zwischen frischen und erhitzten Fleischproben 1-8 nach Anwendung der Primerpaare 1 und 9	81
Abbildung 28: PCR-SSCP Ergebnis nach Anwendung der Primerpaare 1 und 9: Vergleich zwischen frischen und verdorbenen Fleischproben 5-8, jeweils vor und nach Erhitzung	82
Abbildung 29: KbE-Äquivalent-Werte (log/g) der Produkte (Gruppen): Feldproben Nr. 1-50: Errechnet nach Standard-Spezies <i>Y. lipolytica</i> , Primer Nr. 9 (ITS1/ITS5.8R)	84
Abbildung 30: KbE-Äquivalent-Werte (log/g) der Produkte (Gruppen): Feldproben Nr. 1-50: Errechnet nach Standard-Spezies <i>Y. lipolytica</i> , Primer Nr. 1 (ITS1/ITS4)	84
Abbildung 31: PCR-SSCP Ergebnisse nach Normalisierung mit der Software GelCompar [®] -II: DNA-Banden von Feldproben und von Standard-Spezies	86
Abbildung 32: PCR-SSCP-Ergebnisse ausgewählter Produkte; die links neben den Laufspuren angebrachten Zahlen markieren die zur Sequenzierung aus dem SSCP-Gel ausgeschnittenen DNA-Banden (Spezies-Identifikation, siehe Tabelle 29)	88

XI TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Schimmelpilz-Spezies in Fleisch und Fleischwaren.....	3
Tabelle 2: Hefe-Spezies in Fleisch und Fleischwaren.....	5
Tabelle 3: Kontaminationsquellen für Pilze in Fleischwaren	9
Tabelle 4: Mykotoxine produzierende Pilzarten der Gattungen <i>Aspergillus</i> und <i>Penicillium</i>	11
Tabelle 5: Richtwerte für die Belastung von Fleischprodukten mit Hefen.....	13
Tabelle 6: Verzeichnis der verwendeten technischen Geräte	19
Tabelle 7: Verzeichnis der verwendeten Chemikalien.....	20
Tabelle 8: Verzeichnis der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	22
Tabelle 9: Zusammensetzung der verwendeten Gebrauchslösungen.....	23
Tabelle 10: Sequenzen, Amplicongrößen und Annealing-Temperaturen der verwendeten Primerpaare.....	24
Tabelle 11: Literaturquellen und Amplifikationsregionen der verwendeten Primerpaare	26
Tabelle 12: Zur Validierung der Labormethode verwendete Pilz-Spezies	29
Tabelle 13: Zur Validierung der Labormethode verwendete Gewürze	30
Tabelle 14: Überblick über Behandlungen und Untersuchungen der Proben.....	31
Tabelle 15: Untersuchte Proben	32
Tabelle 16: Verdünnungsreihe von Fleischsuspension	34
Tabelle 17: Verdünnungsreihe aus Reinkultur zur KbE-Bestimmung	35
Tabelle 18: Sporenanzahl pro Verdünnungsreihe und pro 50 mg Fleisch.....	37
Tabelle 19: Ansatz für den PCR-Mastermix	42
Tabelle 20: PCR-Protokoll zur Amplifizierung eines Pilz-DNA-Fragments	42
Tabelle 21: Ansatz für den qPCR-Mastermix	53
Tabelle 22: qPCR -Protokoll zur Amplifizierung eines Pilz-DNA-Fragments	53
Tabelle 23: Konversion von CP-Werten in KbE/g bzw. \log_{10} KbE/g Fleisch für die Standard-Spezies <i>Y. lipolytica</i>	54
Tabelle 24: Korrelation zwischen $\Delta \log_{10}$ KbE/g und der Anzahl der PCR-Zyklen (nach Tabelle 23)	54
Tabelle 25: Primer-Vergleich: Ergebnisse der PCR-Amplifikation im Agarosegel; Proben: Pilze, Gewürze und Fleisch	59

Tabelle 26: Ergebnis der Darstellung von PCR-Amplifikaten ausgewählter Primerpaare im Agarosegel.....	60
Tabelle 27: Korrelation zwischen den kulturell ermittelten- und nach qPCR- errechneten Keimzahlen.....	76
Tabelle 28: Gruppen von getesteten Produkten	83
Tabelle 29: Sequenzierungsergebnisse der Amplifikate von Primerpaar Nr. 9 aus Feldproben	89
Tabelle 30: Zuordnung der DNA-Banden aus SSCP-Analysen von Feldproben zur Laufweite der Referenz-Pilz-Spezies und der sequenzierten Banden; Auswertung mit GelCompar [®] -II.....	91
Tabelle 31: Zuordnung bedeutender DNA-Banden aus SSCP-Analysen von Feldproben mittels GelCompar [®] -II-Auswertung	92
Tabelle 32: Prävalenz bedeutender DNA-Banden in PCR-SSCP-Analysen von Lebensmitteln tierischen Ursprungs (nach Tabelle 31)	93
Tabelle 33: ITS-Sequenzen von Pilz-Spezies und Pflanzen	141

DANKSAGUNG

Dem Mentor dieser Arbeit, Prof. Dr. Dr. h.c. Johann Bauer vom Lehrstuhl für Tierhygiene der Technischen Universität München, danke ich, dass er mir die Anfertigung dieser Arbeit in seinem Institut ermöglicht hat. Ich danke ihm für das entgegengebrachte Vertrauen, die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung, u. a. durch die Einstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter.

Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die Übernahme dieser Arbeit.

Dr. Christina Hölzel vom Lehrstuhl für Tierhygiene der Technischen Universität München danke ich für die konstruktive, aber auch kritische Betreuung beim experimentellen und schriftlichen Teil der Arbeit. Ihre hohen Maßstäbe waren mir stets ein motivierendes Vorbild.

Ich danke Dr. Karin Schwaiger, die diese Arbeit mit Interesse verfolgt und mit konstruktiver Kritik begleitet und unterstützt hat, Dr. Katrin Harms danke ich für die Hilfe bei der Korrektur des Manuskripts.

Tobias Janke danke ich für die Einarbeitung in die Methoden und seine jederzeit verfügbare kollegiale Hilfe. Ihm und den Kollegen in Labor und Sekretariat danke ich für die freundliche Aufnahme, ihre Unterstützung und die angenehme Atmosphäre.

Jürgen Schäfer danke ich für die sprachliche Überarbeitung des Manuskripts.

Meinen Eltern und meinen zehn älteren Geschwistern in Thailand danke ich, dass sie mir den Besuch des Gymnasiums und das Studium der Veterinärmedizin ermöglicht haben.