

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie der
Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. E. Märtlbauer)
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig – Maximilians – Universität München

angefertigt am
Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Max Rubner - Institut,
Standort Kulmbach
(Dir. u. Prof. PD Dr. Dr. habil. M. Gareis)

„Untersuchungen zum Vorkommen und zur Toxizität von *Bacillus cereus*
in Gewürzen“

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

von Antje Hammon
aus Bernau

München 2008

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Märtlbauer
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Pfister

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

*Meinen Eltern
und
Stefan*

1. Einleitung	1
2. Schrifttum	3
2.1 Gewürze	3
2.1.1 Begriffsbestimmung	3
2.1.2 Gewürzveredelung	5
2.1.3 Mikrobiologischer Status von Gewürzen	8
2.2 Spezies <i>Bacillus cereus</i>	13
2.2.1 Taxonomie	13
2.2.2 Allgemeine Eigenschaften	14
2.3 Vorkommen von <i>B. cereus</i> in Lebensmitteln	16
2.4 Human- und veterinärmedizinische Bedeutung von <i>B. cereus</i>	18
2.4.1 Humanmedizinische Bedeutung	18
2.4.2 Veterinärmedizinische Bedeutung	19
2.5 <i>B. cereus</i> – Toxine	20
2.5.1 Hämolysin BL (HBL)	21
2.5.2 Non-Hemolytic Enterotoxin (Nhe)	23
2.5.3 Cytotoxin K (Cyt K)	24
2.5.4 <i>Bacillus cereus</i> Enterotoxin T (BcET)	24
2.5.5 Enterotoxin FM (EntFM)	25
2.5.6 Cereulid	26
2.6 <i>B. cereus</i> – Nachweisverfahren	28
2.6.1 Speziesnachweis	28
2.6.1.1 Kulturelle Verfahren	28
2.6.1.2 Molekularbiologischer Nachweis (Polymerasekettenreaktion)	30
2.6.2 Nachweis der Toxinogenität	31
2.6.3 Toxinnachweis	32

2.6.3.1	Biologische Nachweismethoden	32
2.6.3.2	Immunochemische Nachweismethoden	34
3.	Eigene Untersuchungen	35
3.1	Material	35
3.1.1	Probenmaterial	35
3.1.2	<i>Bacillus cereus</i> Isolate	36
3.1.3	Referenzstämme	36
3.1.4	Zelllinien	36
3.1.5	Materialien und Geräte für kulturelle Verfahren	36
3.1.5.1	Nährmedien	36
3.1.5.2	Chemikalien und Geräte	38
3.1.6	Materialien und Geräte für genotypische Verfahren (PCR und Real-Time PCR)	38
3.1.7	Materialien und Geräte für Immunoassays	41
3.1.7.1	ELISA	41
3.1.7.2	Reverse Passive Latex Agglutination	41
3.1.8	Materialien und Geräte für den MTS-Zellkulturtest	42
3.1.9	Materialien und Geräte für die mikrobiologische Untersuchung mariner Fleischzubereitungen	43
3.1.9.1	Probenmaterial	43
3.1.9.2	Nährmedien	44
3.1.9.3	Chemikalien und Geräte	44
3.2	Methodik	45
3.2.1	Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl	47
3.2.2	Bestimmung der Anzahl der <i>Enterobacteriaceae</i>	48
3.2.3	Bestimmung präsumtiver <i>B. cereus</i>	48
3.2.3.1	Nach Methode L.00.0025 der amtlichen Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB	48
3.2.3.2	Nach selektiver Anreicherung im MPN-Verfahren (Most Probable Number)	49

3.2.3.3	Nach selektiver Anreicherung mittels Real-Time PCR	50
3.2.3.3.1	Anreicherung	50
3.2.3.3.2	Sporen-Lyse und DNA-Extraktion	51
3.2.3.3.3	Durchführung der Real-Time PCR	51
3.2.4	Bestätigung präsumtiver <i>B. cereus</i> Isolate	53
3.2.4.1	Biochemische Bestätigung (Hämolyseverhalten)	53
3.2.4.2	Molekularbiologische Bestätigung (PCR)	54
3.2.4.2.1	DNA-Extraktion	54
3.2.4.2.2	Durchführung der PCR	55
3.2.4.3	Differenzierung zwischen <i>B. cereus</i> und <i>B. thuringiensis</i>	57
3.2.5	Charakterisierung des Toxinbildungsvermögens	59
3.2.5.1	Diarrhöische Form	59
3.2.5.1.1	PCR	59
3.2.5.1.1.1	Nachweis des <i>hblA</i> -Gens	60
3.2.5.1.1.2	Nachweis des <i>hblC</i> -Gens	61
3.2.5.1.1.3	Nachweis des <i>hblD</i> -Gens	62
3.2.5.1.1.4	Nachweis des <i>nheA</i> -Gens	63
3.2.5.1.1.5	Nachweis des <i>nheB</i> - und <i>nheC</i> -Gens	64
3.2.5.1.2	Immunoassays (ELISA, RPLA)	65
3.2.5.2	Emetische Form	67
3.2.5.2.1	Stärkehydrolysetest	67
3.2.5.2.2	PCR	67
3.2.5.2.3	HEp2 / MTS-Zellkulturtest	69
3.2.6	Mikrobiologische Untersuchung mariniertes Fleischzubereitungen	71
3.2.6.1	Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl	71
3.2.6.2	Bestimmung der Anzahl präsumtiver <i>B. cereus</i>	71
4.	Ergebnisse	72
4.1	Mikrobiologischer Status der Gewürze	72
4.1.1	Aerobe Gesamtkeimzahl	72
4.1.2	Anzahl der <i>Enterobacteriaceae</i>	74
4.1.3	Anzahl präsumtiver <i>B. cereus</i>	76

4.2	Bestätigung und Isolierung präsumtiver <i>B. cereus</i> und <i>B. thuringiensis</i>	81
4.2.1	Vorkommen von <i>B. cereus</i>	81
4.2.2	Vorkommen von <i>B. thuringiensis</i>	83
4.3	Diarrhöisches Toxinbildungsvermögen der <i>B. cereus</i> Isolate	84
4.3.1	Toxinogenität der Isolate	84
4.3.1.1	Codierende Gene des <i>hbl</i> -Operons	84
4.3.1.2	Codierende Gene des <i>nhe</i> -Operons	88
4.3.2	Toxinexpression der Isolate	91
4.3.2.1	ELISA	91
4.3.2.2	Reverse Passive Latex Agglutination	94
4.3.3	Verhältnis reiner <i>Nhe</i> -Produzenten zu <i>HBL</i> -/ und <i>Nhe</i> -Produzenten	97
4.3.4	Vergleich der Ergebnisse: Toxinogenität – Toxinproduktion	97
4.4	Emetisches Toxinbildungsvermögen der <i>B. cereus</i> Isolate	98
4.4.1	Stärkehydrolysetest	98
4.4.2	Nachweis der Toxinogenität	98
4.4.3	Nachweis der Zytotoxizität	99
4.4.4	Vergleich der Ergebnisse: Toxinogenität – Zytotoxizität	100
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	102
4.5.1	Mikrobiologischer Status der untersuchten Gewürze	102
4.5.2	Relatives Toxinbildungsvermögen der <i>B. cereus</i> Isolate	105
4.6	Mikrobiologische Untersuchung mariniertes Fleischzubereitungen	108
4.6.1	Einzelhandelsproben	109
4.6.1.1	Aerobe Gesamtkeimzahl	109
4.6.1.2	Anzahl präsumtiver <i>B. cereus</i>	110
4.6.2	Proben aus eigener Herstellung	111
4.6.2.1	Aerobe Gesamtkeimzahl	111
4.6.2.2	Anzahl präsumtiver <i>B. cereus</i>	112

5. Diskussion	113
5.1 Mikrobiologischer Status der untersuchten Gewürze	114
5.2 Etablierung einer Real-Time PCR als Alternative zum konventionellen MPN-Verfahren	120
5.3 Relatives Toxinbildungsvermögen der <i>B. cereus</i> Isolate	121
5.4 Gewürze als mögliche Eintragsquelle für <i>B. cereus</i> in Lebensmittel	125
6. Zusammenfassung	129
7. Summary	131
8. Literaturverzeichnis	133
Anhang	147

Abkürzungsverzeichnis

Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
ATCC	American Type Culture Collection
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BDE	<i>Bacillus</i> Diarrhoeal Enterotoxin
BHI	Brain-Heart-Infusion (Hirn-Herz-Bouillon)
bp	Basenpaare
Cl.	<i>Clostridium</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GKZ	Gesamtkeimzahl
g	Gramm
<i>g</i>	Zentripetalbeschleunigung
h	Stunde
HBL	Hämolyisin BL
KbE/g	Koloniebildende Einheiten je Gramm Probe
kDa	Kilodalton
kGy	Kilogray
LB	Luria Bertani
LBB	Luria Bertani - Bouillon
ml	Milliliter
MLT	Mäuseletalitätstest
MPN	Most Probable Number
MTS	Tetrazoliumsalz
NCTC	National Collection of Type Cultures
NHE	Non-Hemolytic Enterotoxin
NRPS	Nicht-ribosomale Peptidsynthetase
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
Pfeffer, sw.	Pfeffer, schwarz
Pfeffer, w.	Pfeffer, weiß
RIL	Rabbit Ileal Loop (Darmschlingen-Ligationstest)
RPLA	Reverse Passive Latex Agglutination
SMM	Skim milk-Medium (Magermilchmedium)
TSPB	Trypton-Soja-Polymyxin-Bouillon
V	Volt
VPR	Vascular Permeability Reaction (Gefäßpermeabilitäts-Reaktion)

1. Einleitung

Bacillus cereus, ein ubiquitärer Sporenbildner, wird in einer Vielzahl von Lebensmitteln nachgewiesen. Aufgrund seiner ausgeprägten proteolytischen Eigenschaften zählt er zu den wichtigsten Verursachern von Qualitätsminderung und Verderb bei Lebensmitteln (Heyndrickx und Scheldeman, 2002). Daneben wächst die Bedeutung Toxin-bildender Stämme von *B. cereus* als Verursacher Lebensmittel-assoziiierter Erkrankungen, die beim Menschen zwei Formen einer gastrointestinalen Erkrankung induzieren können: das diarrhöeische und das emetische Syndrom (Granum, 2001).

Bei der durch Enterotoxine ausgelösten Diarrhöe-Form, kommt es nach einer Inkubationszeit von 8-16 Stunden zu profusem Durchfall, Abdominalkrämpfen und gelegentlich zu Übelkeit, wobei das Krankheitsgeschehen in der Regel selbstlimitierend ist (Granum, 1997). Die ursächlichen Pathogenitätsfaktoren der Diarrhoe-Form sind hitzelabile, trypsin-empfindliche Enterotoxine bzw. Enterotoxinkomplexe. Derzeit werden diesbezüglich fünf verschiedene Toxine diskutiert. Als gesichert gilt die enterotoxische Wirkung für die Toxine Hämolyisin BL (HBL), Non-Hemolytic Enterotoxin (Nhe) und Cytotoxin K (Cyt K) (Lund et al., 2000; Lund und Granum, 1996). Man geht heute davon aus, dass die Enterotoxine erst im Darm nach Verzehr mit *B. cereus* kontaminierter Lebensmittel gebildet werden (Schoeni und Wong, 2005).

Hingegen wird die emetische Form durch ein hitzestabiles Toxin (Cereulid) ausgelöst, welches präformiert im Lebensmittel vorliegt (Agata et al., 1995b). Bei dieser Lebensmittelintoxikation treten nach einer Inkubationszeit von 0,5 bis 6 Stunden als Leitsymptome Vomitus und Nausea auf, wobei die Krankheitsdauer meist nicht mehr als 24 Stunden beträgt (Ehling-Schlz et al., 2004b). Im Allgemeinen verläuft dieses Krankheitsgeschehen mild und ist ebenfalls selbstlimitierend, jedoch sind auch dramatisch verlaufende Fälle mit letalem Ausgang publiziert (Dierick et al., 2005).

Der Eintrag von *B. cereus* in die Nahrungsmittelkette erfolgt meist über eine Kontamination mit Erdboden oder Staub, die das primäre Reservoir des Erregers darstellen (Giffel et al., 1995; Guinebretiere und Nguyen-The, 2003; Krämer, 2003). In komplexen Lebensmitteln werden unterdessen vielfach Gewürze als Vektor für *B.*

cereus - Kontaminationen angesehen (EFSA, 2004; ICMSF, 2005). Jedoch sind aktuelle Studien über Gewürze als mögliche Eintragsquelle für *B. cereus* in Lebensmittel nicht publiziert. Auch liegen nur wenig aktuelle Daten aus dem europäischen Raum über die tatsächliche Belastung von Gewürzen mit diesem Erreger vor.

Vor diesem Hintergrund sollten das Vorkommen und die Toxizität von *B. cereus* in Gewürzen analysiert werden, um eine aktuelle Übersicht über die Kontamination mit diesem Erreger für eine Bewertung der mikrobiologischen Sicherheit von Gewürzen zu gewinnen. Hierfür wurden zunächst die mikrobiologische Gesamtbelastung sowie die Kontamination mit *Enterobacteriaceae* und *B. cereus* verschiedener Gewürze analysiert. Zudem wurde ein Real-Time PCR Assay für einen schnellen und zuverlässigen *B. cereus* Nachweis in Gewürzproben, als Alternative zu zeitaufwendigen und diagnostisch ungenauen konventionellen Kulturverfahren (MPN- Methode) erarbeitet. Zur Einschätzung des Gefahrenpotentials von *B. cereus* Isolaten, die aus den Gewürzproben gewonnen wurden, wurde deren Toxinprofil charakterisiert.

Ergänzend wurde im Challenge-Test mit marinierten Fleischerzeugnissen untersucht, inwieweit eine Kontamination von Lebensmitteln mit *B. cereus* tatsächlich aus der Verwendung von Gewürzen resultiert.

2. Schrifttum

2.1 Gewürze

2.1.1 Begriffsbestimmung

Gewürze, Kräuter und pflanzliche Würzmittel werden aufgrund ihres typischen Geschmacks, ihrer Farbe und Aromen geschätzt (Schweiggert et al., 2007). So sind Gewürze gemäß Definition der Leitsätze für Gewürze und andere würzende Zutaten (Deutsches Lebensmittelbuch, 1998) Pflanzenteile, die wegen ihres Gehaltes an natürlichen Inhaltsstoffen als geschmack- und / oder geruchgebende Zutaten zu Lebensmitteln bestimmt sind. Darüber hinaus werden Gewürze auch aufgrund ihrer antimikrobiellen Eigenschaften zur Haltbarmachung von Lebensmitteln verwendet (Fabio et al., 2003; Subbulakshmi und Naik, 2002).

Zu den Gewürzen zählen Blüten, Früchte, Knospen, Samen, Rinden, Wurzeln, Wurzelstöcke sowie Zwiebeln oder Teile davon, meist in getrockneter Form. Kräuter hingegen sind frische oder getrocknete Blätter, Sprosse oder Teile davon (Deutsches Lebensmittelbuch, 1998). Nach Art der Pflanzen oder Pflanzenteile, aus denen die Gewürze gewonnen werden, kann nachstehende Einteilung der Gewürze in Gruppen vorgenommen werden (Tab. 1) (Gerhardt, 1994):

Tab. 1: Einteilung der Gewürze nach Art des Rohmaterials (Pflanzen / Pflanzenteile), aus denen sie gewonnen werden (Gerhardt, 1994).

Gruppenbezeichnung	Lateinische Bezeichnung	Beispiele
1. Samen und Früchte	<i>Semina, Fructus</i>	Muskatnuß, Paprika, Pfeffer, Senf
2. Kräuter und Blätter	<i>Herba, Folia</i>	Basilikum, Lorbeer, Majoran, Rosmarin
3. Wurzeln und Wurzelstöcke	<i>Radices, Rhizomata</i>	Curcuma, Ingwer
4. Blüten und -teile	<i>Flores</i>	Kümmel, Koriander, Gewürznelken, Safran
5. Zwiebeln	<i>Bulbi</i>	Knoblauch, Zwiebel
6. Rinden	<i>Cortices</i>	Zimt

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Gewürze anhand ihrer Beschaffenheitsmerkmale gemäß den Leitsätzen für Gewürze und andere würzende Zutaten (Deutsches Lebensmittelbuch, 1998) näher dargestellt:

Als Basilikum bezeichnet man die getrockneten, gerebelten Kelch- und Laubblätter, gelegentlich mit Blüten- und Fruchtteilen von *Ocimum basilicum L.* aus der Familie der Lippenblütler.

Curry ist eine gemahlene Mischung eigener Art aus Kurkuma, die gleichzeitig farbgebend wirkt, zusammen mit anderen Gewürzen wie Cumin, Fenchel und Koriander sowie Pfeffer, Paprika, Chilies, Ingwer, Kardamom, Macis, Nelken oder Piment.

Als Ingwer bezeichnet man den getrockneten, ungeschälten, teilweise oder ganz geschälten, auch gekalkten Wurzelstock von *Zingiber officinale Roscoe* aus der Familie der Ingwergewächse.

Die Hauptzwiebel und die Nebenzwiebeln („Zehen“) von *Allium sativum L.* aus der Familie der Liliengewächse werden als Knoblauch charakterisiert. Knoblauchpulver und -granulat werden aus getrocknetem Knoblauch hergestellt.

Unter der Bezeichnung Koriander sind die getrockneten, gelben bis braunen, runden Früchte von *Coriandrum sativum L.* aus der Familie der Doldengewächse im Handel erhältlich.

Als Kümmel werden die in die Teilfrüchte zerfallenen, getrockneten Früchte von *Carum carvi L.* aus der Familie der Doldengewächse bezeichnet.

Majoran besteht aus den getrockneten, gerebelten Laubblättern und Blütenständen von *Origanum majorana L.* aus der Familie der Lippenblütler.

Die reifen, getrockneten Früchte verschiedener Unterarten von *Capsicum var. Annuum* und anderer Capsicum-Arten aus der Familie der Nachtschattengewächse werden als Paprika bezeichnet.

Als schwarzer Pfeffer werden die noch nicht völlig reif geernteten, getrockneten Früchte von *Piper nigrum* L. aus der Familie der Pfeffergewächse bestimmt. Sie riechen aromatisch würzig und schmecken kräftig scharf. Als weißer Pfeffer werden hingegen die getrockneten, von der äußeren Fruchtwand befreiten Früchte von *Piper nigrum* charakterisiert. Sie riechen ebenfalls aromatisch würzig, schmecken jedoch milder als schwarzer Pfeffer.

Die während und nach der Blütezeit geernteten, getrockneten Laubblätter von *Rosmarinus officinalis* L. aus der Familie der Lippenblütler werden als Rosmarin bezeichnet.

2.1.2 Gewürzveredelung

Gewürze werden aus einer Vielzahl verschiedener Pflanzenteile, wie z. B. Wurzeln, Blätter und Blüten, hergestellt. Aufgrund dieser Heterogenität des Rohmaterials differieren die Herstellungsmethoden und bedürfen einer individuellen Fachkenntnis (Schweiggert et al., 2007).

Als Naturprodukte, die in ihrer Qualität von Ernte zu Ernte variieren können, unterliegen die Rohstoffe vor einer Weiterarbeitung zunächst einer Qualitätsprüfung (Fachverband der Gewürzindustrie, 2007). In der Herstellung qualitativ hochwertiger Gewürze, sind sowohl die Anbauverfahren und der Erntezeitpunkt des Rohmaterials als auch andere Faktoren, wie z. B. die Wetterbedingungen bedeutende Parameter (Schweiggert et al., 2007). So sind die Bearbeitung und Veredelung die eigentlichen Aufgaben der Gewürzindustrie. Das heißt, aus dem Rohstoff Gewürz ist ein Produkt herzustellen, das „zum Verzehr“ geeignet ist. In der Abbildung 1 sind schematisch die Grundschritte der Gewürzveredelung dargestellt.

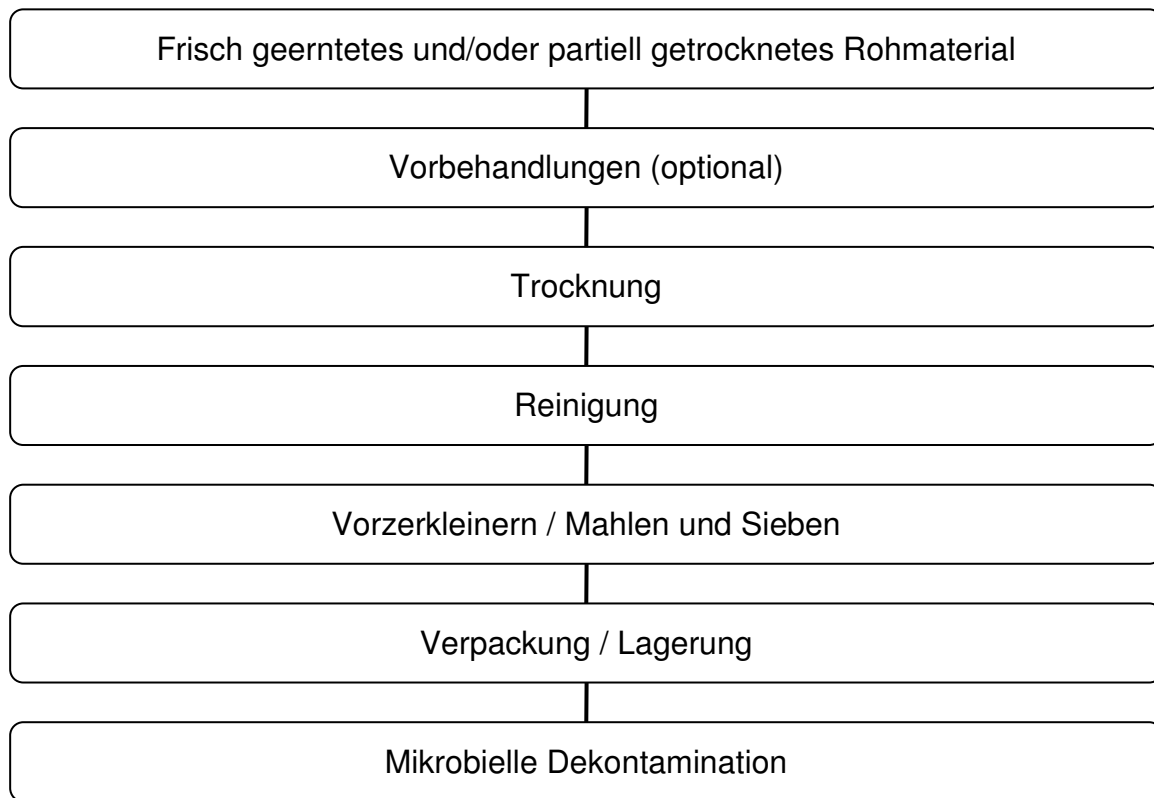


Abb. 1: Grundschrirte im Herstellungsprozess von Gewürzen (Schweiggert et al., 2007).

Nahezu alle Kräuter und Gewürze werden heute in ökologischer Qualität angeboten. Im Folgenden soll kurz auf einige Besonderheiten in der ökologischen Herstellung von Gewürzen eingegangen werden (Felgentreff und Otto, 2005):

Für den zertifizierten Bio-Anbau von Kräutern Gewürzen gelten nach der EG-Öko-Verordnung strenge Produktionsvorschriften. Um der Verpilzung und Besiedlung der Pflanzen mit schädigenden Mikroorganismen vorzubeugen, wird mit gedämpfter, das heißt weitgehend steriler Erde gearbeitet. Pestizide und der Einsatz ionisierender Bestrahlung zur Entkeimung sind grundsätzlich verboten. Bei einem Schädlingsbefall dürfen nur speziell zugelassene Präparate, z. B. auf der Basis von Ackerschachtelhalm, eingesetzt werden. Die mikrobielle Dekontamination biologisch angebauter Gewürze darf nur mittels thermischer Verfahren erfolgen. Werden in Betrieben sowohl ökologische als auch konventionelle Gewürze verarbeitet, müssen gleichzeitige Arbeitsgänge (z. B. Vermahlung von Gewürzen, Reiben von Kräutern)

zeitlich getrennt voneinander erfolgen. Die EG-Öko-Verordnung hat dazu besondere Bestimmungen erlassen, insbesondere dass Aufzeichnungen darüber zu führen sind, welche konventionellen / ökologischen Waren zu welcher Zeit und in welcher Menge bearbeitet wurden.

Gewürze sind Naturprodukte, die aufgrund ihrer natürlichen mikrobiellen Kontamination das Mindesthaltbarkeitsdatum damit hergestellter Lebensmittel erheblich verkürzen können. Um die bakterielle Kontamination von Gewürzen reduzieren zu können, wurden verschiedene Entkeimungsverfahren entwickelt:

1. Die Begasung mit Ethylenoxid, die zu einer signifikanten Reduktion des Keimgehaltes führt (Leistritz, 1997), wurde aufgrund der kanzerogenen Wirkung des Ethylenoxids in der Europäischen Union verboten.
2. Die ionisierende Lebensmittelbestrahlung mit Gamma-, Röntgen- oder Elektronenstrahlung, hat sich als ein effektives Entkeimungsverfahren herausgestellt. Dabei verändert die Bestrahlung die Qualität (z.B. Nährwert) und Beschaffenheit der Lebensmittel kaum. Durch eine Beschränkung der Strahlendosis auf 10kGy, ist eine radioaktiver Einfluß auf das bestrahlte Lebensmittel auszuschließen (Farkas, 2006). Wie auch in den anderen EU-Ländern, ist in Deutschland die Bestrahlung von Kräutern und Gewürzen erlaubt (LMBestrV, 2000). Diese Produkte müssen jedoch besonders gekennzeichnet sein. Aufgrund der mangelnden Verbraucherakzeptanz, wird dieses Verfahren trotz seiner hervorragenden technologischen Eigenschaften bisher nur kaum angewendet (Schweiggert et al., 2007).
3. Ein weit verbreitetes Verfahren in der Gewürzindustrie ist hingegen die thermische Entkeimung, bei der die Gewürze einer Heißdampf- oder Vakuumheißdampfbehandlung unterzogen werden. Diese Technik ist allerdings technologisch schwierig, da sich der Wasserdampf, der sich während der Behandlung auf die Gewürze gelegt hat, im Anschluß daran entfernt werden muss, um einen unerwünschten Schimmelpilzbefall zu vermeiden (Schweiggert et al., 2007).

2.1.3 Mikrobiologischer Status von Gewürzen

Da Gewürze und Kräuter Naturprodukte sind, können sie mit einer Vielzahl von Mikroorganismen einschließlich pathogener Bakterien, Schimmel- und Hefepilzen belastet sein (Schweiggert et al., 2007) (vgl. Tab. 2). Eine große Rolle in der Gewürzkontamination spielen aerobe Sporenbildner sowie Hefen und Schimmelpilze (Little et al., 2003). Wie aus der Tabelle 2 hervorgeht, variieren dabei die mikrobiellen Keimbelastungen unter den verschiedenen Gewürzen. So gilt Pfeffer neben Curry und Majoran als eines der am höchsten belasteten Sorten (Mckee, 1995).

Tab. 2. Keimbelastung von Gewürzen.

Gewürz	GKZ KbE/g)	Keimspektrum	Referenz
Basilikum	$10^5 - 10^7$	<i>Enterobacteriaceae</i> ($< 10^5$); <i>B. cereus</i> (10^3); <i>Cl. perfringens</i> ; Schimmelpilze;	De Boer et al., 1985; Kneifel und Berger, 1994; Zschaler, 1979;
Curry	$\leq 10^7$	<i>Enterobacteriaceae</i> ($\leq 10^4$); <i>B. cereus</i> ($10^3 - 10^5$); Hefen- und Schimmelpilze	De Boer et al., 1985; Hara-Kudo et al., 2006; Kneifel und Berger, 1994; Zschaler, 1979;
Ingwer	$10^5 - 10^9$	<i>B. cereus</i> ($10^1 - 10^5$); <i>Cl. perfringens</i> ; Streptokokken; Staphylokokken; Hefen- und Schimmelpilze	Baxter und Holzzapfel, 1982; Banerjee und Sarkar, 2003 ; De Boer et al., 1985 ; Kneifel und Berger, 1994
Knoblauch	$10^2 - 10^5$		Banerjee und Sarkar, 2003
Koriander	$10^5 - 10^9$	<i>B. cereus</i> ($10^1 - 10^4$) <i>Enterobacteriaceae</i> ; Streptokokken; Hefen und Schimmelpilze	Banerjee und Sarkar, 2003 ; Baxter und Holzzapfel, 1982; Graubaum et al., 2005
Kümmel	$10^3 - 10^9$	<i>Enterobacteriaceae</i> ($\leq 10^5$); <i>Cl. perfringens</i> ; <i>B. cereus</i> ($10^2 - 10^3$); Hefen	Banerjee und Sarkar, 2003; De Boer et al., 1985 ; Rosenberger und Weber, 1993
Majoran	$10^1 - 10^6$	<i>B. cereus</i> (10^2); <i>Cl. perfringens</i> , Staphylo- kokken, Streptokokken; Hefen und Schimmelpilze	Baxter und Holzzapfel, 1982; Graubaum et al., 2005; Zschaler, 1979
Nelken	$10^4 - 10^9$	<i>B. cereus</i> ($10^1 - 10^4$); <i>Cl. perfringens</i>	Banerjee und Sarkar, 2003 ; Kaul und Taneja, 1989
Paprika	$10^5 - 10^7$	Salmonellen; Hefen und Schimmelpilze (10^4)	D'Áoust, 1994; De Boer et al., 1985 ; Hara-Kudo et al., 2006
Pfeffer	$10^6 - 10^9$	<i>Enterobacteriaceae</i> ($\leq 10^5$); <i>B. cereus</i> (10^2); <i>Cl. perfringens</i> ; Salmonellen	Banerjee und Sarkar, 2003 ; Hara-Kudo et al., 2006; Uluikulani et al., 2005 Wojcik und Jakubowska, 2005
Rosmarin	$\leq 10^5$	<i>Enterobacteriaceae</i> ; <i>B. cereus</i> ; Staphylokokken; Streptokokken;	Baxter und Holzzapfel, 1982; Julseth und Deibel, 1974.

Unterschiedliche Keimbelastungen zwischen den einzelnen Gewürzsorten aber auch zwischen den verschiedenen Produkten einer Sorte, sind auf eine große Anzahl unterschiedlicher Einflussfaktoren zurückzuführen. Zum einem ist die mikrobielle Kontamination stark abhängig von der Art und Herkunft der Gewürzsorte, ihren antimikrobiellen Eigenschaften sowie von Umwelteinflüssen (Baxter und Holzapfel, 1982; Bhat et al., 1987; Purseglove et al., 1981). So finden sich z. B. bei Kräutern und Gewürzen die in Bodennähe wachsen, meist höhere Keimgehalte als bei bodenfernen Gewürzen (Purseglove et al., 1981). Zum anderen beeinflussen aber auch Trocknung, Transport, Verarbeitung und Lagerung entscheidend den mikrobiologischen Status von Gewürzen (Julseth und Deibel, 1974; Juri et al., 1986; Kaferstein, 1976; Malmsten et al., 1991). Untersuchungen ergaben, dass luftgetrocknete Gewürze bis zu zehnfach höher keimbelastet sind als gefriergetrocknete Gewürze und vakuumverpackte Gewürzprodukte stärker kontaminiert sind als aerob verpackte. Produkte, die bei 35 °C gelagert wurden, wiesen höhere Keimzahlen auf als bei einer Lagerung bei 25 °C (Malmsten et al., 1991).

Gewürze werden in den verschiedensten Gebieten der Erde angebaut, hauptsächlich aber in Entwicklungsländern (Tab. 3). Indien ist dabei der größte Hersteller und Exporteur von Gewürzen, gefolgt von China und Bangladesch. Westliche Länder spielen mit einem Anteil von 3 % an der weltweiten Gewürzproduktion nur eine untergeordnete Rolle.

Tab. 3: Weltweite Gewürzproduktion im Jahr 2004 (FAOSTAT, 2005)

Land	Produktionsmenge (in Tonnen)	Anteil an der weltweiten Gesamt- produktion (1 868 700 Tonnen)
India	1 600 000	86 %
China	66 000	4 %
Bangladesh	48 000	3 %
Pakistan	45 300	2 %
Turkey	33 000	2 %
Nepal	15 500	1 %
Andere Länder	60 900	3 %

In den Entwicklungsländern, wie z. B. Indien und China, sind die Anforderungen an Lebensmittelhygiene-Standards im Vergleich zu den westlichen Ländern oft wesentlich geringer. Dies kann im Zusammenspiel mit ungünstigen Umwelteinflüssen und Produktionsbedingungen in mikrobiologischen Qualitätsproblemen bei Gewürzen resultieren, die nicht zuletzt Lebensmittelinfektionen sowie –intoxikationen zur Folge haben können (Buckenhuskes und Rendlen, 2004; Schweiggert et al., 2007).

So sind keimbelastete Gewürze als Hauptverursacher von Erkrankungen bekannt geworden, wenn sie Erzeugnissen zugegeben wurden, in denen vor dem Verzehr eine Erregervermehrung möglich war (Europäische Kommission, 2004). Im letzten Jahrzehnt stiegen lebensmittelassoziierte Erkrankungen, die mit der Verwendung kontaminierten Gewürze assoziiert sind, in Europäischen Ländern an (Buckenhuskes und Rendlen, 2004). Besondere Aufmerksamkeit gilt diesbezüglich der Zugabe von Gewürzen zu verzehrfertigen Lebensmitteln („ready-to-eat food“), die keiner weiteren Erhitzung unterzogen werden (Little et al., 2003).

Aufgrund des von Gewürzen ausgehenden hohen mikrobiellen Kontaminationsrisikos für Lebensmittel, hat die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) als Orientierungshilfe für Lebensmittelhersteller und –inverkehrbringer Richt- und Warnwerte für Gewürze erarbeitet (Tab. 4). Diese besitzen jedoch keinen rechtsverbindlichen Charakter. Wie die Tabelle 5 zeigt, hat auch die Europäische Kommission (EU) zur Bewertung der bakteriologischen Sicherheit von Gewürzen, Richt (m)- und Warnwerte (M) für Gewürze vorgeschlagen (Europäische Kommission, 2004).

Tab 4: Richt- und Warnwerte für Gewürze (DGHM, 2007).

Keimart / Keimgruppe	Richtwert ^{a)}	Warnwert ^{b)}
<i>Salmonella</i> spp.	-	nicht nachweisbar in 25 g
<i>Escherichia coli</i>	1,0 x 10 ³ KbE/g	1,0 x 10 ⁴ KbE/g
<i>Bacillus cereus</i>	1,0 x 10 ³ KbE/g	1,0 x 10 ⁴ KbE/g
Sporen sulfitreduzierender		
Clostridien	1,0 x 10 ⁴ KbE/g	1,0 x 10 ⁵ KbE/g
Schimmelpilze	1,0 x 10 ⁵ KbE/g	1,0 x 10 ⁶ KbE/g

^{a)} Richtwerte geben eine Orientierung, welches produktspezifische Mikroorganismenspektrum zu erwarten und welche Mikroorganismengehalte in den jeweiligen Lebensmitteln bei Einhaltung einer guten Hygienepaxis akzeptabel sind.

^{b)} Warnwerte geben Mikroorganismengehalte an, deren Überschreitung einen Hinweis darauf gibt, dass die Prinzipien einer guten Hygienepaxis verletzt wurden und zudem eine Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers nicht auszuschließen ist.

Tab. 5: Richt- und Warnwerte für Gewürze (Europäische Kommission, 2004)

Keimart / Keimgruppe	Richtwert (m)	Warnwert (M)
<i>Salmonella</i> spp. (n=5, c=0)*	-	nicht nachweisbar in 25 g
<i>Enterobacteriaceae</i> (n=5, c=1)*	$1,0 \times 10^1$ KbE/g	$1,0 \times 10^2$ KbE/g
<i>Bacillus cereus</i> (n=5, c=1)*	$1,0 \times 10^3$ KbE/g	$1,0 \times 10^5$ KbE/g
<i>Clostridium perfringens</i> (n=5, c=1)*	$1,0 \times 10^2$ KbE/g	$1,0 \times 10^3$ KbE/g

*ⁿ) n = Anzahl der Proben, die untersucht werden müssen; c = Anzahl der Proben, die zwischen Richt- und Warnwerte liegen dürfen, damit eine Probe noch als zufriedenstellend beurteilt werden kann.

Sowohl die DGHM als auch die Europäische Union empfehlen, dass *Salmonella* spp. in 25 g des untersuchten Lebensmittels nicht nachweisbar ist. Zu Schimmelpilzen und *E. coli* liegen von der EU keine Angaben vor. Für die Familie der *Enterobacteriaceae*, zu der auch *E. coli* zählt, empfiehlt sie allerdings ein Warnwert von $1,0 \times 10^2$ KbE/g. Die DGHM schlägt für *E. coli* ein Warnwert von $1,0 \times 10^4$ KbE/g vor. Für *B. cereus* wurde von der DGHM ein geringerer Warnwert ($1,0 \times 10^4$ KbE/g) erarbeitet als von der EU ($1,0 \times 10^5$ KbE/g). Hingegen ist die EU bei der Bewertung des Keimgehaltes von *Cl. perfringens* strenger. Sie empfiehlt einen Warnwert von $1,0 \times 10^3$ KbE/g, während die DGHM nur allgemein für Clostridien einen Warnwert von $1,0 \times 10^5$ KbE/g angibt.

2.2. Spezies *Bacillus cereus*

2.2.1 Taxonomie

B. cereus zählt zur morphologischen Gruppe 1A (*Bacillus cereus* Gruppe) der Gattung *Bacillus* (Ash et al., 1991), die die Spezies *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides* und *B. thuringiensis* umfasst (Turnball und Kramer, 1991). Desweiteren werden die Spezies *B. pseudomycoides* sowie *B. weihenstephanensis* dieser Gruppe zugeordnet (Lechner et al., 1998; Nakamura, 1998).

Neben gleicher Zell- und Sporenmorphologie sowie einer Serie gleicher physiologischer Eigenschaften, weisen die genannten Spezies eine hohe DNA-Homologie auf (Ash et al., 1991; Ash und Collins, 1992). Dennoch gibt es einige physiologische Parameter, die als spezifisch für die einzelnen Spezies der *B. cereus* Gruppe angesehen werden. So exprimiert *B. anthracis* das Anthrax-Toxin, welches durch die Plasmide pXO1 und pXO2 codiert wird (Makino et al., 1993), und mittels eines polymorphen DNA-Markers (RAPD-Technik) identifiziert werden kann (Daffonchio et al., 1999). Darüber hinaus kann *B. anthracis* anhand seines Hämolyseverhaltens (ahämolytisch) von *B. cereus* differenziert werden (Beyer et al., 2004).

B. thuringiensis unterscheidet sich von *B. cereus* ausschließlich durch die Produktion parasporaler kristalliner Einschlüsse, die Protoxine des insektiziden Delta-Endotoxins von *B. thuringiensis* sind (Gonzales, Jr. et al., 1981). Dieses Toxin ist ebenfalls Plasmid-codiert. Studien zeigten, dass durch Plasmidtransfer das Toxinbildungsvermögen von *B. anthracis* oder *B. thuringiensis* auf *B. cereus* übertragen werden kann (Battisti et al., 1985).

Typische *B. mycoides* und *B. pseudomycoides* können anhand ihres rhizoiden Koloniewachstums auf Agarplatten identifiziert werden. Untereinander sind diese beiden Spezies anhand ihres Fettsäuremusters zu unterscheiden (Nakamura, 1998). Die Differenzierung des psychrotoleranten *B. weihenstephanensis* vom mesophilen *B. cereus* kann anhand des Nachweises des Gens *cspA*, welches das cold shock Protein A codiert (Francis et al., 1998), sowie anhand charakteristischer Sequenzunterschiede in der 16S rDNA erfolgen (Lechner et al., 1998).

2.2.2 Allgemeine Eigenschaften

B. cereus ist ein ubiquitär vorkommendes, gram-positives Stäbchen, das sich (fakultativ) aerob vermehrt und die Fähigkeit zur Sporenbildung besitzt (Sneath et al., 1996).

Die vegetative Form von *B. cereus* wächst in einem Bereich von 10 bis 50 °C, mit einem Temperaturoptimum zwischen 30 °C und 40 °C. Es sind jedoch auch einzelne psychrotrophe Stämme beschrieben, die sich bei Temperaturen von 4 bis 6 °C vermehren können, deren Generationszeiten aber wesentlich verlängert sind (Notermans und Batt, 1998). Der minimale pH-Wert für eine Vermehrung von *B. cereus* variiert je nach Stamm zwischen 4,35 und 4,9, der minimale a_w -Wert zwischen 0,912 bis 0,950 (Notermans und Batt, 1998). Als weitere biochemische Eigenschaften des Erregers sind die β – Hämolyse, die Lecithinase-Bildung (Eigelb-Hydrolyse) sowie die fehlende Verstoffwechslung von D-Mannit zu nennen (Sneath et al., 1996)

Die versportete Form von *B. cereus* stellt keine Vermehrungsform wie die Exosporen der Pilze dar, sondern eine Dauerform, die der Erhaltung der Art bei ungünstigen äußeren Verhältnissen dient. So wird die Sporenbildung von *B. cereus*, ein sehr komplexer Differenzierungsprozeß, durch Nährstoffmangel oder Umwelt bedingtem Stress induziert (Montville und Matthews, 2005).

B. cereus Sporen weisen eine große Hitzresistenz auf: Sie sind unempfindlich gegenüber hohen Temperaturen, wie sie beispielsweise bei der Pasteurisierung von Lebensmitteln (60-80 °C) angewandt werden (Guinebretiere et al., 2001). Darüber hinaus ist eine Aktivierung der Sporen zum Auskeimen infolge einer Hitzbehandlung möglich (Laurent et al., 1999). Die versportete Form von *B. cereus* verfügt zudem über eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Desinfektionsmitteln (Faille et al., 2001) und kann sich aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften gut an Oberflächen anheften (Roenner et al., 1990). Desweiteren kann *B. cereus* in versporteter Form auch eine verminderte Sauerstoffspannung lange Zeit überstehen (Beutling und Bottcher, 1998). Sporen dieser Spezies überleben aufgrund ihrer hohen Tenazität häufig bis zu einem Jahr (Seltow, 1994).

Die Hauptfaktoren, die ein Auskeimen von *B. cereus* Sporen und eine Vermehrung dieses Keimes während der Produktion / Distribution von Lebensmitteln begünstigen und somit zu *B. cereus* assoziierten Erkrankungen beitragen können, sind:

- eine unzureichende Erhitzung der Produkte,
- eine Lagerung der Produkte bei nicht geeigneten Temperaturen,
- sowie eine große Zeitspanne zwischen Zubereitung und Verzehr der Lebensmittel (Kramer und Gilbert, 1989).

2.3 Vorkommen von *B. cereus* in Lebensmitteln

B. cereus besitzt sowohl lebensmitteltechnologische als auch –hygienische Relevanz: Infolge ausgeprägter proteolytischer Eigenschaften zählt er zu den wichtigsten Verursachern von Qualitätsminderung und Verderb von Lebensmitteln (Heyndrickx und Scheldeman, 2002). Vor allem in der Backwaren- und Milchindustrie führte er so zu großen wirtschaftlichen Verlusten (Beutling und Bottcher, 1998). Daneben spielen Toxinbildende-Stämme dieser Spezies eine bedeutende Rolle als Verursacher Lebensmittel-assoziiertes Erkrankungen (EFSA, 2004).

Pathogene Stämme von *B. cereus* wurden bereits aus einer Vielzahl von Lebensmitteln isoliert, wie z. B. aus Milch- und Molkereiprodukten, Gemüse und Gemüsezubereitungen, Reisgerichten sowie Gewürzen (vgl. Tab. 6).

Tab. 6: Vorkommen von *B. cereus* in Lebensmitteln.

Lebensmittel	Keimzahl (KbE/g)	Referenzen
Backwaren	$\leq 10^4$	(Giffel et al., 1996; Wijnands et al., 2006)
Fleischprodukte	$10^2 - 10^4$	(Drobniewski, 1993; Kramer und Gilbert, 1989; Taylor und Gilbert, 1975; Wijnands et al., 2006)
Gemüse, -zubereitungen	$\leq 10^3$	(Choma et al., 2000; Roy et al., 2007; Valero et al., 2007)
Gewürze	$\leq 10^5$	(Banerjee und Sarkar, 2003; De Boer et al., 1985; Kneifel und Berger, 1994; Zschaler, 1979)
Milch und Molkereiprodukte	$\leq 10^4$	(Giffel et al., 1997; Netten et al., 1990; Wijnands et al., 2006)
Trockenmilchprodukte	$\leq 10^4$	(Reyes et al., 2007)
Nudeln	10^4	(Wijnands et al., 2006)
Reis und Reisgerichte	k.A.	(Fricker et al., 2007a; Lee et al., 2006; Yadava, 2004)
Säuglingsnahrung	10^3	(Duc et al., 2005 ; Rowan et al., 2003)
Soßen und Pudding	k.A.	(Netten et al., 1990)

*) k.A. = Keine Angabe.

Der Eintrag von *B. cereus* in die Nahrungsmittelkette erfolgt dabei meist über eine Kontamination mit Erdboden oder Staub, die das primäre Reservoir des Erregers darstellen (Giffel et al., 1995; Guinebretiere und Nguyen-The, 2003; Krämer, 2003). Zudem kann eine Kontamination über Küchen- oder Bedarfsgegenstände erfolgen, da *B. cereus* Sporen über eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Desinfektionsmitteln (Faille et al., 2001) und über große Adhäsionskräfte verfügen (Roenner et al., 1990).

In komplexen Lebensmitteln werden unterdessen vielfach Gewürze als Vektor für *B. cereus* - Kontaminationen angesehen (EFSA, 2004; ICMSF, 2005). Wie jedoch aus den Tabellen 2 und 6 hervorgeht, sind nur wenig aktuelle Daten aus dem europäischen Raum über die tatsächliche Belastung von Gewürzen mit diesem Erreger publiziert. Dies war Anlass für eine Empfehlung der Europäischen Kommission, die bakteriologische Sicherheit von Gewürzen im Rahmen eines koordinierten Programms zur Lebensmittelüberwachung zu bewerten (Europäische Kommission, 2004).

2.4 Human- und veterinärmedizinische Bedeutung von *B. cereus*

2.4.1 Humanmedizinische Bedeutung

B. cereus kann beim Menschen sowohl gastrointestinale als auch nicht gastrointestinale Erkrankungen hervorrufen. Zu den nicht gastrointestinalen Erkrankungen zählen Endophthalmitiden, Septikämien, Infektionen des ZNS, Wundinfektionen, Periodontiden, sowie Atemwegserkrankungen (Beecher et al., 2000; Drobniowski, 1993; Helgason et al., 2000).

Unter den gastrointestinalen Erkrankungen sind zwei Krankheitsbilder zu unterscheiden, das diarrhöische und das emetische Syndrom (Granum, 2001).

Bei der durch Enterotoxine ausgelösten diarrhöischen Form, kommt es nach einer Inkubationszeit von 8-16 Stunden zu profusem Durchfall, Abdominalkrämpfen und gelegentlich zu Übelkeit. Die Krankheitsdauer beträgt ungefähr 12 – 14 Stunden, wobei das Krankheitsgeschehen in der Regel selbstlimitierend ist (Granum, 1997). Man geht heute davon aus, dass die Enterotoxine erst im Darm nach Verzehr mit *B. cereus* kontaminierter Lebensmittel gebildet werden (Schoeni und Wong, 2005).

Hingegen wird das emetische Syndrom durch ein hitzestabiles Toxin (Cereulid) ausgelöst, welches präformiert im Lebensmittel vorliegt. Bei dieser Lebensmittelintoxikation treten nach einer Inkubationszeit von 0,5 bis 6 Stunden als Leitsymptome Vomitus und Nausea auf, wobei die Krankheitsdauer meist nicht mehr als 24 Stunden beträgt (Ehling-Schulz et al., 2004b). Im Allgemeinen verläuft dieses Krankheitsgeschehen mild und ist ebenfalls selbstlimitierend, jedoch sind auch dramatisch verlaufende Fälle mit letalem Ausgang publiziert (Dierick et al., 2005; Mahler et al., 1997).

Das emetische Syndrom tritt nahezu ausschließlich beim Verzehr stärkehaltiger Lebensmittel, wie Nudeln und Reis auf, während die diarrhöische Form in engem Zusammenhang mit dem Verzehr von Fleisch / Fleischprodukten, Gemüse, Saucen sowie Milch / Milchprodukten gesehen wird (Ehling-Schulz et al., 2004b; Kramer und Gilbert, 1989).

Beide Formen werden für gewöhnlich ausgelöst, wenn es nach einer Hitzebehandlung (Kochen, Pasteurisation) infolge einer inadäquaten Kühllagerung zu einem Auskeimen der Sporen und einer Vermehrung des Keimes im Lebensmittel

kommt (Ehling-Schulz et al., 2004b; Kramer und Gilbert, 1989) (siehe auch 2.2.2.). Zur minimalen infektiösen Dosis, die benötigt wird um diese Erkrankungen auszulösen, finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben: So wurde von Fällen berichtet, die nach dem Verzehr von Speisen mit einer Anzahl zwischen 10^5 und 10^8 KbE/g auftraten (Granum, 2001). Hingegen gibt es auch Publikationen über das Auftreten des emetischen Syndroms in Verbindung mit Lebensmitteln, die 10^3 KbE/g an *B. cereus* enthielten (Kramer und Gilbert, 1989).

2.4.2 Veterinärmedizinische Bedeutung

Von veterinärmedizinischer Relevanz ist *B. cereus* als auslösendes Agens von Mastitiden bei Rindern (Hussain et al., 2006; Rowan et al., 2003), Ziegen (Ajuwape et al., 2005) und Kamelen (Gadir et al., 2005). Daneben gilt *B. cereus* als Verursacher von Aborten bei Rindern (Rowan et al., 2003), Schweinen (Kirkbride et al., 1986), Pferden (Ranganatha et al., 1981) und Kamelen (Wernery et al., 1996). Desweiteren sind *B. cereus* induzierte Dermatitiden bei Kälbern (Cernea et al., 2002) und Pferden (Frohlich, 1991) beschrieben.

Bei Kleintieren spielen *B. cereus* Infektionen bzw. Intoxikationen eine untergeordnete Rolle. Dennoch wurden Fälle von Vomitus und Diarrhoe bei alimentär infizierten Hunden (Chastain und Harris, 1974), sowie Fälle von Welpensterben infolge einer *B. cereus* Futtermittelintoxikation (Gareis und Walz, 1994) publiziert.

2.5 *B. cereus* - Toxine

Pathogene Stämme von *B. cereus* können zwei Formen einer gastrointestinalen Erkrankung hervorrufen: das diarrhöische und das emetische Syndrom (Granum, 2001), welche durch verschiedene Toxine ausgelöst werden (Tab. 7).

Tab. 7: *B. cereus* Toxine

Toxintyp	Toxin / -komplex	Referenz
Diarrhöe-Toxin	Hämolysin BL (HBL)	(Beecher und Macmillan, 1990)
	Non-hemolytic Enterotoxin (Nhe)	(Granum et al., 1996; Lund und Granum, 1996)
	Cytotoxin K (Cyt K)	(Lund et al., 2000)
	<i>B. cereus</i> Enterotoxin T (BcET)	(Agata et al., 1995a)
	Enterotoxin FM (EntFM)	(Asano et al., 1997)
Emetisches Toxin	Cereulid	(Agata et al., 1995b)

Die emetische Form wird durch ein hitzestabiles, trypsin-unempfindliches Toxin (Cereulid) induziert (Agata et al., 1995b), wohingegen die ursächlichen Pathogenitätsfaktoren der Diarrhoe-Form hitzelabile, trypsin-empfindliche Enterotoxine bzw. Enterotoxinkomplexe sind. Derzeit werden diesbezüglich fünf verschiedene Toxine diskutiert: das Hämolysin BL (HBL), das Non-Hemolytic Enterotoxin (Nhe), das Cytotoxin K (Cyt K), das Enterotoxin T (BcET) sowie das Enterotoxin FM (EntFM). Als gesichert gilt die enterotoxische Wirkung für die Toxine HBL (Beecher und Macmillan, 1990), Nhe (Granum et al., 1996; Lund und Granum, 1996) und Cyt K (Lund et al., 2000). Über das enteropathogene Potential von Enterotoxin T (Agata et al., 1995a) und Enterotoxin FM (Asano et al., 1997) bestehen nach bisherigem Stand der Forschung Zweifel (Choma und Granum, 2002). Diesen Toxinen wird daher gegenwärtig keine pathogenetische Relevanz bei Lebensmittelvergiftungen zugesprochen.

2.5.1 Hämolyisin BL (HBL)

Der hämolytisch wirkende Enterotoxinkomplex HBL besteht aus drei Proteinen unterschiedlicher Molekulargewichte: der B-Komponente mit 38,0 kDa, der L₁-Komponente mit 39,5 kDa sowie der L₂-Komponente mit 44,8 kDa (Beecher und Macmillan, 1990). Im Darmschlingen-Ligationstest (RIL = rabbit ileal loop) sowie im Gefäßpermeabilität-Reaktionstest (VPR = vascular permeability reaction) -Test wurde gezeigt, dass für eine maximale biologische Aktivität die Kombination aller drei Komponenten notwendig ist (Beecher et al., 1995; Beecher und Wong, 1994b).

Molekularbiologisch wurde zudem nachgewiesen, dass die codierenden Gene der drei Komponenten (*hblA*: B-Komponente, *hblC*: L₂-Komponente, *hblD*: L₁-Komponente) auf dem gleichen Operon lokalisiert sind (Abb. 2) und in eine m-RNA transkribiert werden (Heinrichs et al., 1993; Ryan et al., 1997). In umfangreichen Studien wiesen 40 – 60 % der untersuchten *B. cereus* die Gene für alle drei Komponenten auf (Hansen und Hendriksen, 2001; in't Veld et al., 2001; Pruss et al., 1999). Auf dem genannten Operon wurde ein weiteres Gen, *hblB*, isoliert. Die Funktion des von *hblB* codierten Proteins ist jedoch bisher unbekannt (Granum und Lund, 1997) (Abb. 2).

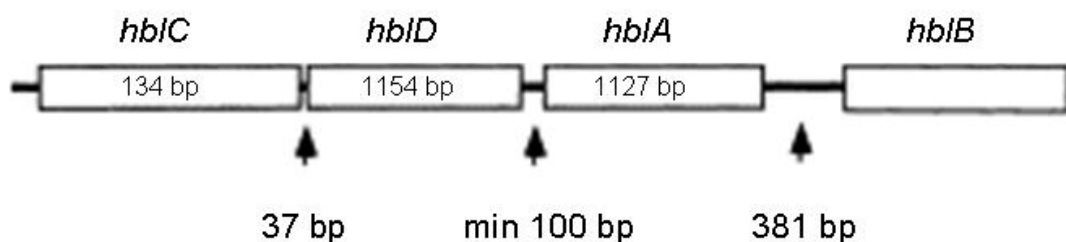


Abb. 2: Aufbau des *hbl* Operons (nach Granum und Lund, 1997). Das Operon umfasst die codierenden Gene der drei bekannten Toxine des HBL-Komplexes: *hblC* codiert die L₂-Komponente, *hblD* die L₁-Komponente und *hblA* die B-Komponente. Die Funktion des von *hblB* codierten Proteins ist bisher nicht geklärt.

Die Enteropathogenität des HBL-Komplexes zeigte sich anhand positiver Reaktionen im Mäuseletalitäts- und im Darmschlingen-Ligationstest sowie anhand erhöhter Kapillarpermeabilität im Gefäßpermeabilität-Reaktionstest (Beecher et al., 1995; Beecher und Wong, 1994b). Desweiteren wirkt HBL zytotoxisch auf verschiedene Zelllinien, wobei die Wirkungsweise von HBL auf zellulärer Ebene noch nicht vollständig geklärt ist. Verschiedene Arbeiten zum Wirkungsmechanismus wurden bisher publiziert. Die aktuellste Hypothese basiert auf der Annahme, dass sich alle HBL-Komponenten unabhängig voneinander an die Zielzellen binden und sich dann zu einem sogenannten „membrane attack complex“ formieren, der letztendlich für Membranläsionen verantwortlich ist. (Beecher und Wong, 1994b; Beecher und Wong, 1997).

Ein weiteres charakteristisches Merkmal von HBL ist die Bildung eines paradoxen Zonenphänomens, einer sog. diskontinuierlichen Hämolyse auf Schafblutagar (Beecher und Macmillan, 1991): Hierbei beginnt die Lyse der Erythrozyten etwas entfernt von der Auftragstelle der Kolonie und erst nach einiger Zeit werden die Erythrozyten um die Kolonie herum lysiert. Mehrere Autoren verwendeten dieses Merkmal zur phänotypischen Identifizierung HBL-positiver *B. cereus* Stämme, jedoch liegt eine Studie vor, in der die Ergebnisse aus PCR und Hämolyseverhalten nicht immer übereinstimmen (in't Veld et al., 2001). So konnten von 47 HBL-PCR positiven Stämmen nur 24 Stämme anhand ihres Hämolyseverhaltens auf Blutplatten identifiziert werden. Hingegen zeigten alle HBL - PCR negativen Stämme keine diskontinuierliche Hämolyse.

2.5.2 Non-Hemolytic Enterotoxin (Nhe)

Nachdem beobachtet wurde, dass manche *B. cereus* Stämme keine B-Komponente des HBL-Komplexes produzierten aber dennoch zytotoxisch waren (Granum et al., 1996), gelang es das Non-Hemolytic Enterotoxin aus einem HBL-negativen Stamm zu isolieren (Lund und Granum, 1996). Dieser Stamm war in eine Lebensmittelvergiftung mit dem Leitsymptom Durchfall involviert.

Wie bei HBL handelt es sich auch bei Nhe um einen Toxinkomplex, der aus drei verschiedenen Proteinen (NheA: 41,0 kDa, NheB: 39,8 kDa, NheC: 36,5 kDa) besteht, die ebenfalls durch drei unterschiedliche Gene (*nheA*, *nheB*, *nheC*) auf einem Operon codiert werden (Granum et al., 1999) (Abb. 3). Zudem bestehen strukturelle Ähnlichkeiten zwischen der L₁-Komponente des HBL-Komplexes und NheB sowie zwischen der B-Komponente des HBL-Komplexes und NheC (Lund und Granum, 1997).

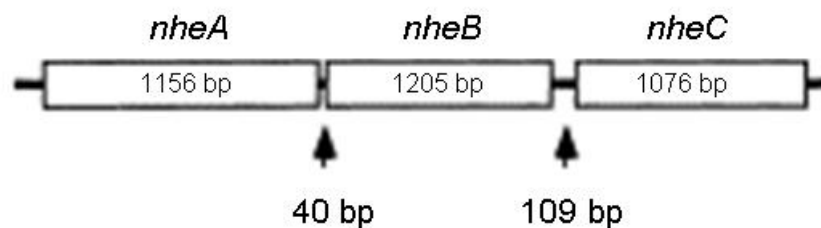


Abb. 3: Aufbau des *nhe* Operons (nach Granum, 1999). Das Operon umfasst die codierenden Gene der drei bekannten Toxine des Nhe-Komplexes: *nheA* codiert die NheA-Komponente, *nheB* die NheB-Komponente und *nheC* die NheC-Komponente.

Im Zellkulturtest wird die maximale zytotoxische Aktivität des Nhe-Komplexes ebenso nur bei Vorhandensein aller drei Komponenten erreicht (Lund und Granum, 1997). Über den vollständigen Wirkungsmechanismus von Nhe auf zellulärer Ebene ist hingegen wenig bekannt. Als gesichert wird die Funktion von NheB als Bindungskomponente für NheA und NheC im Toxinkomplex angenommen (Lindback et al., 2004).

Die Ergebnisse mehrerer Studien weisen auf ein Vorkommen des Nhe-Komplexes bei *B. cereus* von $\geq 90\%$ hin (Guinebretiere et al., 2002; Hansen und Hendriksen, 2001; in't Veld et al., 2001; Moravek et al., 2006).

2.5.3 Cytotoxin K (Cyt K)

Cytotoxin K ist ein Exoprotein mit nekrotischen und hämolytischen Eigenschaften, welches aus einem HBL- und Nhe-negativen *B. cereus* Stamm im Zusammenhang mit einer tödlich verlaufenden Lebensmittelvergiftung isoliert wurde (Lund et al., 2000). Cyt K ist ein Einzelprotein mit einem Molekulargewicht von 33,8 kDa und zeigt Homologien zum α -Hämolysin von *Staphylococcus aureus* und zum β -Hämolysin von *Clostridium perfringens*. Die genannten Toxine und Cyt K werden aufgrund ihrer Wirkung, der Bildung von Ionen-durchlässigen Kanälen, zur Gruppe der „pore forming toxins“ gezählt (Menestrina et al., 2001).

In einer umfangreichen Studie wurde das Cyt K -Gen bei 73 % von Diarrhoe verursachenden *B. cereus* Stämmen detektiert. Die Expression des Cyt K – Proteins wurde jedoch bisher nur bei einem *B. cereus* Stamm nachgewiesen (Guinebretiere et al., 2002).

Mittels molekularbiologischer Charakterisierung wurde ein Cyt K ähnliches Toxin noch bei fünf anderen Stämmen nachgewiesen, die zudem über HBL- und/oder Nhe-Toxinbildungsvermögen verfügten (Stenfors et al., 2002).

2.5.4 *Bacillus cereus* Enterotoxin T (BcET)

Als ein weiterer möglicher Pathogenitätsfaktor von *B. cereus*, wurde das aus dem *B. cereus* Stamm B-4ac (DSM No. 4384) isolierte Enterotoxin T (BcET) beschrieben (Agata et al., 1995a). BcET ist ein singuläres Protein, das durch das Enterotoxin T Gen (*bceT*) codiert wird. Dieses Gen wurde kloniert und in *Escherichia coli* exprimiert. Das rekombinante Protein (bc-D-ENT) wies genau wie BcET ein Molekulargewicht von 41,0 kDa auf (Agata et al., 1995a).

Aufgrund positiver Reaktionen von bc-D-ENT im Zytotoxizitäts-, RIL-, VRP- sowie im Mäuseletalitätstest, wurde eine pathogene Wirkung von BcET vermutet (Agata et al., 1995a). Allerdings wies bc-D-ENT in weiteren Untersuchungen wesentlich schwächere biologische Aktivitäten als der Kulturüberstand des ursprünglichen *B. cereus*-Stammes B-4ac auf, bzw. wurden in anderen Studien bei B-4ac in Kulturüberständen oder Zellextrakten keine biologische Aktivität festgestellt (Agata et al., 1995a; Choma und Granum, 2002).

Zudem wurde nachgewiesen, dass dem Protein BcET die Fähigkeit zur Stimulation der Adenylatcyclase für die Umwandlung von ATP in cAMP fehlt, wie es bei einigen Diarrhoen-induzierenden Bakterien, zu beobachten ist. Somit scheint nach derzeitigem Stand der Forschung BcET als Auslöser einer Erkrankung nicht in Frage zu kommen. Desweiteren wurde BcET bisher noch nicht mit einer Lebensmittelvergiftung ursächlich in Verbindung gebracht werden (Choma und Granum, 2002). Die von Agata et al. beschriebene enterotoxische Aktivität des BcET wird heute darauf zurückgeführt, dass es sich bei einem der BcET codierenden Fragmente um ein Homolog des open reading frame (ORF 101) des Virulenzplasmids pXO1 von *B. anthracis* handelt (Hansen et al., 2003).

2.5.5 Enterotoxin FM (EntFM)

Das Enterotoxin FM ist ein Toxinkomplex bestehend aus drei Proteinen, mit einem jeweiligen Molekulargewicht von 39, 45 und 105 kDa. Ähnlich wie bei HBL, wird für eine maximale zytotoxische Aktivität das Vorhandensein aller drei Komponenten benötigt. Der Komplex wirkt stark zytotoxisch auf Vero-Zellen, zeigt jedoch keine hämolytische Aktivität.

Die 45 kDa-Komponente entspricht dem größtem Antigen, das im Bacillus Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay (Tecra) nachgewiesen wird (siehe 2.5.2.2.), während die 39 kDa-Komponente Ähnlichkeit zur L₁-Komponente des HBL-Komplexes aufweist. Jedoch bestehen keine Ähnlichkeiten zwischen den drei Komponenten von EntFM und der L₂- sowie der B-Komponente des HBL-Komplexes, weshalb man bei diesem Toxinkomplex von einem weiteren Pathogenitätsfaktor von *B. cereus* ausgeht (Lund und Granum, 1996). Gegenwärtig sind zu dieser Vermutung allerdings keine biologischen Studien publiziert (Ehling-Schulz et al., 2004a).

2.5.6 Cereulid

Das emetische Toxin von *B. cereus*, Cereulid, ist ein zyklisches Dodecadepsipeptid (Abb. 4), dessen Synthese über eine nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS) erfolgt (Ehling-Schulz et al., 2004a).

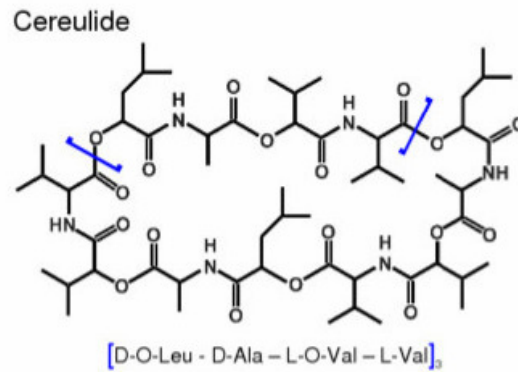


Abb. 4: Chemische Struktur des emetischen Toxins (Cereulid) von *B. cereus* (Agata et al., 1994)

Chemisch ist das Cereulid eng verwandt mit dem vom *Streptomyces griseus* produzierten Antibiotikum Valinomycin (Agata et al., 1994). Beide wirken *in vivo* als Emetikum und lösen *in vitro* Vakuolenbildung in HEp-2 Zellen aus, jedoch ist das Cereulid um ein Vielfaches toxischer als das Valinomycin (Agata et al., 1995b). Dies ist wahrscheinlich auf geringe Strukturunterscheide dieser beiden Peptide und aus der daraus resultierenden veränderten Affinität zu Zelloberflächenrezeptoren zurückzuführen (Agata et al., 1995b; Mikkola et al., 1999).

Das Cereulid ist, wie die Enterotoxine von *Staphylococcus aureus*, hitze- und säurestabil sowie bereits in geringen Dosen toxisch. Beide Toxine weisen zwar eine Vielzahl gemeinsamer Charakteristika auf und induzieren Emesis, sie sind jedoch nicht mit einander strukturverwandt (Ehling-Schulz et al., 2004a).

Die Quantität der emetischen Toxinexpression hängt von einer Vielzahl extrinsischer Faktoren ab, wie z. B. Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffsättigung oder das Vorhandensein bestimmter Aminosäuren (Ehling-Schulz et al., 2004a). *In vitro* wurden im Vergleich zu Tryptose-Bouillon oder Hirn-Herz-Bouillon, die höchsten

Toxintiter in 10 %iger Magermilch festgestellt. In Peptonwasser wurde hingegen keine Cereulidproduktion detektiert (Finlay et al., 1999). In Lebensmitteln wurden die höchsten Toxintiter in Reis und Pasta nachgewiesen, während die Toxinbildung in Backwaren gering war (Agata et al., 2002; Jaaskelainen et al., 2003a).

Zudem variiert die Toxinexpression unter den verschiedenen emetischen *B. cereus* Stämmen zwischen 0,02 und 230 µg / mL. Dennoch sprechen einige Anzeichen dafür, dass diese Stämme einer genetischen Linie angehören (Ehling-Schulz et al., 2005).

Das Vorkommen emetischer *B. cereus* Stämme liegt nach Angaben verschiedener Studien zwischen 2 und 7,5 % (Kreuzberger, 2007; Schulz, 2004; Taylor und Gilbert, 1975).

2.6 *B. cereus* – Nachweisverfahren

2.6.1 Speziesnachweis

2.6.1.1 Kulturelle Verfahren

Zur Isolierung und Bestimmung der Anzahl präsumtiver *B. cereus* in Lebensmitteln stehen verschiedene Selektivnährmedien zur Verfügung. Von der Internationalen Organisation für Normung (ISO) sowie der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB wird die Verwendung des Polymyxin-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau Agars (PEMBA) und des Mannitol-Eigelb-Polymyxin Agars (MYP) empfohlen (Anonymus, 2004; Schulten et al., 2000). Diese beiden Nährmedien unterscheiden sich zwar in ihrer Zusammensetzung, basieren jedoch auf dem gleichen Nachweisprinzip: (i) typisches Erscheinungsbild der Kolonien, (ii) Bildung eines Präzipitathofs um die Kolonien infolge von Eigelbhydrolyse und (iii) charakteristische Färbung der Kolonien aufgrund der Unfähigkeit von Stämmen der *B. cereus*-Gruppe Mannit zu vergären (van Netten und Kramer, 1992) (Abb. 5).

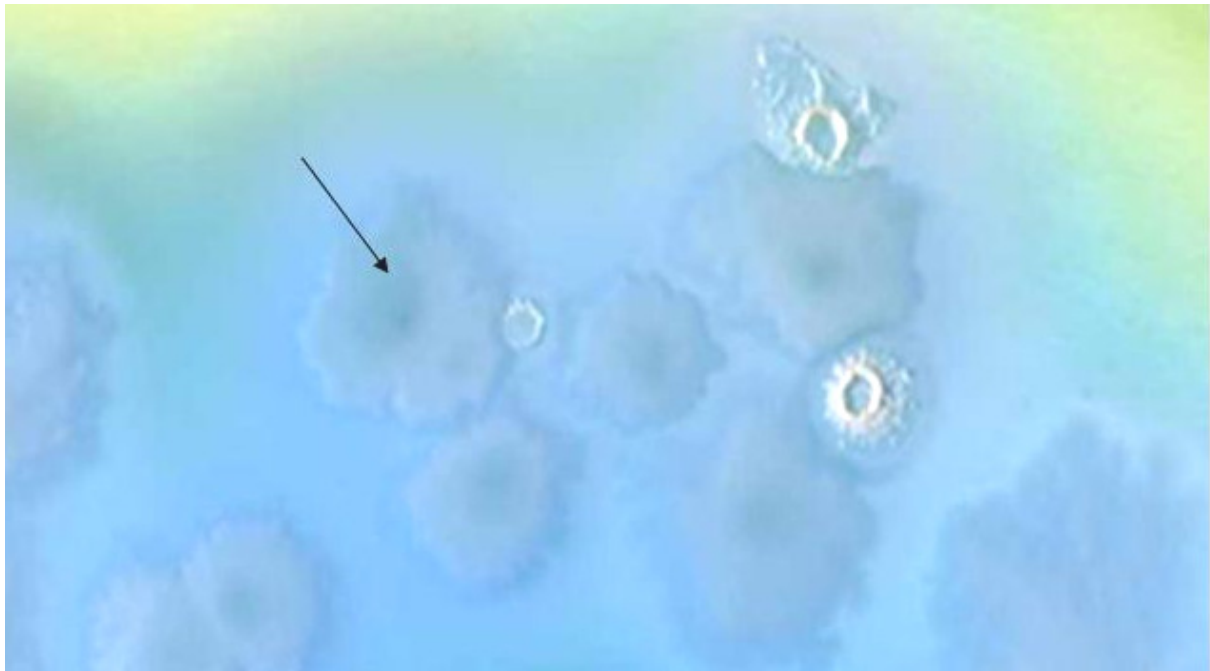


Abb. 5: Wachstum präsumtiver *B. cereus* auf *Bacillus-Cereus*-Selektivnährboden (PEMBA). Typische *B. cereus* Kolonien erscheinen türkis gefärbt, umgeben von einer Eigelb-Präzipitation gleicher Färbung (Oxoid, 1993). Der Pfeil markiert eine charakteristische *B. cereus*-Kolonie (Bildquelle: Max Rubner - Institut Kulmbach, Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie).

Einige (vorwiegend emetische) *B. cereus* Stämme zeigen jedoch nur eine schwache oder keine Eigelbreaktion und / oder eine fehlende typische Färbung der Kolonien. Infolge dessen können *B. cereus* - Kolonien falsch identifiziert oder übersehen werden, was den Nachweis erheblich erschwert. Problematisch sind zudem Proben, die einen hohen Gehalt an Mannit-vergärenden Begleitkeimen aufweisen, wodurch die kennzeichnende Färbung der Kolonien abgeschwächt oder nicht mehr sichtbar sein kann (Ehling-Schulz et al., 2004a; Fricker et al., 2007b). Desweiteren sind andere Eigelb-verwertende Keime, wie z. B. *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* oder *Proteus vulgaris* anhand der Kolonief orm und -farbe nur schlecht von *B. cereus* auf diesem Nährboden unterscheidbar (Oxoid, 1993). Zudem zeigen alle Vertreter der *B. cereus*-Gruppe, bis auf *B. anthracis*, eine starke Expression von Proteinase n, die zu einem Anstieg des pH-Wertes führen und somit auch im Erscheinen typischer pfauenblauer Kolonien auf PEMBA resultieren (Fricker et al., 2007b). Weitere diagnostische Merkmale wie Eigelb-Hydrolyse und Mannitverwertung, die diese Vertreter von *B. cereus* auf PEMBA unterscheidet, weist

B. thuringiensis nicht auf. Er ist nur durch weitergehende Analysen von *B. cereus* differenzierbar (Oxoid, 1993).

Als Alternative zu diesen konventionellen Nährmedien stehen chromogene Nährmedien zur Isolierung und Identifizierung präsumtiver *B. cereus* zur Verfügung. Diese enthalten verschiedene synthetische chromogene Substrate, die durch bestimmte Enzymaktivitäten des Keims gespalten werden und so zu einer spezifischen Färbung der Kolonie führen (Reissbrodt, 2005).

In einer vergleichenden Studie zwischen den konventionellen und den chromogenen Kulturmedien wurde gezeigt, dass Letztere die Diagnostik von *B. cereus* vereinfachen und verbessern können, da sie das Wachstum einer negativ beeinflussenden Begleitflora effektiv unterdrücken. Desweiteren beruht das Nachweisprinzip auf einer einzigen enzymatischen Reaktion, was weniger zweifelhafte Ergebnisse zur Folge hat (Fricker et al., 2007b). Letztendlich aber bedarf es für eine zuverlässige Identifizierung präsumtiver *B. cereus*, insbesondere toxischer Stämme mit atypischen Charakteristika, alternativer, Kultur-unabhängiger Methoden, wie z. B. der Real-Time PCR (Fricker et al., 2007b).

2.6.1.2 Molekularbiologischer Nachweis (Polymerasekettenreaktion)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht enzymatisch die in vitro Herstellung millionenfacher Kopien einer bestimmten Nukleotidsequenz, wodurch auch sehr geringe DNA-Mengen einer Analyse schnell zugänglich sind (Schrimpf, 2002). Für den molekularbiologischen Nachweis von *B. cereus* in Lebensmitteln und anderen Matrices wurden verschiedene PCR-Verfahren entwickelt:

Mittels konventioneller PCR wurde *B. cereus* über die Detektion des *gyrB* - Gens, welches eine Untereinheit der DNA-Gyrase codiert, in Reis identifiziert (Yamada et al., 1999b). Ebenfalls durch die Anwendung einer konventionellen PCR, erfolgte die Bestimmung des Erregers in Trockenmilch über den Nachweis des Cereolysin Ab Gens, welches eine Sphingomyelinase codiert (Kim et al., 2000).

Mittels multiplex PCR-Ligase-detection-reaction (PCR-LDR) und anschließender Sequenzierung der Produkte durch kapillare Elektrophorese wurde *B. cereus* über das 16S rRNA Gen kürzlich in Blut nachgewiesen (Pingle et al., 2007). Ein anderer multiplex PCR - Assay identifizierte *B. cereus* in Lebensmitteln über das *gyrB* und

groEL Gen (Park et al., 2007). Letzteres ist verantwortlich für die Codierung eines Hitzeschockproteins (Gupta, 1995).

2.6.2 Nachweis der Toxinogenität

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von PCR-Assays für die Bestimmung der enterotoxischen und emetische Toxinogenität von *B. cereus* entwickelt. Kenntnisse über die jeweiligen Toxin-codierenden Gene bilden die Grundlage dieser Assays. Die Tabelle 8 gibt einen Überblick über publizierte Arbeiten zum PCR-Nachweis codierender Gene des HBL- und Nhe-Komplexes sowie des emetischen Toxins.

Tab. 8: Übersicht über publizierte PCR-Assays zum Nachweis der enterotoxischen und emetischen Toxinogenität von *B. cereus*.

Toxin / -komplex	Target	Referenzen
HBL-Komplex	<i>hblA</i>	(Heinrichs et al., 1993; Mantynen und Lindstrom, 1998)
	<i>hblC</i>	(Guinebretiere et al., 2002; Moravek et al., 2004; Ryan et al., 1997)
	<i>hblD</i>	(Guinebretiere et al., 2002; Moravek et al., 2004; Ryan et al., 1997)
Nhe-Komplex	<i>nheA</i>	(Granum et al., 1999; Guinebretiere et al., 2002; Moravek et al., 2004)
	<i>nheB</i>	(Dietrich et al., 2005; Granum et al., 1999; Guinebretiere et al., 2002; Moravek et al., 2004)
	<i>nheC</i>	(Dietrich et al., 2005; Granum et al., 1999; Guinebretiere et al., 2002)
Emetisches Toxin	NRPS Gen Fragmente	(Ehling-Schulz et al., 2004b)
	<i>ces</i> [*]	(Fricker et al., 2007a)

^{*} *ces* = codierendes Gen der Cereulid-Synthetase (Fricker et al., 2007a).

Der Vorteil genotypischer Nachweismethoden wie der PCR gegenüber phänotypischen Methoden, liegt in ihrer Unabhängigkeit vom Toxin-

expressionsverhalten des zu untersuchenden Erregers. Die Toxinbildung von *B. cereus* wird entscheidend von Umwelt- und Wachstumsbedingungen beeinflusst (Ehling-Schulz et al., 2004a), so dass letztendlich bei einem negativen Ergebnis in phänotypischen Nachweisverfahren, die Fähigkeit zur Toxinbildung nicht sicher ausgeschlossen werden kann.

2.6.3 Toxinnachweis

2.6.3.1 Biologische Nachweismethoden

Die Pathogenität von *B. cereus* Isolaten kann unter anderem mittels verschiedener Tiermodelle, wie dem Darmschlingen-Ligationstest (Spira und Goepfert, 1972), dem Mäuseletalitätstest (Glatz und Goepfert, 1973), dem Gefäßpermeabilitäts-Reaktionstest (Glatz et al., 1974) sowie dem Affenfütterungstest (Melling et al., 1976) überprüft werden. Diese *in vivo* Verfahren werden jedoch nur noch zur Klärung spezifischer Fragestellungen eingesetzt, da sie mittlerweile durch *in vitro* Bioassays, insbesondere Zellkulturtests abgelöst worden sind.

Unter Verwendung von Vero-Zellen (Affennierenzellen), die als äußerst empfindlich gegenüber von *B. cereus* produzierten toxischen Substanzen gelten, wurde ein sensitiver MTT-Zellkulturtest für den Nachweis von *B. cereus* Diarrhoe Toxin entwickelt (Seidel et al., 1996). Das Prinzip eines MTT-Tests beruht auf einer colorimetrischen Reaktion, bei der durch mitochondriale Enzyme (Dehydrogenasen) der Zielzellen eine Umsetzung des gelbgefärbten Tetrazoliumsalzes MTT zu violetten Formazanen erfolgt. Über die MTT-Formazan Farbreaktion kann der Grad der Zellschädigung nach Ablauf einer spezifischen Inkubationszeit gemessen werden. Jede Schädigung der Zielzellen durch zytotoxische Substanzen reduziert dabei die Spaltung des Tetrazoliumsalzes MTT zu Formazanen und erlaubt durch photometrische Messung der Extinktionen einen objektiven Nachweis (Goodwin et al., 1995).

Basierend auf einer modifizierten simultanen Durchführung des MTT-Tests und der Verwendung von CaCo-2-Zellen (humane Colon-Carcinomzellen), wurde überdies ein Zytotoxizitätstest entwickelt, der einen sensitiven und reproduzierbaren Nachweis von *B. cereus* Diarrhoe Toxin erlaubt (Dietrich et al., 1997). Hierbei wurde jedoch

festgestellt, dass 10 - 20 % der zytotoxischen Aktivität im Zellkulturtest nicht spezifisch für die Toxizität des Diarrhoe Toxins, sondern auf andere Faktoren zurückzuführen sind (Dietrich et al., 1997).

Ein MTT-Test mit CHO-Zellen aus Hamster-Ovarien ermöglicht sowohl den Nachweis des Diarrhoe- als auch des Emetischen - Toxins (Beattie und Williams, 1999), dennoch werden zur Bestimmung der emetischen Zytotoxizität meist humane Larynx-Karzinom-Zellen (HEp-2) herangezogen (Finlay et al., 1999b; Hughes et al., 1988). Diese Zellen erwiesen sich bei der Etablierung eines Zellkulturtests im Vergleich zu Vero- oder Neuro 2A -Zellen (Maus-Nervenzelllinie) als am Besten geeignet (Schulz, 2004).

Als eine Optimierung / Vereinfachung bestehender Hep2/MTT-Tests zum Nachweis des emetischen Toxins wird ein HEp2/MTS-Test angesehen (Burgess und Horwood, 2006). MTT und MTS sind üblich gebräuchliche Tetrazoliumsalze. Im MTT-Test entsteht ein unlösliches, kristallines Formazan-Endprodukt, was einen weiteren Arbeitsschritt bedingt, um das Endprodukt zu lösen bevor die Absorption gemessen werden kann. Das MTS Tetrazoliumsalz wird hingegen zu einem löslichen, wässrigen Formazanprodukt abgebaut, das keiner Löslichmachung mehr bedarf (Buttke et al., 1993).

Neben den verschiedenen Zellkulturtests ist ein Sperma-Bioassay zur Bestimmung der emetischen Toxizität beschrieben. Aufgrund seiner ionophorischen Eigenschaften schädigt das emetische Toxin Mitochondrien und blockiert somit die oxidative Phosphorylierung, die für die Beweglichkeit von Spermien essentiell ist (Andersson et al., 1998; Andersson et al., 2004).

Mit den erwähnten biologischen Nachweisverfahren kann jedoch nur die Gesamttoxizität festgestellt werden, da diese Methoden das emetische bzw. das Diarrhoe-Toxin nicht spezifisch detektieren.

2.6.3.2 Immunochemische Nachweismethoden

Während durch biologische Nachweisverfahren nur die Toxizität festgestellt werden kann, ermöglichen immunochemische Nachweismethoden einen spezifischen Nachweis von *B. cereus* Enterotoxinen. Derzeit sind zwei Verfahren, die auf der Verwendung polyklonaler Antikörper basieren, kommerziell erhältlich. Der BCET-RPLA Toxin- Assay (Oxoid, UK), ein reverser passiver Latexagglutinationstest, weist die L₂ – Komponente des Hämolysin BL-Komplex nach. Das TECRA-BDE Kit (Tecra, Australien), ein Sandwich-ELISA (Enzym-linked Immunosorbent Assay), detektiert die NheA-Komponente des Nhe-Komplexes. Beide Tests zeigen allerdings eine eingeschränkte Spezifität und weisen neben den genannten Toxinkomponenten weitere Exoproteine von *B. cereus* nach (Beecher und Wong, 1994a; Lund und Granum, 1996).

Eine Verbesserung der Spezifität immunochemischer Nachweisverfahren wurde durch die Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen alle drei Komponenten des HBL- sowie des Nhe-Komplexes erreicht (Dietrich et al., 2005; Moravek et al., 2004; Moravek et al., 2006). Darauf folgend wurde ein Schnelltest entwickelt, der jeweils eine Untereinheit des HBL- (L₂) sowie des Nhe- (NheA) Komplexes mittels Goldmarkierter monoklonaler Antikörper nachweist. Bei Vorhandensein von Antigenen reagieren diese in der Reaktionszone des Tests mit Toxin-spezifischen Antikörpern und wandern bis zur Bindungszone. Dort binden sie wiederum an einen zweiten für den jeweiligen Toxinkomplex spezifischen Antikörper. Aufgrund der Gold-Markierung wird dann eine rote Linie sichtbar (Krause et al., 2006).

Die Entwicklung immunochemischer Verfahren für den Nachweis des emetischen Toxins ist bisher fehlgeschlagen, was auf die geringe Antigenität des Cereulids zurückzuführen ist (Ehling-Schulz et al., 2004a; Melling et al., 1976).

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Probenmaterial

In einem Zeitraum von November 2005 bis Oktober 2006 wurden zwölf verschiedene Gewürzsornten untersucht, welche sowohl für die kommerzielle Fleischverarbeitung als auch für den privaten Haushalt relevant sind. Je Gewürzsornte wurden fünf Proben analysiert: je zwei Erzeugnisse aus konventioneller und ökologischer Herstellung sowie ein Erzeugnis aus der Rohstoffproduktion. Die Proben ($n = 60$) wurden in einem bayerischen Gewürzwerk und im lokalen Einzelhandel gezogen. In der Tabelle 9 sind die analysierten Gewürze zusammengefasst dargestellt. Eine detaillierte Übersicht ist im Anhang, Tabelle 30 gegeben.

Tab. 9: Übersicht über die beprobten Gewürze (siehe auch Anhang, Tabelle 30).

Gewürzsornte	Herkunft				
	Konventionelle Herstellung	Ökologische Herstellung			Rohstoffproduktion
		n_1	n_1	n_2	
Basilikum	2	-	2	-	1
Curry	2	1	1	-	1
Ingwer	2	-	1	1	1
Knoblauch	2	-	1	1	1
Koriander	2	-	2	-	1
Kümmel	2	-	2	-	1
Majoran	2	-	1	1	1
Nelken	2	-	2	-	1
Paprika	2	-	-	2	1
Pfeffer, schwarz	2	-	1	1	1
Pfeffer, weiß	2	-	1	1	1
Rosmarin	2	-	2	-	1

n_1 = Erwerb im Supermarkt.

n_2 = Erwerb im Bioladen.

n_3 = Erwerb im Gewürzwerk.

3.1.2 *Bacillus cereus* Isolate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 151 *Bacillus cereus* Isolate aus verschiedenen Gewürzproben (n = 60) hinsichtlich ihrer Toxinogenität und Toxizität untersucht.

3.1.3 Referenzstämme

B. cereus:

- aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig:
 - DSM No. 4312 (emetischer Referenzstamm; NCTC No. 11143)
 - DSM No. 4313 (diarrhöeischer Referenzstamm; NCTC No. 11145)
- aus der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner - Institut, Standort Kulmbach:
 - B 44 (diarrhöeischer Referenzstamm)

B. thuringiensis:

- aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig:
 - DSM No. 2046 (ATTC No. 10792)

3.1.4 Zelllinien

Die Zytotoxizitätstests wurden mit HEP-2 Zellen durchgeführt (humane Larynxkarzinomzellen; ATCC Nr. CCL-23 [Lindl GmbH; Katalognummer 24]).

3.1.5 Materialien und Geräte für kulturelle Verfahren

3.1.5.1 Nährmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

Tab. 10: Übersicht über Art, Herkunft und Einsatz der verwendeten Nährmedien.

Nährmedium	Kurzbezeichnung	Hersteller (Artikelnummer)	Anwendung
Standard I Nähragar	Standard I	Merck (1.07881)	Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl (GKZ)
Desoxycholate – Hydrogen – Sulfide – Lactose – Agar	DHL	Merck (1.14350)	Bestimmung der Anzahl der <i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Bacillus cereus</i> Selektivnährboden mit Polymyxin B und Eigelb (Polymyxin – Pyruvat – Eigelb – Mannit – Bromthymolblau – Agar)	PEMBA	Oxoid (Agar Basis; CM 617); (Supplement; SR 99); (Eigelbemulsion; SR 47)	Bestimmung der Anzahl präsumtiver <i>B. cereus</i>
Trypton - Soja - Bouillon mit Zusatz von 500 000 E. Polymyxin	TSPB	Merck (Bouillon; 1.05459) Sigma (Polymyxin; P 0972)	Anreicherung von <i>B. cereus</i>
Luria Bertani - Bouillon	LBB	Merck (1.10285)	Anzucht der <i>B. cereus</i> Isolate
Hirn-Herz-Bouillon (Brain - heart - infusion)	BHI	Difco / BD (2656120)	Anzucht der diarrhoeischen Referenzstämme; Toxintests
Columbia-Schafblutagar		Oxoid (PB 5039 A)	Beurteilung des Hämolyseverhaltens
Magermilchmedium (Skimmilch - medium)	SMM	Merck (1.15363)	Anzucht der emetischen Referenzstämme; Toxintests
Standard II Nähragar mit Zusatz von 1% Glukose	Standard II	Merck (Agar Basis; 1.07883) (Glukose; 1.08342)	Nachweis der Stärkehydrolyse

3.1.5.2 Chemikalien und Geräte

Drigalski – Spatel [Merck; 321G2186]
Kulturröhrchen, Nennvolumen 20 ml [Schott Duran]
Lugol´sche Lösung [Merck; 1.09261]
Löffelspatel [Merck; 231G1313]
Messpipetten, Nennvolumen 1ml [VWR; 612-1126]
Mixergerät Stomacher® 400 *Circulator* [Seward]
Natriumchlorid [Merck; 1.06404]
Petrischalen [Greiner; 633180]
Petrischalen – Abfüllgerät Technomat [Integra Biosciences]
Platinimpföse [Mebius; 601000]
Pipettierhilfe Pipettus® – accu [Hirschmann Laborgeräte]
Schüttler Unimax 2010 [Heidolph]
Stomacherbeutel mit Filtereinsatz [Interscience; 043809]
Waage MC1 Laboratory LC 820 [Sartorius]
Vortexer Vortex Genie 2 [Bender – Hobein]

3.1.6 Materialien und Geräte für genotypische Verfahren (PCR und Real-Time PCR)

Aqua bidest.
Aqua dest.
Agarose High Resolution [Roth; K297]
Agarose NEE0 [Roth; 2267]
Becherglas, Nennvolumen 100 ml [Schott Duran]
Desoxynucleoside Triphosphate Set (dNTP-Mix) [Pepqab; 20-2010]
DNA – Leiter, 100 bp, äquimolar [Roth; T834.1]
DNA – Leiter, 1 kbp, äquimolar [Roth; Y014.1]
DNA – Isolierungskit E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit [Pepqab; 123450]
DNA – Isolierungskit QIAamp DNA Stool Mini Kit [Qiagen; 51504]
Elektrophoresekammer Agagel Midi [Biometra; 020-000]
Ethanol [Merck; 100983]

Ethidiumbromidgebrauchslösung

- 250 µl Ethidiumbromidlösung 1% [Roth; 2218.2]
- 500 ml Aqua dest.

Faltenfilter MN 615¹/₄ [Macherey – Nagel]

FastDNA® Kit [QBiogene; 6540-400]

FastPrep® Instrument [QBiogene; 6001-120]

Geldokumentationssystem BioDoc Analyze [Whatman Biometra]

Gelloadingpuffer

- 62,5 mg Bromphenolblau [Merck; 159102]
- 62,5 mg Xylencyanol [Merck; 110590]
- 6,25 mg Ficoll [Sigma; F4375]
- ad 250 ml Aqua bidest

Heizblock [VLM]

HotStar Taq Plus DNA Polymerase [Qiagen; 203603]

Löffelspatel [Merck; 231G1313]

Messkolben; Nennvolumen 100 ml und 1000 ml [Schott Duran]

Mikrowelle [Privileg]

Optical Quality Sealing Tape [BioRad; 223-9441]

PCR – Platten, 96-well [neolab; 74210]

Pipette, Volumenbereich 0,1 – 2 µl [Abimed; 14002]

Pipette, Volumenbereich 0,5 – 10 µl [Abimed; 14004]

Pipette, Volumenbereich 2 – 20 µl [Abimed; 14006]

Pipette, Volumenbereich 10 – 100 µl [Abimed; 14008]

Pipette, Volumenbereich 20 – 200 µl [Abimed; 14010]

Pipette, Volumenbereich 100 - 1000 µl [Abimed; 14012]

Pipettenspitzen 0,1 µl [Eppendorf; 300 000.617]

Pipettenspitzen 10 µl [Eppendorf; 612-9451]

Pipettenspitzen 100 µl [Eppendorf; 6129504]

Pipettenspitzen 1000 µl [Eppendorf; 612-9489]

Power Supply [Biometra; PS305T]

Primer 45c1: 5´ - GAG GGG CAA ACA GAA GTG AA -3´ [Biometra]

Primer 45c2: 5´ - TGC GAA CTT TTG ATG ATT CG -3´ [Biometra]

Primer BC1: 5´ - ATT GGT GAC ACC GAT CAA ACA -3´ [Biometra]

Primer BC2r: 5´ - TCA TAC GTA TGG ATG TTA TTC -3´ [Biometra]

Primer EM1F: 5'- GAC AAG AGA AAT TTC TAC GAG CAA GTA CAA T -3'
[Biometra]

Primer EM1R: 5'- GCA GCC TTC CAA TTA CTC CTT CTG CCA CAG T -3'
[Biometra]

Primer HbIA1: 5'- GCT AAT GTA GTT TCA CCT GTA GCA AC -3 [Biometra]

Primer HbIA2: 5'- AAT CAT GCC ACT GCG TGG ACA TAT AA -3' [Biometra]

Primer K5un2: 5'- AGGA-CCAGGATTTACAGGAGGG -3' [Biometra]

Primer K3un2: 5'- GCTGTGACACGAAGGATATAGCCAC (Biometra)

Primer L1A: 5'- AAT CAA GAG CTG TCA CGA AT -3' [Biometra]

Primer L1B: 5'- CAC CAA TTG ACC ATG CTA AT -3' [Biometra]

Primer L2aF: 5'- CGA AAA TTA GGT GCG CAA TC -3' [Biometra]

Primer L2aR: 5'- TAA TAT GCC TTG CGC AGT TG - 3' [Biometra]

Primer nheBC1: 5'- ACA TTG CGA AAG ATA GCT GGA -3' [Biometra]

Primer nheBC2: 5'- TGT TCT GCT GCA AAA GGA TG -3' [Biometra]

Reaktionsgefäße, Nennvolumen 0,2 ml [Biozym; 710920]

Reaktionsgefäße, Nennvolumen 0,5 ml [Biozym; 711090]

Reaktionsgefäße, Nennvolumen 1,5 ml [Eppendorf; 300 120.086]

Reaktionsgefäße, Nennvolumen 2,0 ml [Eppendorf; 300 120.094]

SYBR Green JumpStart™ Taq Ready Mix™ [Sigma; S4438]

Taq DNA Polymerase Set [Peqlab; 01-1030]

TBE – Puffer, 10 x konzentriert [pH 8]

- 890 mM Tris [hydroxymethyl] – aminomethan [Merck; 108382]
- 890 mM Borsäure [Merck; 100165]
- 25 mM EDTA [Merck; 108421]

TBE – Puffer, 1x konzentriert

- 100 ml TBE, 10x konzentriert
- 900 ml Aqua bidest.

TE – Puffer (pH 7,5)

- 10 mM Tris [hydroxymethyl] – aminomethan [Merck; 108382]
- 10 mM EDTA [Merck; 108421]

Thermocycler [BioRad iCycler™, Modell 584BR01839]

Vortexer Vortex Genie 2 [Bender – Hobein]

Waage MC1 Laboratory LC 820 [Sartorius]

Zentrifuge [Eppendorf; Modell 5417C]

3.1.7 Materialien und Geräte für Immunoassays

3.1.7.1 ELISA

Aqua dest.

BDE TECRA Via Test Kit [IUL Instruments; BDEVIA48]

Handdispenser Multipette plus 4981; Eppendorf [VWR; 613-3669]

Dispenser Tips [VWR; 613-1003]

ELISA Plate reader Titertek Multiskan MCC / 340 [Bartolomey Labortechnik]

pH – Indikatorstäbchen [Merck; 9535]

Pipette, Volumenbereich 20 – 200 µl [Abimed; 14010]

Pipette; Volumenbereich 1 – 5 ml [Abimed; 14216]

Pipettenspitzen 200 µl [Eppendorf; 613-3547]

Pipettenspitzen 5 ml [Eppendorf; 612-9459]

3.1.7.2 Reverse Passive Latex Agglutination

BCET-RPLA Test Kit [Oxoid; TD0950A]

Einmalspritzen [Terumo; T05ES]

Handdispenser Multipette plus 4981; Eppendorf [VWR; 613-3669]

Deckel für Mikrotiterplatten [Roth; 9297.1]

Dispenser Tips [VWR; 613-1003]

Mikrotiterplatten, V-Profil [Roth; 929.1]

Pipette, Volumenbereich 10 – 100 µl [Abimed; 14008]

Pipette, Volumenbereich 100 - 1000 µl [Abimed; 14012]

Pipettenspitzen 10 µl [Eppendorf; 612-9451]

Pipettenspitzen 100 µl [Eppendorf; 6129504]

Spritzenvorsatzfilter, steril [Neolab; 79001]

3.1.8 Materialien und Geräte für den MTS- Zellkulturtest

Brutschrank Hera Cells [Heraeus; 510.135.68]

Celltiter 96 Cell Proliferation Assay [Promega; G5421]

Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) [Sigma; D5648]

ELISA Plate Reader [Arthros; 2010]

Einmalspritzen [Terumo; T05ES]

Foetales Kälberserum [Biochrom]

Glutamin [Sigma; G7513]

8-Kanalpipette, Volumenbereich 20 – 300 µl [VWR]

Kohlenstoffdioxid

Mikroskop [Olympus; Modell IMT-2]

Mikrotiterplatten, 96-well; F-Profil [Nunc; 167008]

Phosphat-Buffered Saline (PBS):

- 16,0 g Natriumchlorid [Merck; 106404]
- 2,3 g Di – Natriumhydrogenphosphat [Merck; 106586]
- 0,4g Kaliumchlorid [Riedel de Hæn; 31248]
- 0,4g Kaliumhydrogenphosphat [Merck; 104873]
- 2000 ml Aqua dest.

Pipette, Volumenbereich 10 – 100 µl [Abimed; 14008]

Pipettenspitzen 100 µl [Eppendorf; 6129504]

Pipettenspitzen 1000 µl [Eppendorf; 612-9489]

Platten Schüttler [Titertek]

Spritzenvorsatzfilter, steril [Neolab; 79001]

Triton-X [Sigma; 93426]

Trypsin-EDTA [Sigma; T4174]

Zellkulturflaschen [Nunc; 159910]

Zentrifuge Multifuge [Kendro Heraeus]

3.1.9 Materialien und Geräte für die mikrobiologische Untersuchung marinerter Fleischzubereitungen

3.1.9.1 Probenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben den Gewürzen verschiedene mit Kräutern / Gewürzen marinierte Fleischzubereitungen aus dem Einzelhandel sowie aus eigener Herstellung analysiert.

Einzelhandelsproben

Insgesamt wurden 20 Proben analysiert. Die Proben wurden als Vakuum-verpackte Fertigprodukte im lokalen Einzelhandel erworben. Die Auswahl der Produkte orientierte sich an der Produktpalette der einzelnen Supermärkte. Alle Proben wiesen zum Zeitpunkt des Erwerbs ein gültiges Mindesthaltbarkeitsdatum auf. Die Untersuchung erfolgte direkt im Anschluss an den Probenerwerb und wiederholt nach siebentägiger Kühlung bei 4 °C. Die Tabelle 31 im Anhang gibt eine Übersicht über die analysierten Fleischzubereitungen.

Proben aus eigener Herstellung

Neben den Einzelhandelsproben wurden zudem 20 selbst hergestellte marinierte Fleischzubereitungen analysiert. Insgesamt wurden vier verschiedene Marinaden verwendet, die aus 180 ml Öl und 20 g eines Gewürzes (Basilikum, Curry, Koriander, Kümmel), das eine definierte Anzahl *B. cereus* von 10^3 KbE/g enthielt, hergestellt wurden. Anschließend wurden jeweils fünf Schweineschnitzel (nach vorheriger Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl und *Enterobacteriaceae*) mit einem dieser vier Gewürz-/Öl-Gemische mariniert. Die Schnitzel wurden dann in Stomacherbeuteln Vakuum-verpackt und mit Probennummern (MF21 bis MF40) gekennzeichnet. Bei der Herstellung wurde auf eine gleichmäßige Scheibendicke (ca. 1 bis 2 cm) und ein einheitliches Gewicht (ca. 100g) der Schnitzel geachtet, um repräsentative Vergleichsmöglichkeiten unter den Proben zu gewährleisten. Die Untersuchung erfolgte direkt im Anschluss an die Herstellung und wiederholt nach siebentägiger Kühlung bei 4 °C.

3.1.9.2 Nährmedien

Als Nährmedien wurden Standard I und PEMBA verwendet. Die vollständige Bezeichnung, Herkunft und Anwendungsbereich dieser Nährmedien sind der Tabelle 10 im Abschnitt 3.1.5.1. zu entnehmen.

3.1.9.3 Chemikalien und Geräte

Drigalski – Spatel [Merck; 321G2186]

Kulturröhrchen, Nennvolumen 20 ml [Schott Duran]

Löffelspatel [Merck; 231G1313]

Messpipetten, Nennvolumen 1ml [VWR; 612-1126]

Mixgerät Stomacher® 400 *Circulator* [Seward]

Natriumchlorid [Merck; 1.06404]

Petrischalen [Greiner; 633180]

Petrischalen – Abfüllgerät Technomat [Integra Biosciences]

Platinimpföse [Mibius; 601000]

Pipettierhilfe Pipettus® – accu [Hirschmann Laborgeräte]

Schüttler Unimax 2010 [Heidolph]

Stomacherbeutel mit Filtereinsatz [Interscience; 043809]

Waage MC1 Laboratory LC 820 [Sartorius]

Vortexer Vortex Genie 2 [Bender – Hobein]

3.2 Methodik

Die Abbildung 6 zeigt schematisch den Ablauf der Analyse der Gewürzproben auf den mikrobiologischen Status, eine Kontamination mit *B. cereus* sowie die Charakterisierung des Toxinbildungsvermögens von *Bacillus cereus* Isolaten, die aus diesen Proben gewonnen wurden.

Die angewendeten Untersuchungsverfahren werden nachfolgend im Einzelnen beschrieben.

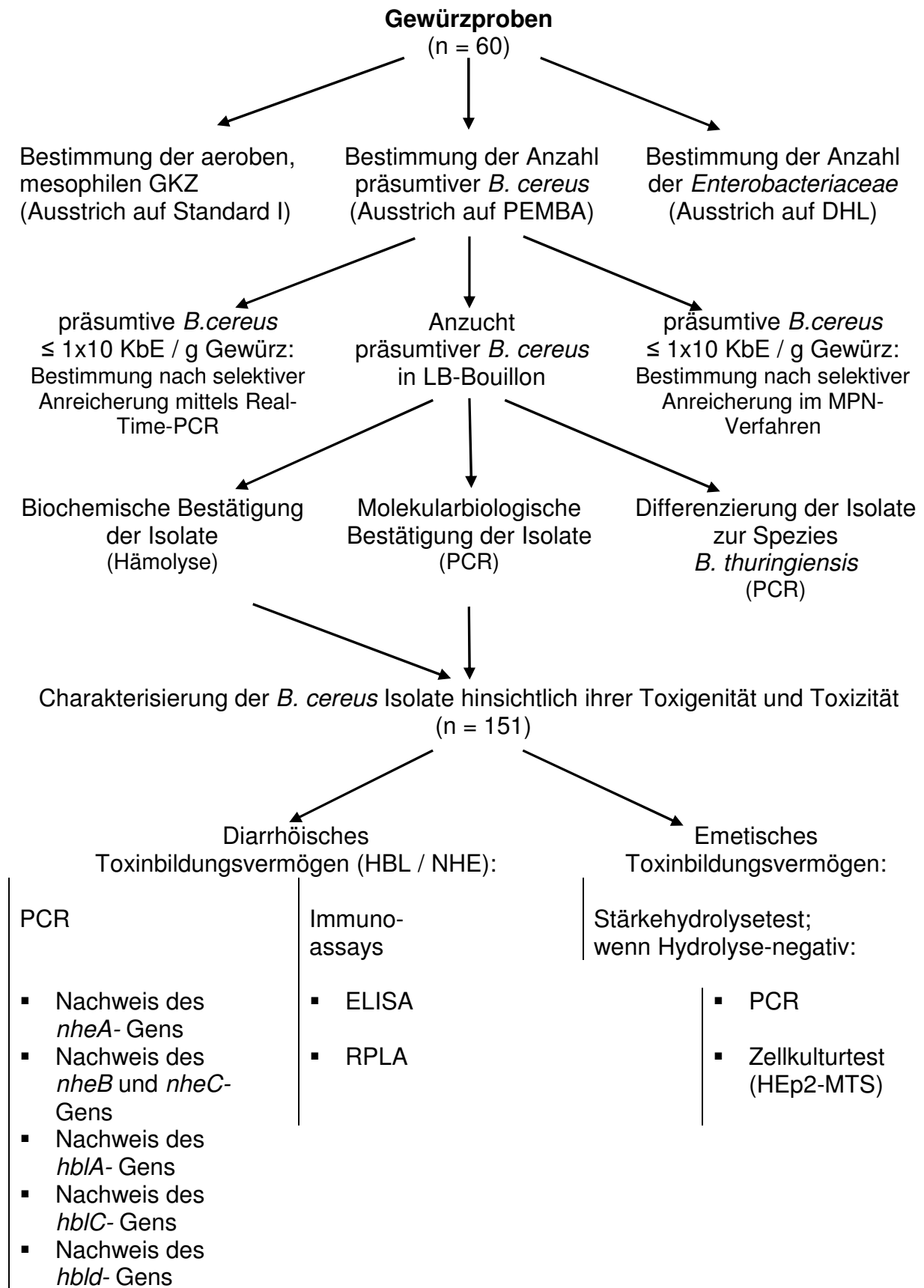


Abb. 6: Schematische Darstellung des Untersuchungsablaufs.

3.2.1 Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl

Für die Bestimmung der aeroben mesophilen GKZ wurden jeweils 5 g Gewürz in einen Stomacherbeutel eingewogen und mit 45 ml 0,85 %iger Kochsalzlösung ca. zwei Minuten homogenisiert. Anschließend wurde aus dem Homogenat (Anschüttelung) eine dezimale Verdünnungsreihe hergestellt. Je 0,1 ml des Homogenats und der Verdünnungsstufen 10^2 und 10^3 wurden auf Standard I Agar im Doppelansatz ausplattiert und für 48 h bei 30 °C inkubiert.

Nach Abschluss der Bebrütung wurden die Kolonien in den einzelnen Verdünnungsstufen ausgezählt und die Keimzahl anhand des gewichteten arithmetischen Mittels bestimmt. Hierbei wird die Summe aller ausgezählten Kolonien durch die Summe der untersuchten Substratmengen nach folgender Zahlengleichung dividiert:

$$c = \frac{\Sigma c}{n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0,1} \cdot d$$

- c Anzahl der Keime je g
- Σc Summe der typischen bzw. bestätigten Kolonien aller Petrischalen, die zur Berechnung herangezogen wurden
- n_1 Anzahl der Petrischalen der niedrigsten Verdünnungsstufe, die zur Berechnung herangezogen wurden
- n_2 Anzahl der Petrischalen der nächsthöheren Verdünnungsstufe, die zur Berechnung herangezogen wurden
- d Verdünnungsfaktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe; hierbei handelt es sich um die auf n_1 bezogene Verdünnungsstufe.

3.2.2 Bestimmung der Anzahl der *Enterobacteriaceae*

Zur Bestimmung der Anzahl der *Enterobacteriaceae* in den Gewürzproben wurden je 0,1 ml der Anschüttelung aus Abschnitt 3.2.1. und der Verdünnungsstufe 10^{-2} auf DHL – Agar ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 30 °C, erfolgte die Auszählung der Kolonien in den einzelnen Verdünnungsstufen. Für die Auswertung wurde das gewogene arithmetische Mittel verwendet (siehe 3.2.1.).

3.2.3 Bestimmung präsumtiver *B. cereus*

3.2.3.1 Nach Methode L.00.0025 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB

Die Bestimmung präsumtiver *B. cereus* erfolgte über die Methode L.00.0025 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB:

Je Probe wurden 0,1 ml der Anschüttelung (Kapitel 3.2.1.) sowie der Verdünnungen 10^{-2} bis 10^{-5} auf PEMBA im Doppelansatz ausplattiert. Die beimpften Platten wurden anschließend bei 37 °C für 24 h bebrütet. Falls die Kolonien nach dieser Zeit noch nicht eindeutig zu beurteilen waren, erfolgte eine weitere Bebrütung bis zu 24 h bei Raumtemperatur. Nach Abschluss der Inkubation wurden typische Kolonien ausgezählt. Auf PEMBA sind typische Kolonien präsumtiver *B. cereus* etwa 2 bis 5 mm groß, zeigen einen unregelmäßig gekerbten bis wurzelartigen Rand und eine blaue bis blaugrüne Farbe. Sie weisen einen bis zu 5 mm breiten Präzipitathof (Eigelbreaktion) auf (siehe 2.5.1.1.).

Aus der Anzahl typischer Kolonien wurde anschließend die Anzahl präsumtiver *B. cereus* je g der Probe berechnet. Hierzu wurde das gewichtete arithmetische Mittel herangezogen (siehe 3.2.1.).

Für den weiteren Untersuchungsgang wurden die präsumtiven Kolonien mit einer Impföse abgenommen und in LB – Bouillon überführt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C erfolgte eine Gefriertrocknung der Isolate. Auf diese Kulturen wurde für alle Fragestellungen zurückgegriffen:

Die gefriergetrockneten Isolate wurden dann in 2 ml LB- Bouillon resuspendiert und über Nacht bei Raumtemperatur rekultiviert. Anschließend erfolgte ein Ausstrich der

Suspension auf Standard I – Agar und eine Inkubation für 18 h bei 37 °C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde Koloniematerial der Isolate abgeimpft und in das der jeweiligen Analyse entsprechende Medium überführt.

3.2.3.2 Nach selektiver Anreicherung im MPN-Verfahren (Most Probable Number)

Gewürzproben mit einer geringen Kontamination von präsumtiven *B. cereus* ($\leq 1 \times 10$ KbE/g), wurden zusätzlich nach selektiver Anreicherung im MPN – Verfahren analysiert. Das Verfahren wurde in Anlehnung an die Methode L.01.0053 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB durchgeführt:

Jeweils 5 g Gewürz wurden in einen Stomacherbeutel eingewogen und mit 45 ml 0,85%iger Kochsalzlösung ca. zwei Minuten homogenisiert. Anschließend wurde aus dieser Anschüttelung eine dezimale Verdünnungsreihe hergestellt.

Zur Anreicherung präsumtiver *B. cereus* wurden drei Kulturröhrchen, die TSPB doppelter Konzentration enthielten, mit je 10 ml der Anschüttelung beimpft (= 10^1 Verdünnung). Zudem wurden jeweils drei Kulturröhrchen mit einfach konzentrierter TSPB mit 1 ml der Anschüttelung (= 10^{-1} Verdünnung) bzw. der weiteren Verdünnung (= 10^{-2} Verdünnung) beimpft. Die beimpften Kulturröhrchen wurden für 48 h bei 30 °C bebrütet.

Anschließend wurde aus jedem Röhrchen jeweils eine Impföse der angereicherten Kultur auf einem von drei Sektoren einer Platte mit PEMBA ausgestrichen und 18 bis 24 h bei 37 °C bebrütet. Nach Abschluss der Bebrütung wurden die einzelnen Sektoren auf die Anwesenheit typischer Kolonien untersucht (siehe 3.2.3.1.).

Zur Berechnung der Anzahl präsumtiver *B. cereus* wurde aus der Anzahl positiver Ergebnisse (Sektoren) je Verdünnungsstufe eine Indexziffer (L.01.0053; §64 LFGB) gebildet. Aus der MPN – Tabelle für Verdünnungsreihen mit dreifachem Ansatz wurde die zur Indexziffer gehörige wahrscheinlichste Anzahl präsumtiver *B. cereus* entnommen. Die Anzahl präsumtiver *B. cereus* je g Probe wurde durch Multiplikation der wahrscheinlichsten Anzahl mit dem Verdünnungsfaktor der niedrigsten positiven Verdünnungsstufe erhalten.

3.2.3.3 Nach selektiver Anreicherung mittels Real-Time PCR

Parallel zum MPN-Verfahren wurden alle Gewürzproben mit einer Anzahl präsumtiver *B. cereus* $\leq 1 \times 10$ KbE/g, nach selektiver Anreicherung mittels Real-Time PCR auf das Vorkommen von *B. cereus* analysiert. Das Real-Time PCR Protokoll wurde als Alternative zu dem sehr zeitaufwendigen und diagnostisch ungenauen MPN-Verfahren, für eine schnelle und zuverlässige Identifizierung des Erregers in Gewürzproben erarbeitet. Dabei wurde zunächst eine effektive Methode zur Sporenanalyse etabliert, um auch die DNA noch versporter *B. cereus* isolieren / erfassen zu können. Zudem wurde die DNA-Extraktion dahingehend optimiert, dass das Template frei von PCR-Inhibitoren war, die auf Verunreinigungen durch Gewürze zurückzuführen waren.

Die Real-Time PCR basiert auf dem Nachweis eines für die Spezies *B. cereus* spezifischen Fragments des Gyrase B Gens (*gyrB*), das die Untereinheit B-Protein der DNA Gyrase (Topoisomerase Typ II) codiert. Die verwendeten Primer sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

Tab. 10. Primer für den *B. cereus* Spezies-Nachweis.

Gen	Primer	Produkt	Referenz
<i>gyrB</i>	BC1 BC2R	365 bp	(Yamada et al., 1999a)

3.2.3.3.1 Anreicherung

Zur Anreicherung möglicher *B. cereus* wurden jeweils 5 g Gewürz in einen Stomacherbeutel eingewogen und mit 45 ml einfach konzentrierter TSPB ca. zwei Minuten homogenisiert. Anschließend wurde diese Anschüttelung für 24 h bei 30 °C bebrütet.

3.2.3.3.2 Sporen-Lyse und DNA-Extraktion

Nach Ablauf der Inkubationszeit, wurden die angereicherten Proben mittels Faltenfilter filtriert und 1 ml des Filtrats bei 15 000 x *g* für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl A. bidest resuspendiert und in ein Lysing Matrix E Tube® überführt (Fast DNA-Kit; QBiogene). Nach Zugabe von 1 ml CLS-TC Lysepuffer (Fast DNA-Kit; QBiogene) erfolgte eine Homogenisation der Probe im FastPrep-Instrument® bei einer Bearbeitungsstärke von 6,0 für 40 Sekunden. Das Homogenat wurde für 5 min bei 14 000 x *g* zentrifugiert und der Überstand in ein 2 ml Eppendorf Cup überführt. Die nachfolgenden Schritte wurden unter Verwendung des QIAamp® DNA Stool Kits (Quiagen) durchgeführt. Zum Homogenat wurde eine äquivalente Menge Lysozym hinzugegeben und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde zum Homogenat eine Tablette InhibitEx dazugegeben und ca. 1 min bis zur vollständigen Auflösung der Tablette kontinuierlich gevortext. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für eine Minute, wurde die Suspension bei 15 000 x *g* für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in 15 µl Proteinase K resuspendiert, mit 200 µl AL-Puffer versetzt und der Ansatz für 60 min bei 55 °C inkubiert. Nachfolgend wurden 220 µl Ethanol dazu pipettiert und der gesamte Ansatz auf eine Zentrifugensäule geladen. Die Säule wurde für 1 min bei 8000 x *g* zentrifugiert und das Eluat verworfen.

In zwei anschließenden Waschschritten wurden jeweils 500 µl Waschpuffer (AW1 bzw. AW2) auf die Säule pipettiert und diese für 1 bzw. 3 min bei 8000 x *g* zentrifugiert. Nach Verwerfen des Säulendurchfluß erfolgte die Elution der DNA. Hierfür wurden 50 µl Elutionspuffer direkt auf die Säulenmatrix pipettiert, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 1 min bei 8000 x *g* zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Elution mit weiteren 50 µl Elutionspuffer wiederholt. Das Eluat, das die aufgereinigte DNA enthielt, wurde in die anschließende Real-Time PCR eingesetzt.

3.2.3.3.3 Durchführung der Real-Time PCR

Die PCR-Analysen wurden mit einem Reaktionsvolumen von 25 µl pro Ansatz durchgeführt, der 20 µl Mastermix und 5 µl genomische DNA des zu untersuchenden Isolates umfasste (Tab. 11).

Tab. 11: Reaktionsansatz für den *B. cereus* Nachweis mittels Real-Time PCR nach Yamada et al. (1999).

Volumen	Reagenz
12,5 µl	SYBR Green Mix
0,25 µl	Internal Reference Dye
0,125 µl	Primer BC1 (0,1 nmol / µl)
0,125 µl	Primer BC2r (0,1 nmol / µl)
7,0 µl	Aqua bidest.
+ 5 µl Proben-DNA	
bzw.	
Positivkontrolle: 5 µl DNA-Extrakt des Referenzstammes <i>B. cereus</i> 4313	
bzw.	
Negativkontrolle: 5 µl Aqua bidest.	

Die Reagenzien des Mastermix wurden zusammenpipettiert und durch Vortexen sorgfältig durchmischt. Anschließend wurde der Mastermix auf die Reaktionsgefäße (96 well PCR-Platte) verteilt und der DNA-Extrakt der jeweiligen Probe zugegeben. Bei allen Analysen wurde eine Positivkontrolle (DNA-Extrakt des Referenzstammes *B. cereus* 4313) und eine Negativkontrolle (Aqua bidest.) mitgeführt.

Die Tabelle 12 zeigt das Protokoll der anschließenden thermozyklischen Reaktion.

Tab. 12: PCR-Cyclerprofil für den *B. cereus* Nachweis mittels Real-Time PCR nach Yamada et al. (1999).

Anzahl der Zyklen	PCR-Step	Zeit-Temperatur-Profil
1x	Initiale Denaturierung	5 min bei 95 °C
1x	Initiale Denaturierung	1 min bei 94 °C
35x	Denaturierung	1 min bei 94 °C
	Annealing	1,5 min bei 58 °C
	Elongation	2,5 min bei 72 °C
1x	Finale Extension	5 min bei 72 °C
1x	Schmelzpunktanalyse	1 min bei 42 °C
110x	Schmelzpunktanalyse	10 sec bei 42 +0,5°C

Die Auswertung erfolgte über die jeweilige Schmelzpunktcurve der PCR-Produkte.

3.2.4 Bestätigung präsumtiver *B. cereus* Isolate

3.2.4.1 Biochemische Bestätigung (Hämolyse)

Eine biochemische Bestätigung der präsumtiven Isolate aus 3.2.3.1. zur Spezies *B. cereus* erfolgte durch Hämolyse auf Blutagar (Sneath et al., 1996b). Hierfür wurden die Isolate auf Schafblutagar ausgestrichen und für 20 – 24 h bei 37 °C inkubiert. Als positiv wurden die Isolate beurteilt, die eine scharfrandige ausgeprägte β -Hämolyse zeigten (Abb. 7).

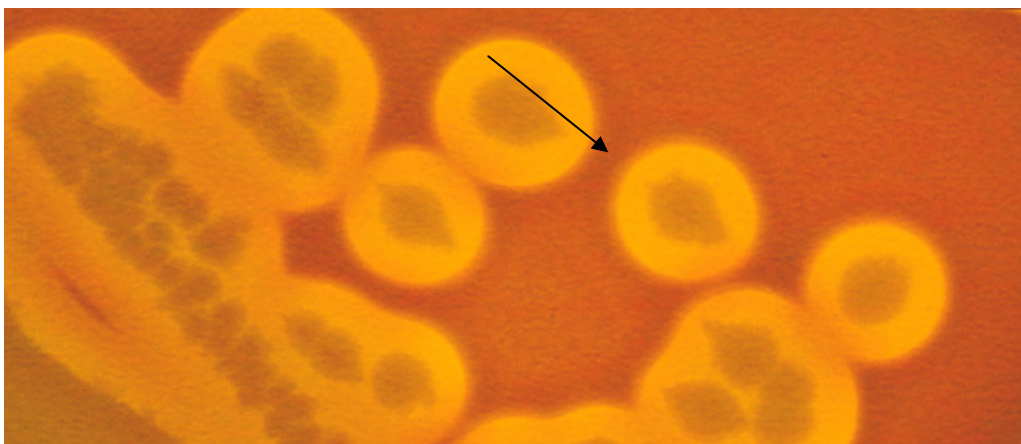


Abb. 7: Scharfrandige, ausgeprägte β -Hämolyse von *B. cereus* auf Schafblutagar.
Der Pfeil markiert eine charakteristische Kolonie (Bildquelle: Max Rubner – Institut, Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie).

3.2.4.2 Molekularbiologische Bestätigung (PCR)

Alle Isolate aus Kapitel 3.2.3.1. wurden zudem molekularbiologisch auf Zugehörigkeit zur Spezies *B. cereus* mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Yamada et al. (1999) überprüft. Diese PCR basiert auf dem Nachweis eines für die Spezies *B. cereus* spezifischen Fragments des Gyrase B Gens (*gyrB*), das die Untereinheit B-Protein der DNA Gyrase (Topoisomerase Typ II) codiert.

Die verwendeten Primer sind der Tabelle 13 zu entnehmen.

Tab. 13. Primer für den *B. cereus* Spezies-Nachweis.

Gen	Primer	Produkt	Referenz
<i>gyrB</i>	BC1 BC2R	365 bp	(Yamada et al., 1999a)

3.2.4.2.1 DNA – Extraktion

Die Extraktion der genomischen DNA aus den Isolaten wurde unter Verwendung des E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit von Peqlab durchgeführt. Hierfür wurden die Isolate in LB – Bouillon für 18h bei 37 °C inkubiert, von der Kultur 1 ml in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und durch Zentrifugation für 10 min bei 4000 x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl TE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl einer Lysozymlösung (10 mg / ml) wurde die Suspension für 1h bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl BTL-Puffer mit 25 µl OB-Protease resuspendiert und zur vollständigen Lyse der Bakterien der Ansatz für 1h bei 55 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte ein RNA-Verdau durch Zugabe von 10 µl RNase für zwei Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 220 µl BDL-Puffer zugegeben und der Ansatz für 10 min bei 70 °C inkubiert. Nachfolgend wurden 220 µl Ethanol dazu pipettiert und der gesamte Ansatz auf eine Zentrifugensäule geladen. Die Säule wurde für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert und das Eluat verworfen.

In zwei anschließenden Waschschritten wurden jeweils 750 µl Waschpuffer auf die Säule pipettiert und diese für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des

Säulendurchfluß erfolgte die Elution der DNA. Hierfür wurden 100 µl Elutionspuffer direkt auf die Säulenmatrix pipettiert, für 1 Minute bei 70 °C inkubiert und für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Elution mit weiteren 100 µl Elutionspuffer wiederholt. Das Eluat, das die aufgereinigte DNA enthielt, wurde für die PCR – Analysen verwendet.

3.2.4.2.2 Durchführung der PCR

Die PCR-Analysen wurden mit einem Reaktionsvolumen von 50 µl pro Ansatz durchgeführt, der 45 µl Mastermix und 5 µl DNA-Extrakt des zu untersuchenden Isolates umfasste (Tab. 14).

Tab. 14: Reaktionsansatz für den *B. cereus* Speziesnachweis mittels PCR nach Yamada et al. (1999).

Volumen	Reagenz
5 µl	10 x PCR-Puffer S
4 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1 µl	dNTP-Mix (40 mM)
0,25 µl	Primer BC1 (0,1 nmol / µl)
0,25 µl	Primer BC2r (0,1 nmol / µl)
0,25 µl	Taq Polymerase (5U / µl)
34,25 µl	Aqua bidest.
+ 5 µl Proben-DNA	
bzw.	
Positivkontrolle: 5 µl DNA-Extrakt des Referenzstammes <i>B. cereus</i> 4313	
bzw.	
Negativkontrolle: 5 µl Aqua bidest.	

Die Reagenzien des Mastermix wurden zusammenpipettiert und durch Vortexen sorgfältig durchmischt. Anschließend wurde der Mastermix auf die Reaktionsgefäße verteilt und der DNA-Extrakt der jeweiligen Probe zugegeben. Bei allen PCR-

Analysen wurde eine Positivkontrolle (DNA-Extrakt des Referenzstammes *B. cereus* 4313) und eine Negativkontrolle (Aqua bidest.) mitgeführt.

Die Tabelle 15 zeigt das Protokoll der anschließenden thermozyklischen Reaktion.

Tab. 15: PCR-Cyclerprofil für den *B. cereus* Speziesnachweis mittels PCR nach Yamada et al. (1999).

Anzahl der Zyklen	PCR-Step	Zeit-Temperatur-Profil
1x	Initiale Denaturierung	5 min bei 95 °C
35x	Denaturierung	1 min bei 94 °C
	Annealing	1,5 min bei 58 °C
	Elongation	2,5 min bei 72 °C
1x	Finale Extension	5 min bei 72 °C

Im Anschluss an die PCR wurden die Amplifikate zur Visualisierung und Auswertung in eine Gelelektrophorese eingesetzt. Hierfür wurde jede Probe mit 5 µl Gel-Loading Puffer versetzt und anschließend jeweils 10 µl dieser Proben-Puffer-Mischung auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen. In die erste Proben tasche auf dem Gel wurden jeweils 5 µl eines DNA-Längenstandards eingebracht.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Amplifikate und des Längenstandards bei 125 V wurde das Gel für 15 min in Ethidiumbromid gefärbt und anschließend 10 min in Aqua dest gewaschen. Die aufgetrennten PCR-Produkte wurden dann im Transilluminator unter UV-Licht sichtbar gemacht und ausgewertet.

Die Isolate wurden als *B. cereus* bestimmt, wenn sie eine Bande bei 365 bp zeigten.

3.2.4.3 Differenzierung zwischen *B. cereus* und *B. thuringiensis*

Da *B. cereus* von *B. thuringiensis* auf PEMBA nicht zu unterscheiden ist (Oxoid, 1993), wurden alle präsumtiven Isolate, die in der *B. cereus*-PCR eine negative Reaktion zeigten, in eine *B. thuringiensis* speziesspezifische PCR eingesetzt (Kuo und Chak, 1996). Diese PCR weist Gensequenzen der für *B. thuringiensis* spezifischen insektiziden Kristallproteine (*Crystal proteins*) nach (Bulla, Jr. et al., 1980).

Die verwendeten Primer sind in der Tabelle 16 angegeben.

Tab. 16: Primer für die *B. thuringiensis*-PCR.

Gen	Primer	Produkt	Referenz
<i>cryI und</i>	K5un2	ca. 1600 bp	(Kuo und Chak, 1996)
<i>cryIII</i>	K3un2		

Die PCR wurde mit einem Reaktionsvolumen von 50 µl pro Ansatz durchgeführt, der 45 µl Mastermix und 5 µl DNA-Extrakt (siehe 3.2.5.1.) des zu untersuchenden Isolates umfasste (Tab. 17).

Tab. 17: PCR- Reaktionsansatz zum *B. thuringiensis*-Nachweis (Kuo und Chak, 1996)

Volumen	Reagenz
5 µl	10 x PCR-Puffer S
4 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1 µl	dNTP-Mix (40 mM)
0,25 µl	Primer K5un2 (0,1 nmol / µl)
0,25 µl	Primer K3un2 (0,1 nmol / µl)
0,25 µl	Taq Polymerase (5U / µl)
34,25 µl	Aqua bidest.
+ 5 µl Proben-DNA bzw.	
+ Positivkontrolle: 5µl DNA-Extrakt des Referenzstammes <i>B. thuringiensis</i> 2046 bzw.	
+ Negativkontrolle: 5 µl Aqua bidest	

Die Bedingungen der Amplifikation sind in der Tabelle 18 angegeben.

Tab. 18: Cyclerprogramm für die PCR zum Nachweis von *B. thuringiensis* nach Kuo und Chak (1996).

Anzahl der Zyklen	PCR-Step	Zeit-Temperatur-Profil
1x	Initiale Denaturierung	5 min bei 95 °C
30x	Denaturierung	1 min bei 94 °C
	Annealing	2 min bei 52 °C
	Elongation	1,5 min bei 72 °C

Im Anschluss an die PCR wurden die Amplifikate mittels Gelelektrophorese sowie Ethidiumbromidfärbung visualisiert und ausgewertet (siehe 3.2.5.3.).

Als *B. thuringiensis* wurden diejenigen Isolate gewertet, die eine Bande bei 1600 bp zeigten.

3.2.5 Charakterisierung des Toxinbildungsvermögens

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden je Gewürzprobe bis zu zehn bestätigte *B. cereus* Isolate hinsichtlich ihres diarrhöischen und emetischen Toxinbildungsvermögens charakterisiert.

3.2.5.1 Diarrhäische Form

3.2.5.1.1 PCR

Mittels PCR-Analysen wurden die codierenden Gene der diarrhäischen Enterotoxine Hämolysin BL (*hbl*-Operon) und Non-hemolytic-Enterotoxin (*nhe*-Operon) nachgewiesen. Die entsprechenden PCR-Protokolle sind den Abschnitten 3.2.5.1.1.1. bis 3.2.5.1.1.5. zu entnehmen. Die DNA-Isolierung sowie der Nachweis der Amplifikate erfolgten nach der Beschreibung in Abschnitt 3.2.4.2. Die Tabelle 19 gibt eine Übersicht über die verwendeten Primer.

Tab. 19: Primer für den Nachweis von Genen des *hbl*-Operons und *nhe*-Operons.

Gen	Primer	Produkt	Referenz
<i>hblA</i>	HblA1	883 bp	(Mantynen und Lindstrom, 1998)
	HblA2		
<i>hblC</i>	L2aF	411 bp	(Moravek et al., 2004)
	L2aR		
<i>hblD</i>	L1A	417 bp	(Ryan et al., 1997)
	L1B		
<i>nheA</i>	45c1	186 bp	(Moravek et al., 2004)
	45c2		
<i>nheB/C</i>	nheBC1	300 bp	(Dietrich et al., 1999)
	nheBC2		

3.2.5.1.1.1 Nachweis des *hblA*-Gens

Der Nachweis des *hblA*-Gens, das die B-Komponente des HBL Enterotoxin-Komplexes codiert (Heinrichs et al., 1993), erfolgte mittels PCR nach Mantynen und Lindström (1996). In Tabelle 20 sind der Reaktionsansatz und das Cyclerprogramm für diese PCR angegeben.

Tab. 20: Reaktionsansatz und Cyclerprogramm für den Nachweis des *hblA*-Gens mittels PCR nach Mantynen und Lindström (1996).

PCR-Reaktionsansatz		
5 µl	10 x PCR-Puffer Y	
4 µl	MgCl ₂ (25 mM)	
1 µl	dNTP-Mix (40 mM)	
0,25 µl	Primer HblA1 (0,1 nmol / µl)	
0,25 µl	Primer HblA2 (0,1 nmol / µl)	
0,25 µl	Taq Polymerase (5U / µl)	
34,25 µl	Aqua bidest.	
+ 5 µl Proben-DNA		
bzw.		
Positivkontrolle: 5µl DNA-Extrakt des Referenzstammes <i>B. cereus</i> B44		
bzw.		
Negativkontrolle: 5 µl Aqua bidest.		
PCR-Cyclerprogramm		
Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
5x	94 °C	0,5 min
	70 °C	1 min
	72 °C	1,5 min
30x	94 °C	0,5 min
	65 °C	1 min
	72 °C	1,5 min

Isolate wurden als positiv gewertet, wenn sie eine Bande bei 883 bp zeigten.

3.2.5.1.1.2 Nachweis des *hblC*-Gens

Das *hblC*-Gen codiert die L₂ Komponente des HBL Enterotoxin-Komplexes (Ryan et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Gen mit einer PCR-Analyse nach Moravek et al. (2004) nachgewiesen. Der Reaktionsansatz und das Cyclerprogramm für die PCR sind Tabelle 21 zu entnehmen.

Tab. 21: Reaktionsansatz und Cyclerprogramm für den Nachweis des *hblC*-Gens mittels PCR nach Moravek et al. (2004).

PCR-Reaktionsansatz		
5 µl	10 x PCR-Puffer Y	
4 µl	MgCl ₂ (25 mM)	
1 µl	dNTP-Mix (40 mM)	
0,25 µl	Primer L2aF (0,1 nmol / µl)	
0,25 µl	Primer L2aR (0,1 nmol / µl)	
0,25 µl	Taq Polymerase (5U / µl)	
34,25 µl	Aqua bidest.	
+ 5 µl Proben-DNA		
bzw.		
Positivkontrolle: 5 µl DNA-Extrakt des Referenzstammes <i>B. cereus</i> B44		
bzw.		
Negativkontrolle: 5 µl Aqua bidest.		
PCR-Cyclerprogramm		
Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1x	95 °C	5 min
35x	94 °C	1 min
	51 °C	1 min
	72 °C	1 min

Als positiv wurden diejenigen Isolate beurteilt, die eine Bande bei 411 bp aufwiesen.

3.2.5.1.1.3 Nachweis des *hbID*-Gens

Der Nachweis des *hbID*-Gens, das die L₁-Komponente des HBL Enterotoxin-Komplexes codiert (Ryan et al., 1997), wurde mit einer PCR nach Ryan et al. (1997) durchgeführt. Die Tabelle 22 zeigt den Reaktionsansatz und das Cyclerprogramm für diese PCR.

Tab. 22: Reaktionsansatz und Cyclerprogramm für den Nachweis des *hbID*-Gens mittels PCR nach Ryan et al. (1997).

PCR-Reaktionsansatz	
5 µl	10 x PCR-Puffer S
3 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1 µl	dNTP-Mix (40 mM)
0,125 µl	Primer L1A (0,1 nmol / µl)
0,125 µl	Primer L1B (0,1 nmol / µl)
0,3 µl	Taq Polymerase (5U / ml)
35,45 µl	Aqua bidest.
+ 5 µl Proben-DNA	
bzw.	
Positivkontrolle: 5 µl DNA-Extrakt des Referenzstammes <i>B. cereus</i> B44	
bzw.	
Negativkontrolle: 5 µl Aqua bidest.	

PCR-Cyclerprogramm		
Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1x	95 °C	5 min
33x	95 °C	1 min
	56 °C	1 min
	72 °C	2 min
1x	72 °C	10 min

Isolate, die eine Bande bei 417 bp zeigten, wurden als positiv charakterisiert.

3.2.5.1.1.4 Nachweis des *nheA*-Gens

Das *nheA*-Gen, das die gleichnamige Komponente des Nhe-Enterotoxin-Komplexes codiert (Lund und Granum, 1996b), wurde mittels PCR nach Moravek et al. (2004) nachgewiesen. Der Reaktionsansatz und das Cyclerprogramm für diese PCR sind Tabelle 23 zu entnehmen.

Tab. 23: Reaktionsansatz und Cyclerprogramm für den Nachweis des *nheA*-Gens mittels PCR nach Moravek et al. (2004).

PCR-Reaktionsansatz	
5 µl	10 x PCR-Puffer Y
3 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1 µl	dNTP-Mix (40 mM)
0,125 µl	Primer 45c1 (0,1 nmol / µl)
0,125 µl	Primer 45c1 (0,1 nmol / µl)
0,3 µl	Taq Polymerase (5U / µl)
35,45 µl	Aqua bidest.
+ 5 µl Proben-DNA	
bzw.	
Positivkontrolle: 5 µl DNA-Extrakt des Referenzstammes <i>B. cereus</i> 4313	
bzw.	
Negativkontrolle: 5 µl Aqua bidest.	

PCR-Cyclerprogramm		
Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1x	95 °C	5 min
30x	94 °C	1 min
	52 °C	1 min
	72 °C	1 min

Als positiv wurden diejenigen Isolate eingeordnet, die eine Bande bei 186 bp zeigten.

3.2.5.1.1.5 Nachweis des *nheB*- und *nheC*-Gens

Die *nheB*- und *nheC*- Komponente des Nhe-Enterotoxin-Komplex werden durch die Gene *nheB* bzw. *nheC* codiert (Lund und Granum, 1996). Der Nachweis beider Gene erfolgte in einer PCR-Analyse nach Dietrich et al. (1999). In Tabelle 24 sind der Reaktionsansatz und das Cyclerprogramm für diese PCR angegeben.

Tab. 24: Reaktionsansatz und Cyclerprogramm für den Nachweis des *nheB*- und *nheC*-Gens mittels PCR nach Dietrich et al. (1999).

PCR-Reaktionsansatz	
5 µl	10 x PCR-Puffer Y
3 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1 µl	dNTP-Mix (40 mM)
0,125 µl	Primer <i>nheBC1</i> (0,1 nmol / µl)
0,125 µl	Primer <i>nheBC2</i> (0,1 nmol / µl)
0,3 µl	Taq Polymerase (5U / µl)
34,25 µl	Aqua bidest.
+ 5 µl Proben-DNA	
bzw.	
Positivkontrolle: 5 µl DNA-Extrakt des Referenzstammes <i>B. cereus</i> 4313	
bzw.	
Negativkontrolle: 5 µl Aqua bidest.	

PCR-Cyclerprogramm		
Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1x	95 °C	5 min
35x	94 °C	1 min
	48 °C	1 min
	72 °C	2 min

Die Isolate wurden als positiv gewertet, wenn sie eine Bande bei 300 bp aufwiesen.

3.2.5.1.2 Immunoassays (ELISA, RPLA)

Für den direkten Nachweis von Enterotoxin-Komponenten der Diarrhöe-Form wurden alle *B. cereus* Isolate in zwei kommerzielle Immunoassays eingesetzt (Tecra-ELISA und Oxoid BCET-RPLA Kit).

ELISA

Das Tecra Kit, ein Sandwich – Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), weist die *nheA*-Komponente des Non-Hemolytic Enterotoxin-Komplex (Nhe) nach (Lund und Granum, 1996b).

Die Durchführung des ELISA erfolgte nach Herstellerangaben. Hierfür wurden ca. zwei bis drei Kolonien des zu analysierenden Isolats in 10 ml BHI überführt und für 18 h bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 10 min bei 2000 x g zentrifugiert, 5 ml des Überstandes abgenommen und 50 µl Sample Additive hinzugegeben. 200 µl dieses Probengemischs wurden dann in die mit BDE-Antikörpern beschichteten Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden 200 µl Konjugat zu jeder Probe zugegeben und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten fünf weitere Waschschriffe. Im Anschluss wurden 200 µl Substrat zu jeder Probe pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der ELISA unter Verwendung eines Plate Readers photometrisch bei einer Wellenlänge von 410 nm ausgewertet.

Der Test wurde als auswertbar angesehen, wenn die mitgeführte Positivkontrolle (interner Standard) eine Absorption $\geq 1,0$ und die Negativkontrolle eine Absorption $\leq 0,2$ aufwiesen. Eine Probe wurde als BDE-positiv gewertet, wenn der abgelesene Messwert $\geq 0,2$ betrug.

Reverse Passive Latex Agglutination

Das BCET-RPLA Kit detektiert über eine Reverse Passive Latex Agglutination (RPLA) die L₂ – Komponente des Hämolyisin BL Enterotoxin – Komplex (HBL) (Beecher und Wong, 1994a).

Der BCET-RPLA Test wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde ca. eine Impföse des zu untersuchenden Isolats in 10 ml BHI überführt und für 18 h bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Die Kultur wurde dann durch einen Membranfilter steril filtriert. Anschließend wurden 25 µl des Filtrats in Doppelbestimmung in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert, die 25 µl Verdünnungspuffer enthielten und eine 1:2-Verdünnungsreihe der Proben angelegt. Nach Zugabe von 25 µl Testreagenz (Positivkontrolle) bzw. 25 µl Kontrollreagenz (Negativkontrolle) zu den Proben wurde die Platte für 20 – 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jede Vertiefung auf Agglutination überprüft. Die Interpretation der Testergebnisse erfolgte nach Herstellerangaben.

3.2.5.2 Emetische Form

3.2.5.2.1 Stärkehydrolysetest

Da nur Stärkehydrolyse-negative *B. cereus* in der Lage sind emetisches Toxin zu produzieren (Agata et al., 1996; Nishikawa et al., 1996), wurden alle Isolate hinsichtlich einer ersten Charakterisierung einem Stärkehydrolyse-Test unterzogen. Zur Testdurchführung wurden die *B. cereus* Isolate auf Standard II Nähragar (mit Zusatz von 1% Stärke) ausgestrichen und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde mit einer Pipette eine 1:5 verdünnte Lugol'sche Lösung auf die Einzelkolonien getropft. Kolonien wurden als Stärke-negativ beurteilt, wenn sich der Nährboden direkt um die Kolonie herum tief blau färbte. Bei einer Stärkehydrolyse-positiven Reaktion hingegen war ein deutlich sichtbarer Hof um die Einzelkolonie zu erkennen.

3.2.5.2.2 PCR

Alle Stärkehydrolysen-negativen *B. cereus* Isolate wurden zur Charakterisierung ihrer emetischen Toxinogenität mittels PCR analysiert. Die Analyse basiert auf dem Nachweis eines Fragments des Strukturgens der nichtribosomalen Peptidsynthase (NRPS), die an der Synthese des Cereulids beteiligt und daher spezifisch für emetische *B. cereus* ist (Ehling-Schulz et al., 2004c). In der vorliegenden Arbeit wurde für die PCR das Primerpaar EM1F und EM1R verwendet (Tab. 25).

Tab. 25: Primer für die PCR-Analyse emetischer *B. cereus*.

Primer	Produkt	Referenz
EM1F	635 bp	(Ehling-Schulz et al., 2004b)
EM1R		

Die PCR-Analysen wurden mit einem Reaktionsvolumen von 50 µl pro Ansatz durchgeführt, der 45 µl Mastermix und 5 µl DNA-Extrakt (siehe 3.2.5.1.) des zu untersuchenden Isolates umfasste (Tab. 26).

Tab. 26: PCR- Reaktionsansatz zum Nachweis emetischer *B. cereus* nach Ehling –Schulz et al. (2004b).

Volumen	Reagenz
5 µl	10 x PCR-Puffer
3 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1 µl	dNTP-Mix (40 mM)
0,25 µl	Primer EM1F (0,1 nmol / µl)
0,25 µl	Primer EM1R (0,1 nmol / µl)
0,25 µl	Hot StarTaq Polymerase (5U / µl)
35,25 µl	Aqua bidest.
+ 5 µl Proben-DNA	
bzw.	
Positivkontrolle: 5 µl DNA-Extrakt des Referenzstammes <i>B. cereus</i> 4312	
bzw.	
Negativkontrolle: 5 µl Aqua bidest.	

Die Bedingungen der Amplifikation sind in Tabelle 27 angegeben.

Tab. 27: Cyclorprogramm für die PCR zum Nachweis emetischer *B. cereus* nach Ehling –Schulz et al. (2004b).

Anzahl der Zyklen	PCR-Step	Zeit-Temperatur-Profil
1x	Initiale Denaturierung	5 min bei 95 °C
35x	Denaturierung	1 min bei 94 °C
	Annealing	1,5 min bei 58 °C
	Elongation	2,5 min bei 72 °C
1x	Finale Extension	5 min bei 72 °C

Im Anschluss an die PCR erfolgte die Visualisierung und Auswertung der Amplifikate mittels Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung (siehe 3.2.5.3.).

Isolate wurden als positiv gewertet, wenn sie eine Bande bei 635 bp zeigten.

3.2.5.2.3 HEp2 / MTS - Zellkulturtest

Zur Analyse der zytotoxischen Aktivität wurden alle Stärkehydrolyse-negativen *B. cereus* Isolate in einem auf HEp2-Zellen basierenden MTS-Zellkulturtest eingesetzt (Burgess und Horwood, 2006; Finlay et al., 1999).

Probenaufbereitung

Die Isolate wurden zunächst zur Toxinproduktion in Magermilch angereichert. Hierfür wurde die Magermilch mit Koloniematerial des zu untersuchenden Isolates beimpft und für 18 h bei 30 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Ansätze autoklaviert (115 °C / 10 min) und für 15 min bei 10000 x *g* zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand steril filtriert und 100 µl des Filtrats im Test eingesetzt.

Durchführung des Zytotoxizitätstest

Die Kultivierung der HEp2-Zellen erfolgte in DMEM unter Zusatz von 10 % foetalem Kälberserum. Die Zellen wurden geteilt und bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre für zwei Tage inkubiert. Anschließend wurde das Medium verworfen und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Um die Zellen vollständig vom Boden der Flasche lösen zu können, wurden die Zellen nachfolgend in 2,5 ml Trypsin-EDTA für 5 min inkubiert. Die so gewonnene Zellsuspension wurde mit 10 ml DMEM verdünnt und bei 135 x *g* für 5 min zentrifugiert, um dann zur genauen Bestimmung der Zellzahl in 10 ml DMEM-Medium aufgenommen zu werden.

Je 100 µl der Zellkultur (ca. 10⁶ Zellen / ml) wurden in die Kavitäten einer 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und für 48 h bei 37 °C (5 % CO₂) inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Filtrat je Probe (siehe 3.2.7.4.1.) zu den Zellen gegeben und die Platte erneut inkubiert (24h, 37 °C, 5% CO₂). Für die Zellkontrolle wurde in eine Reihe der Kavitäten keine Probe hinzupipettiert. Als Positivkontrolle wurde statt der Probe 100 µl Triton-X (1%) zu den Zellen gegeben. Zudem wurde bei jedem Test der

emetische Referenzstamm *B. cereus* DSMZ No. 4312 zur Überprüfung der Kulturbedingungen mitgeführt.

Für die Bestimmung der Zellproliferation wurden 20 µl MTS-Reagenz zu jeder Kavität zugegeben und die Platte für 4 h inkubiert (37 °C; 5 % CO₂). Abschließend wurde die Farbintensität photometrisch bei 490 nm bestimmt.

Zur Berechnung des toxischen Effekts der zellfreien Kulturfiltrate auf die HEP2-Zellen wurde die folgende Gleichung herangezogen:

$$[1 - (OD_{\text{Zellkontrolle}} - OD_{\text{Probe}})] \times 100 \%$$

Proben wurden als zytotoxisch beurteilt, wenn die Differenz zwischen der OD der Zellkontrolle und der OD der Probe $\geq 20 \%$ war.

Der Zytotoxizitätstest wurde in Doppelbestimmung durchgeführt.

3.2.6 Mikrobiologische Untersuchung mariniertes Fleischzubereitungen

Ergänzend sollte untersucht werden, inwieweit über mit *B. cereus* belastete Gewürze ein Eintrag des Erregers in Lebensmittel erfolgt.

Hierfür wurde die mikrobiologische Qualität vakuumverpackter mariniertes Steaks aus dem lokalen Einzelhandel sowie selbst hergestellter gewürzter / mariniertes Fleischzubereitungen analysiert. Für letztere wurden Marinaden aus Öl und Gewürzen, die eine definierte Anzahl *B. cereus* enthielten (10^3 KbE/g), verwendet (siehe 3.1.9.1.). Diese Keimmenge entspricht der höchsten Anzahl präsumtiver *B. cereus*, die in der vorliegenden Arbeit in Gewürzen festgestellt wurde.

Die Untersuchung der Fleischzubereitungen umfasste die Ermittlung der aeroben Gesamtkeimzahl sowie der Anzahl präsumtiver *B. cereus*.

3.2.6.1 Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl

Die Bestimmung der aeroben GKZ wurde wie in Abschnitt 3.2.1. beschrieben durchgeführt. Für die Anschüttelung wurden jeweils 20 g Probe in 180 ml 0,85 %iger Kochsalzlösung eingewogen und homogenisiert.

3.2.6.2 Bestimmung der Anzahl präsumtiver *B. cereus*

Die Bestimmung der Anzahl präsumtiver *B. cereus* wurde nach der Methode L.00.0025 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB (siehe 3.2.3.) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Mikrobiologischer Status der Gewürze

In der vorliegenden Arbeit wurde die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl, die Anzahl an *Enterobacteriaceae* und präsumtiver *B. cereus* in zwölf Gewürzsorten bestimmt. Je Gewürzsorte wurden zwei Erzeugnisse aus konventioneller und ökologischer Herstellung sowie ein Erzeugnis aus der Rohstoffproduktion untersucht.

4.1.1 Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl

Insgesamt wurden 60 Gewürzprodukte untersucht. Dabei wurden Keimzahlen zwischen $<10^1$ und 10^7 KbE/g festgestellt. Zwei Drittel der Proben wiesen Keimzahlen zwischen 10^3 und 10^5 KbE/g auf (Abb. 8).

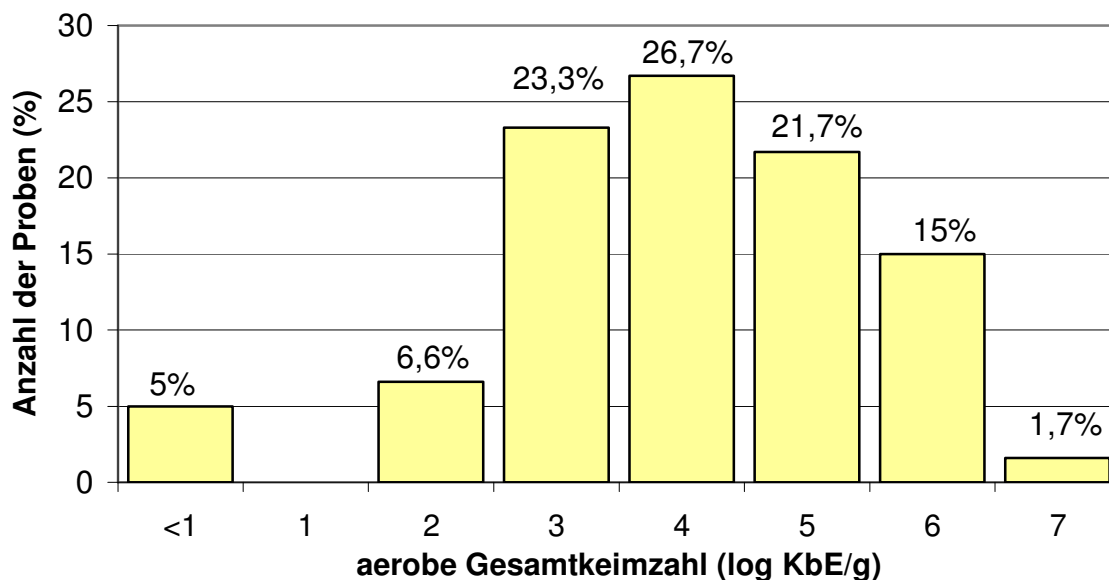


Abb. 8: Übersicht über die aerobe Keimbelastung der analysierten Gewürzproben (n=60).

Wie die Abbildung 9 zeigt, wurden die höchsten aeroben Keimbelastungen (10^5 bis 10^7 KbE/g) in den Gewürzsorten Curry, Ingwer, Majoran, Paprika sowie in schwarzem und weißem Pfeffer festgestellt. Die geringsten aeroben Keimzahlen ($<10^1$ bis 10^4 KbE/g) wiesen die Gewürzsorten Koriander, Kümmel, Nelken und Rosmarin auf. Die einzelnen Ergebnisse sind Tabelle 32 im Anhang zu entnehmen.

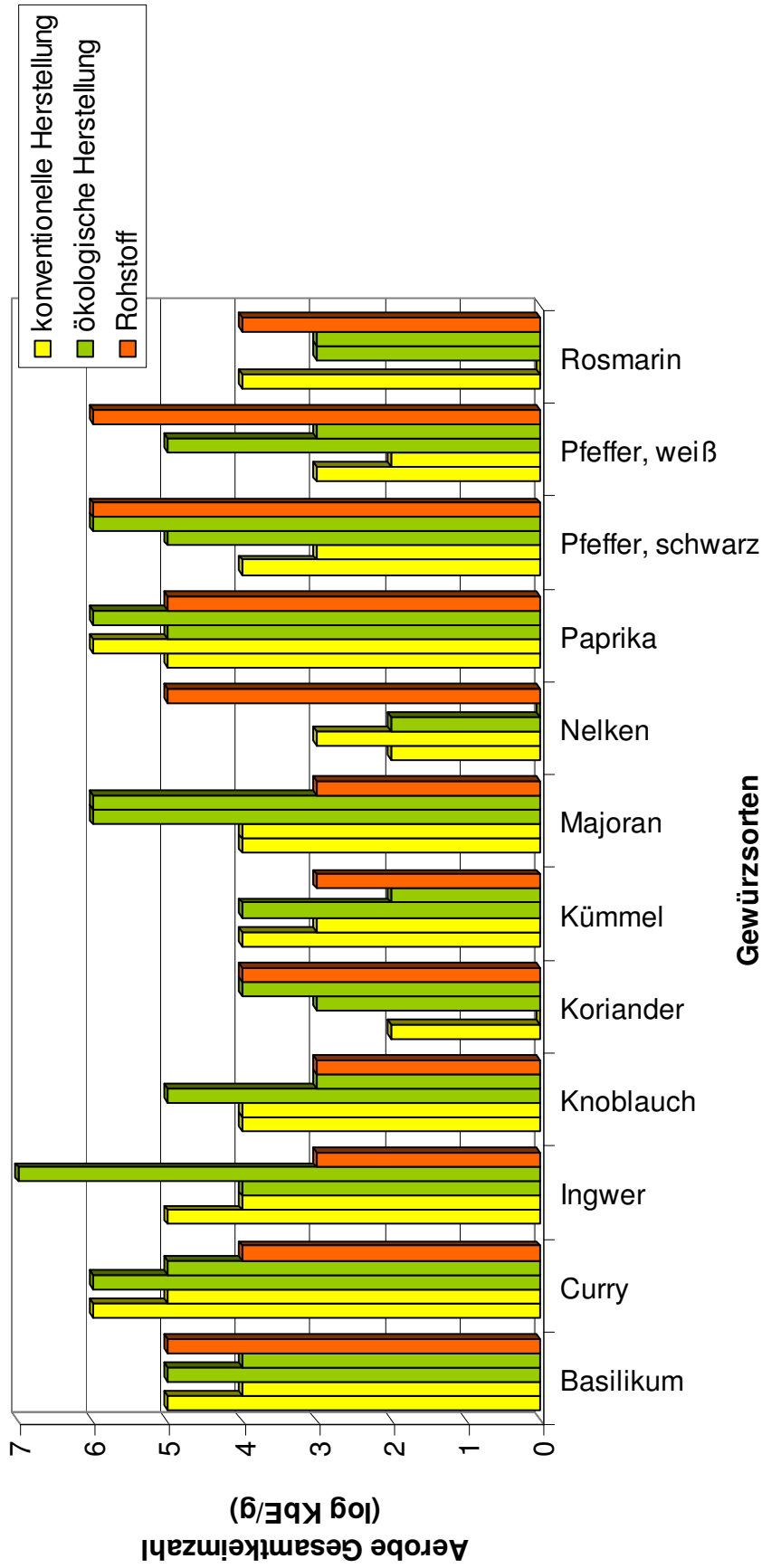


Abb. 9: Aerobe Keimbelastung in verschiedenen Gewürzen. Je Sorte wurden zwei Erzeugnisse aus konventioneller und ökologischer Herstellung sowie ein Erzeugnis aus der Rohstoffproduktion untersucht.

4.1.2 Anzahl der *Enterobacteriaceae*

Die Belastung mit *Enterobacteriaceae* lag in den analysierten Gewürzproben (n = 60) zwischen $<10^1$ KbE/g und 10^3 KbE/g. Mehr als zwei Drittel der Proben wiesen eine Keimzahl von $<10^1$ KbE/g auf (Abb. 10).

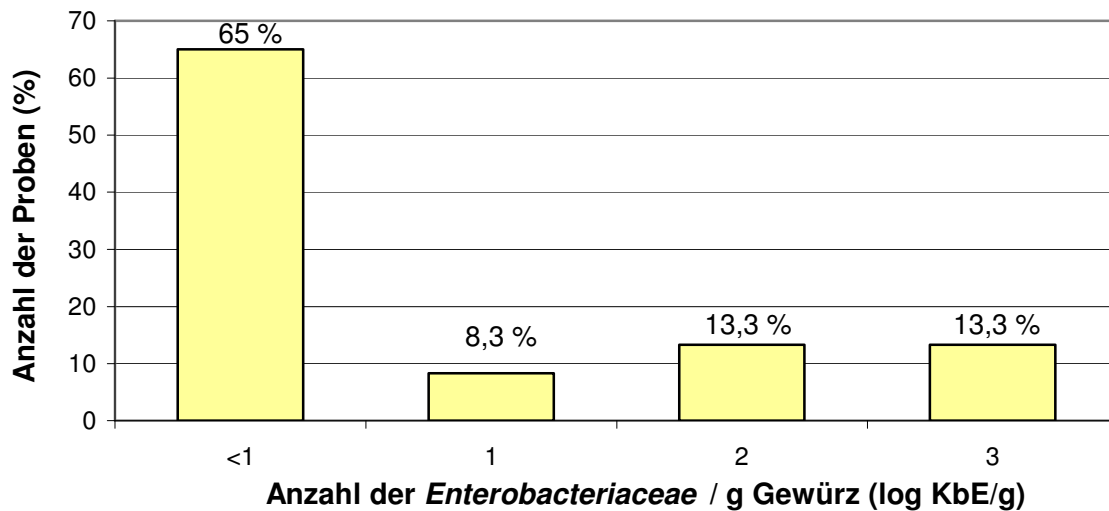


Abb. 10: Übersicht über die Belastung der untersuchten Gewürzprodukte (n = 60) mit *Enterobacteriaceae*.

Unter den analysierten Gewürzsorten (n = 12) wurde die höchste Kontamination mit *Enterobacteriaceae* in den Sorten Basilikum, Curry, Koriander, Kümmel und Majoran festgestellt (Abb. 11). Sie betrug zwischen 10^2 und 10^3 KbE/g Gewürz. Eine Anzahl von $<10^1$ KbE/g an *Enterobacteriaceae* wiesen die Sorten Nelken, schwarzer Pfeffer und Rosmarin auf.

Die detaillierten Ergebnisse sind in Tabelle 33 im Anhang aufgeführt.

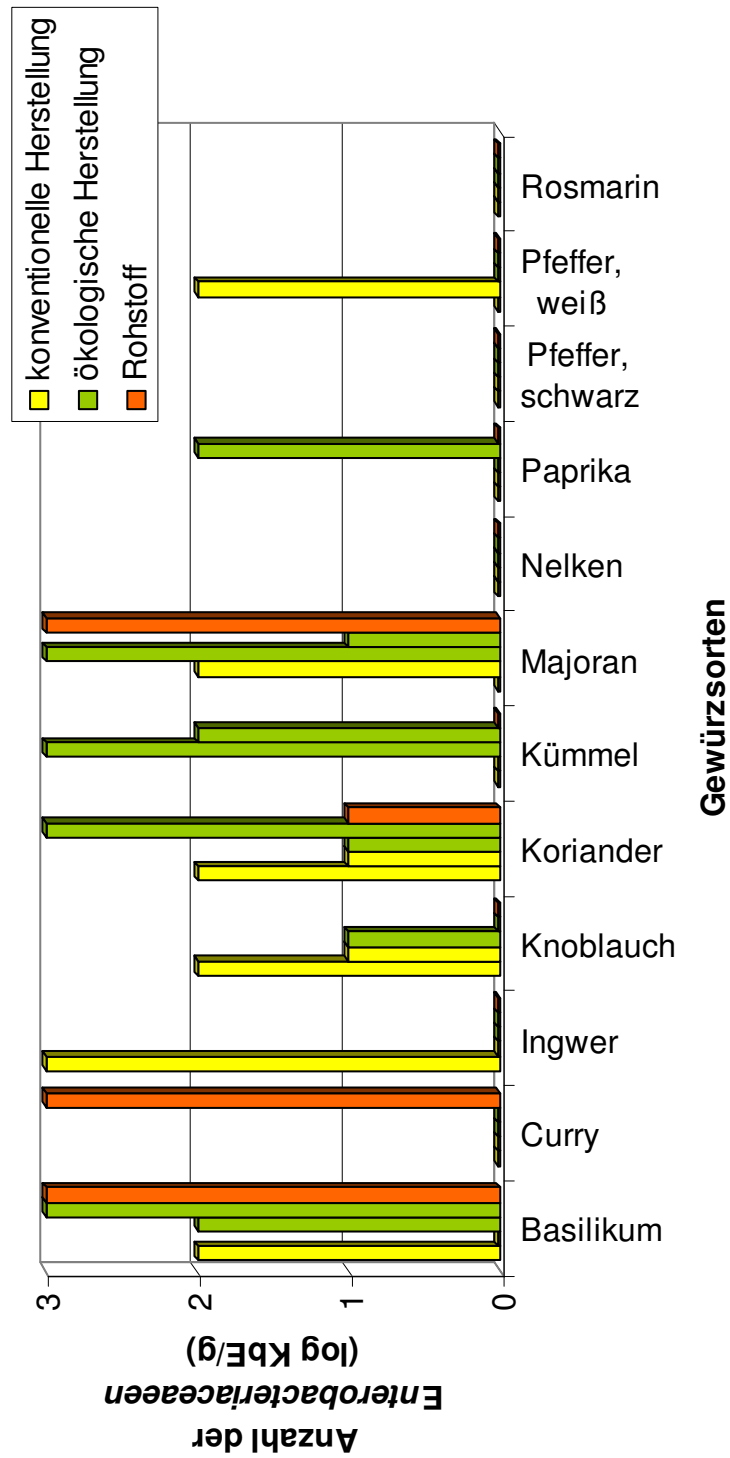


Abb. 11: Anzahl der *Enterobacteriaceae* in verschiedenen Gewürzen. Je Sorte wurden zwei Erzeugnisse aus konventioneller und ökologischer Herstellung sowie ein Erzeugnis aus der Rohstoffproduktion untersucht.

4.1.3 Anzahl präsuntiver *B. cereus*

Bestimmung der Anzahl präsuntiver *B. cereus* über die Methode L.00.0025 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB

Die Anzahl präsuntiver *B. cereus* in den Gewürzprodukten (n = 60) wurde zunächst quantitativ auf PEMBA über die Methode L.00.0025 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB analysiert.

In zwölf (20 %) der analysierten Gewürzproben wurde eine Kontamination von 10^3 Keimen / g detektiert. In 16 (26,7 %) Proben wurden Keimgehalte von 10^2 Keimen /g, in 10 (16,7 %) Proben mehr als 10 Keime/g festgestellt. In 22 (36,7 %) der Gewürzproben lag die Anzahl präsuntiver *B. cereus* - Belastung unter 10 Keimen /g (Abb. 12 und Tab. 34 [Anhang]).

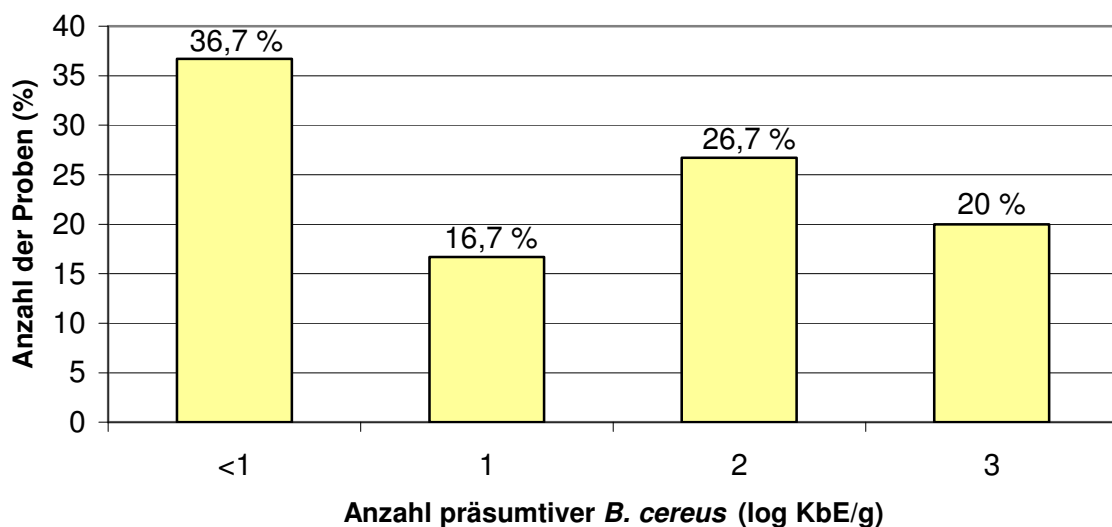


Abb. 12: Kontamination der analysierten Gewürzprodukte (n = 60) mit präsuntiven *B. cereus*.

Bezogen auf die Herkunft / Herstellungsart der Gewürze ergab sich folgende Verteilung der Ergebnisse (Abb 13):

Nahezu die Hälfte der konventionellen Produkte (10; n= 24) wiesen eine *B. cereus*-Belastung von $<10^1$ KbE/g auf. In drei dieser Produkte wurde eine Kontamination von 10^3 KbE/g detektiert. In der Gruppe der ökologischen Produkte (n=24) wurden in acht Proben Keimgehalte von $<10^1$ KbE/g bestimmt, sowie in sechs Produkten Keimzahlen von 10^3 KbE/g. Unter den Gewürzrohstoffen (n=12) wurde in jeweils drei Proben eine Kontamination mit präsumtiven *B. cereus* von 10^1 bzw. 10^3 Keimen/g festgestellt.

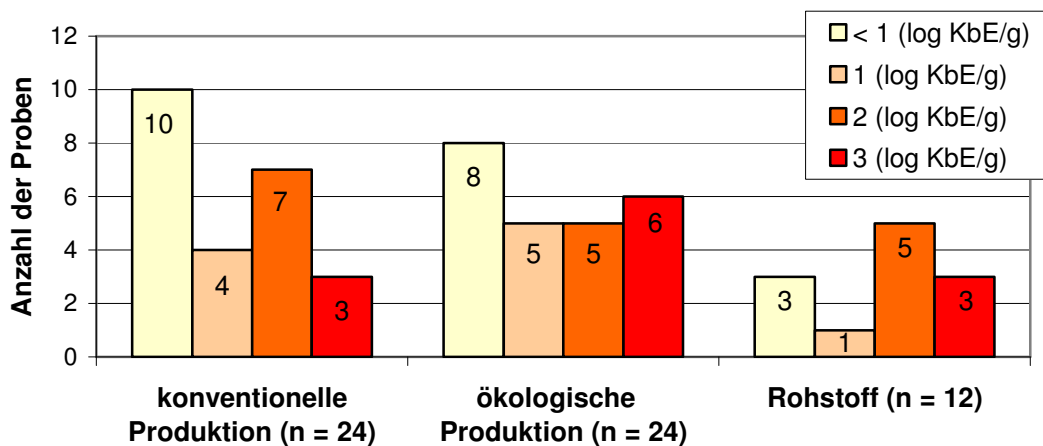


Abb. 13: Verteilung der *B. cereus* - Belastung in konventionell und ökologisch hergestellten Gewürzen sowie in Gewürzrohstoffen.

Wie die Abbildung 14 zeigt, waren die Gewürzsorten Basilikum, Curry, Ingwer und Majoran häufig mit *B. cereus* belastet. Diese Gewürze wiesen zudem die höchsten Keimzahlen an *B. cereus* (10^3 KbE/g) auf. In den Rohstoffprodukten der Sorten schwarzer und weißer Pfeffer wurden ebenfalls diese Keimbelastungen festgestellt. In den konventionell und ökologisch hergestellten Produkten der beiden Sorten wurden Keimmengen von $\leq 10^1$ KbE/g detektiert.

Die geringsten *B. cereus*-Kontaminationen wiesen die Gewürzsorten Nelken und Rosmarin auf (Abb. 14).

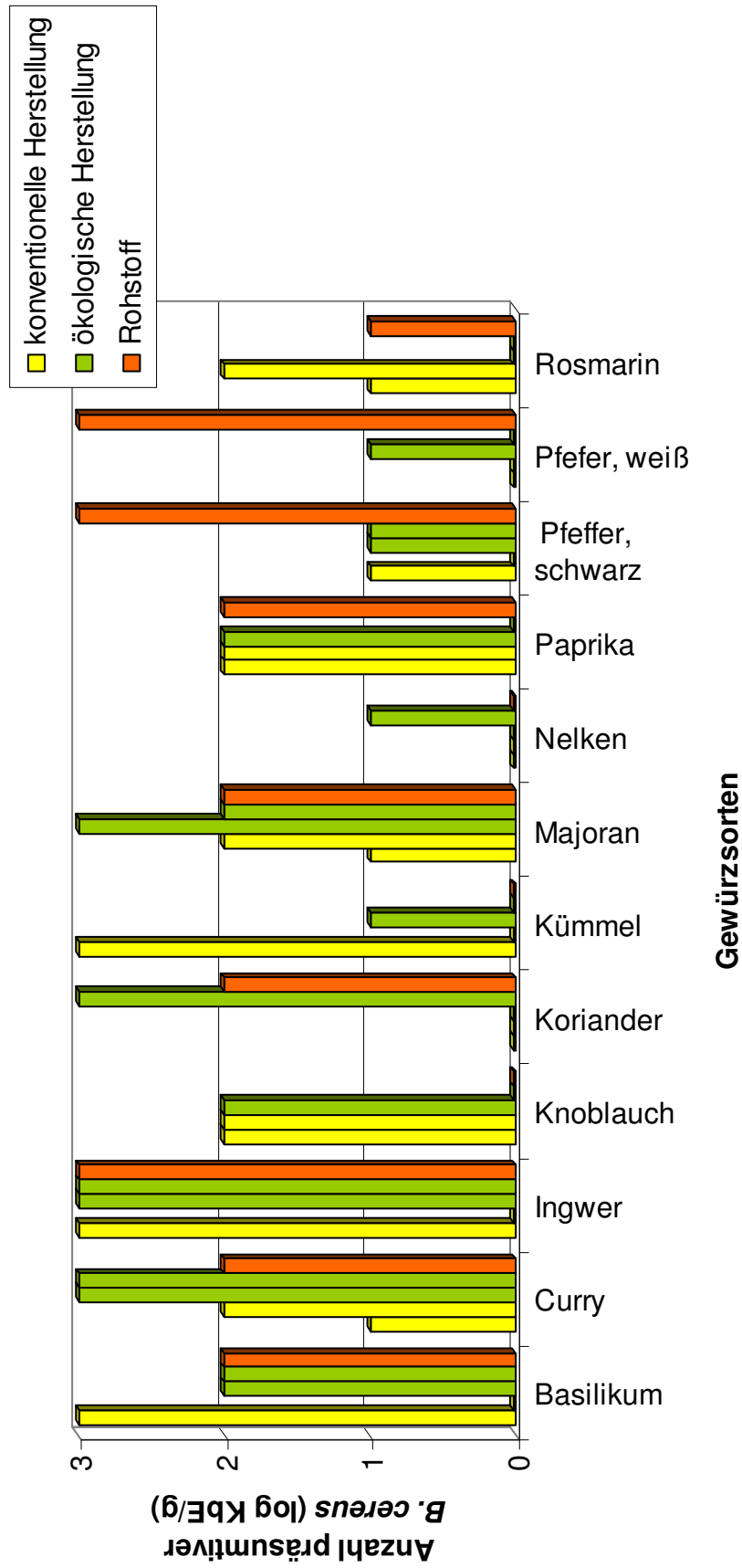


Abb. 14: Anzahl präsumtiver *B. cereus* in verschiedenen Gewürzen. Je Gewürzsorte wurden zwei Erzeugnisse aus konventioneller und ökologischer Herstellung sowie ein Erzeugnis aus der Rohstoffproduktion untersucht.

Anzahl präsumtiver *B. cereus* nach selektiver Anreicherung im MPN-Verfahren (Most Probable Number)

In insgesamt 24 der Gewürzprodukte (n = 60) wurde eine Kontamination mit präsumtiven *B. cereus* von $\leq 10^1$ KbE/g festgestellt (Tab. 34, [Anhang]. Um auch geringste Mengen des Erregers erfassen zu können, wurden diese Proben zusätzlich im MPN-Verfahren mit selektiver Anreicherung nach Methode L.01.0053 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren des §64 LFGB analysiert (siehe 3.2.3.2.).

Von den 24 im MPN-Verfahren analysierten Proben, wies eine Probe eine Anzahl präsumtiver *B. cereus* in Höhe von $7,50 \times 10^1$ KbE/g auf. In jeweils drei der Proben wurden Keimgehalte von $1,50 \times 10^1$ KbE/g und von $1,60 \times 10^1$ KbE/g festgestellt. In 16 Produkten lag die Anzahl präsumtiver *B. cereus* bei $\leq 10^1$ Keime/g.

Für eine Probe konnte aus der gebildeten Indexziffer in der MPN-Tabelle (siehe 3.2.3.2.) keine Anzahl präsumtiver *B. cereus* ermittelt werden.

Nachweis von *B. cereus* nach selektiver Anreicherung im Real-Time-PCR-Verfahren

Parallel zum MPN-Verfahren wurden Gewürzproben mit einer Anzahl präsumtiver *B. cereus* $\leq 1 \times 10$ KbE/g, nach selektiver Anreicherung mittels Real-Time PCR auf das Vorkommen von *B. cereus* analysiert. Die PCR wurde als Alternative zu dem sehr zeitaufwendigen und diagnostisch ungenauen MPN-Verfahren, für eine schnelle und direkte Identifizierung des Erregers in Gewürzen erarbeitet.

Die Tabelle 28 zeigt gegenüberstellend die Ergebnisse aus dem MPN-Verfahren und der Real-Time PCR sowie aus dem konventionellen Verfahren ohne Anreicherung: *B. cereus* wurde in insgesamt 21 der mittels Real-Time PCR untersuchten Proben (n=24) detektiert. In vier dieser Proben wurde der Erreger in den zwei Kulturverfahren mit einer Anzahl von $<10^1$ bzw $<0,30 \times 10^1$ bestimmt.

In drei Produkten war der Keim nicht nachweisbar. Jedoch wurde *B. cereus* in diesen Proben auch nicht über die zwei konventionellen Kulturverfahren identifiziert. Hierbei handelte es sich um zwei Proben „Knoblauch“ sowie um eine Probe „Pfeffer, weiß“.

Tab. 28: Anzahl präsumtiver *B. cereus* nach Methode L.00.0025 (Verfahren ohne Anreicherung) und L.01.0053 (MPN-Verfahren mit selektiver Anreicherung) sowie Nachweis von *B. cereus* nach selektiver Anreicherungsmittels Real – Time PCR.

Gewürzsorte	Proben nummer	Anzahl präsumtiver <i>B. cereus</i> ⁽¹⁾		B. cereus – Nachweis mittels Real-TimePCR ⁽²⁾
		nach L.00. 0025 (konventionell)	nach L.01.0053 (MPN)	
Basilikum	42	< 10 ¹	1,5 x 10 ¹	+
Ingwer	19	< 10 ¹	0,30 x 10 ¹	+
Knoblauch	30	< 10 ¹	< 0,30 x 10 ¹	-
	57	< 10 ¹	< 0,30 x 10 ¹	-
Koriander	44	< 10 ¹	0,30 x 10 ¹	+
	58	< 10 ¹	0,30 x 10 ¹	+
	66	< 10 ¹	< 0,30 x 10 ¹	+
Kümmel	22	< 10 ¹	0,92 x 10 ¹	+
	50	< 10 ¹	1,50 x 10 ¹	+
	64	< 10 ¹	0,36 x 10 ¹	+
Majoran	28	1,0 x 10 ¹	< 0,30 x 10 ¹	+
Nelken	18	< 10 ¹	0,30 x 10 ¹	+
	21	< 10 ¹	< 0,30 x 10 ¹	+
	29	< 10 ¹	0,30 x 10 ¹	+
	60	< 10 ¹	< 0,30 x 10 ¹	+
Paprika	12	< 10 ¹	1,50 x 10 ¹	+
Pfeffer, schwarz	46	< 10 ¹	0,62 x 10 ¹	+
Pfeffer, weiß	2	< 10 ¹	< 0,30 x 10 ¹	-
	13	1,0 x 10 ¹	7,50 x 10 ¹	+
	45	< 10 ¹	1,60 x 10 ¹	+
	52	< 10 ¹	- ⁽³⁾	+
Rosmarin	17	1,0 x 10 ¹	1,60 x 10 ¹	+
	54	< 10 ¹	0,74 x 10 ¹	+
	68	< 10 ¹	1,60 x 10 ¹	+

¹⁾ Anzahl in KbE/g.

²⁾ (+) positiver PCR-Nachweis, (-) neaktiver PCR-Nachweis.

³⁾ Aus der gebildeten Indexziffer konnte in der MPN-Tabelle (siehe 3.2.3.2.) keine Anzahl präsumtiver *B. cereus* ermittelt werden.

4.2 Isolierung und Bestätigung präsumtiver *B. cereus*

4.2.1 Vorkommen von *B. cereus*

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 171 präsumtive *B. cereus* aus 60 Gewürzprodukten isoliert (siehe 3.2.3.1). Nach biochemischer und molekularbiologischer Analyse der Zugehörigkeit der Isolate zur Spezies *B. cereus*, (siehe 3.2.4.1. und 3.2.4.2.), wurden 151 der Isolate als *B. cereus* bestätigt.

Die als *B. cereus* bestätigten Isolate stammten aus insgesamt 35 Gewürzproben (Tab. 35; Anhang). Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus der Real-Time PCR, über die *B. cereus* direkt in Gewürzen nachgewiesen wurde (siehe 4.1.3), ergibt sich insgesamt ein Anteil *B. cereus* positiver Proben an der Gesamtzahl von 70 % (Abb. 15).

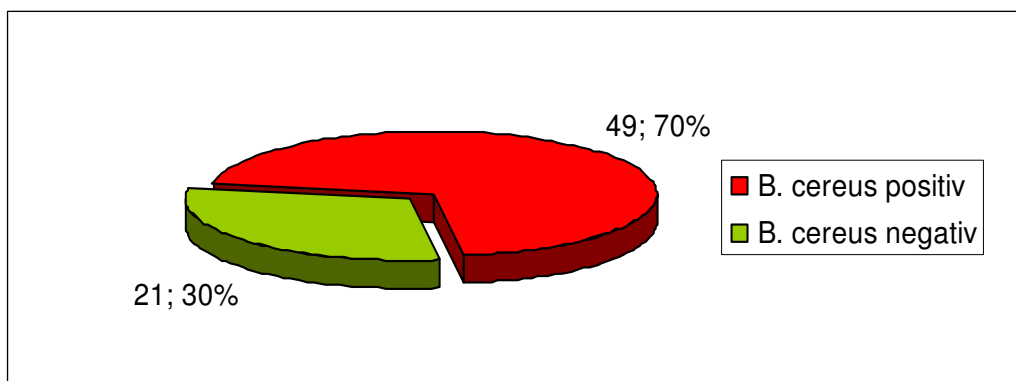


Abb. 15: Anteil *B. cereus* positiver Proben an der Gesamtprobenzahl (n = 60).

Die Abbildung 16 zeigt das Vorkommen von *B. cereus* in den verschiedenen Gewürzsorten. Curry, Ingwer, Koriander, Kümmel und schwarzer Pfeffer wiesen in allen der insgesamt fünf analysierten Proben *B. cereus* auf. In den Gewürzen Basilikum, Majoran, Paprika, Pfeffer (weiß) und Rosmarin wurde jeweils in vier von fünf untersuchten Proben der Erreger festgestellt. Innerhalb der Knoblauch- und Nelkenprodukte (je n=5) wurde eine bzw. zwei *B. cereus* positive Probe(n) bestimmt.

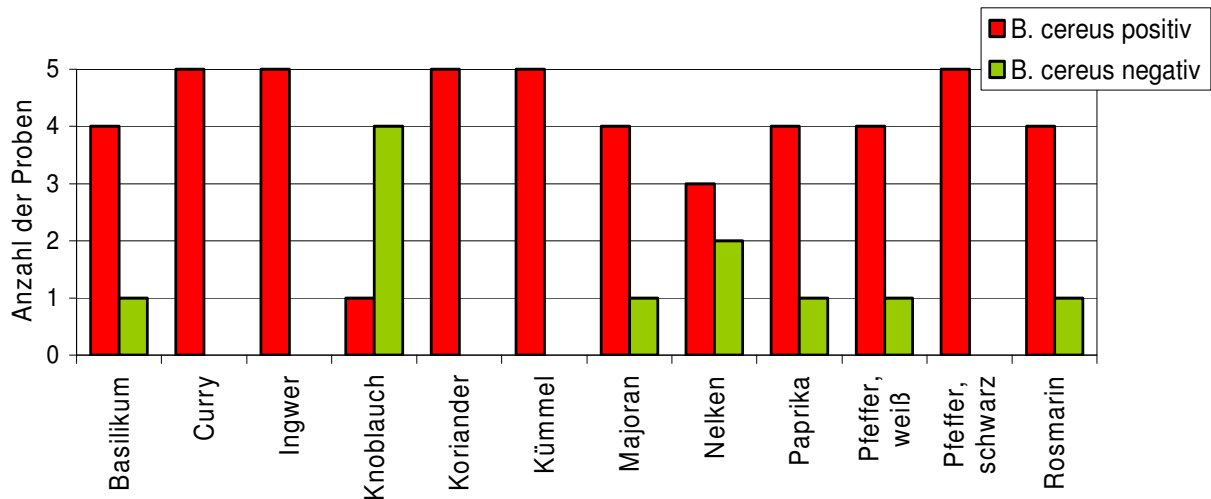


Abb. 16: Verteilung positiver und negativer *B. cereus* Proben in den einzelnen Gewürzsorten.

Bezogen auf die Herstellungsart der untersuchten Gewürzprodukte, lag der Anteil *B. cereus* positiver Proben an der Gesamtprobenzahl sowohl in konventionell und ökologisch hergestellten Gewürzen als auch in Gewürzrohstoffen bei jeweils über zwei Dritteln (Abb. 17).

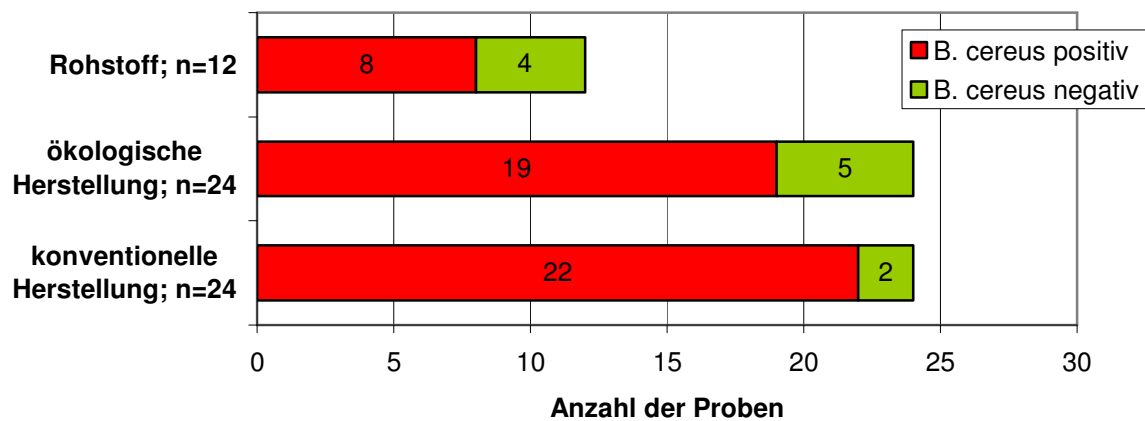


Abb. 17: Vorkommen von *B. cereus* in Gewürzproben aus konventioneller und ökologischer Produktion sowie in Gewürzrohstoffen.

4.2.2 Vorkommen von *B. thuringiensis*

Da *B. cereus* von *B. thuringiensis* auf PEMBA nicht zu unterscheiden ist (Oxoid, 1993), wurden alle präsumtiven Isolate, die in der *B. cereus*-PCR eine negative Reaktion zeigten (n=20) in eine *B. thuringiensis*-PCR eingesetzt (Kuo und Chak 1996) (siehe 3.2.4.3.).

Zwei Isolate wurden mittels PCR-Analyse als *B. thuringiensis* identifiziert. Beide Isolate wurden in einer Probe ökologisch hergestelltem Ingwer gefunden.

Der Anteil *B. thuringiensis*-positiver Gewürzproben an der Gesamtprobenzahl (n=60) entspricht somit 1,7%.

4.3 Diarrhöisches Toxinbildungsvermögen der *B. cereus* Isolate

4.3.1 Toxinogenität der Isolate

Zur Charakterisierung des diarrhöischen Toxinbildungsvermögens der *B. cereus* Isolate (n = 151), wurde zunächst die Toxinogenität untersucht. Mittels PCR-Analysen wurde das Vorkommen der codierenden Gene des HBL- und Nhe-Komplexes (*hbl*- und *nhe*-Operon) analysiert (siehe 3.2.5.1.1.).

4.3.1.1. Codierende Gene des *hbl*- Operons

Die Abbildung 18 zeigt das Vorkommen der Gene des *hbl*-Operons in denen im Rahmen dieser Studie gewonnenen *B. cereus* Isolaten: Das *hblA*-Gen, verantwortlich für die Codierung der B-Komponente des HBL-Enterotoxinkomplexes (Heinrichs et al. 1993), wurde in 86 (57 %; n=151) *B. cereus* Isolaten nachgewiesen. Die Gene *hblC* und *hblD*, die die L₂ bzw. L₁-Komponente des HBL-Komplexes (Ryan et al. 1997) codieren, lagen in 94 (62,3 %) bzw. in 132 (87,4 %) vor. Insgesamt 61 (40,4 %) der Isolate wiesen alle drei Gene auf.

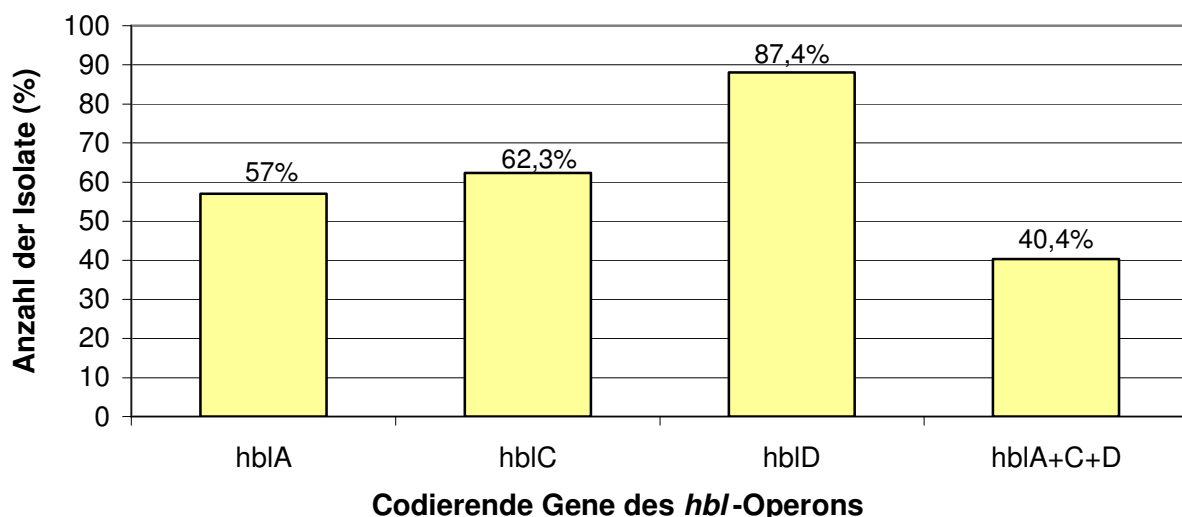


Abb. 18: Vorkommen codierender Gene des HBL-Komplexes in den analysierten *B. cereus* Isolaten (n=151).

In der Abbildung 19 ist das Vorliegen der Gene aufgegliedert nach den Gewürzsorten, aus denen die untersuchten *B. cereus* Isolate gewonnen wurden, dargestellt: Das Vorhandensein aller drei Gene lag in mehr als der Hälfte der Isolate aus Ingwer, Koriander und Majoran sowie in allen Isolaten aus Rosmarin vor. Innerhalb der Sorten Knoblauch, Kümmel und Nelken wurde dies in keinem Isolat festgestellt.

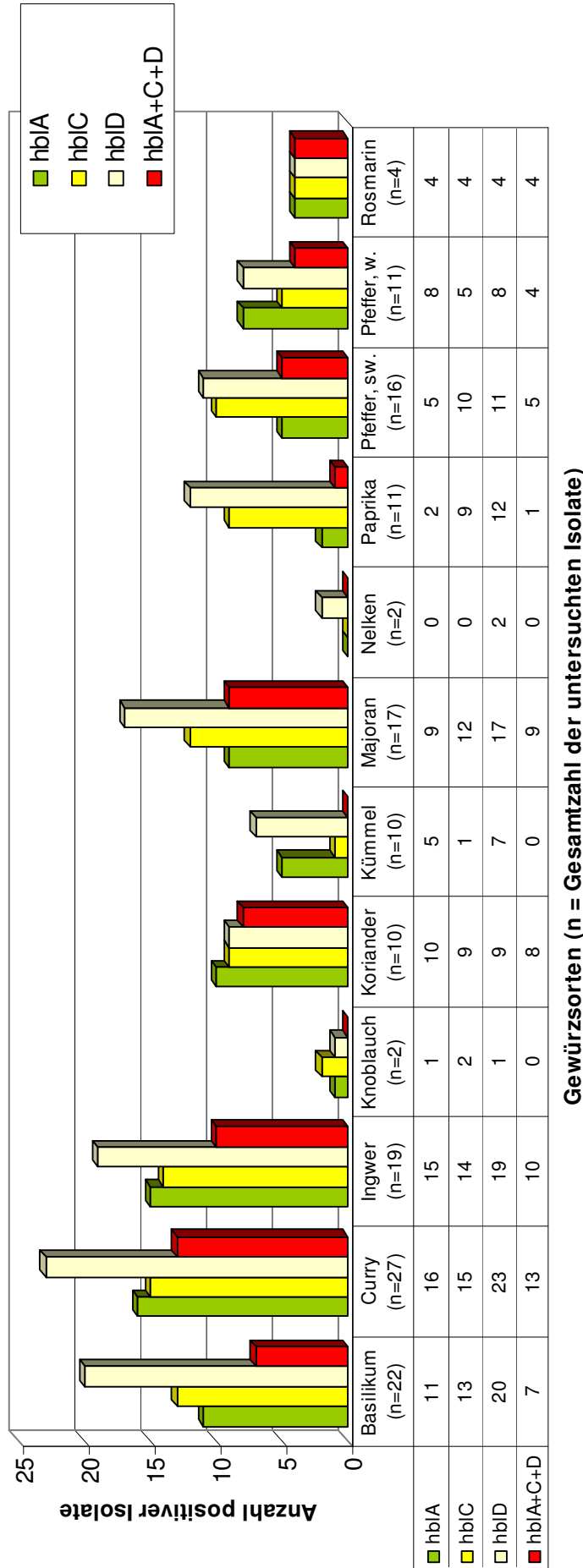


Abb. 19: Vorkommen codierender Gene des *hbI*-Operons in *B. cereus* Isolaten aus verschiedenen Gewürzsorten.

Das Vorkommen der Gene des *hbl*-Operons in den Isolaten, bezogen auf die Herkunft / Herstellungsart der Gewürze, aus denen sie gewonnen wurden, ist in Abbildung 20 wiedergegeben:

Nahezu ein Drittel der konventionellen und der ökologischen Isolate, sowie mehr als die Hälfte der Isolate aus Rohstoffen wiesen alle drei codierenden Gene (*hblD*, *hblC*, *hblA*) auf.

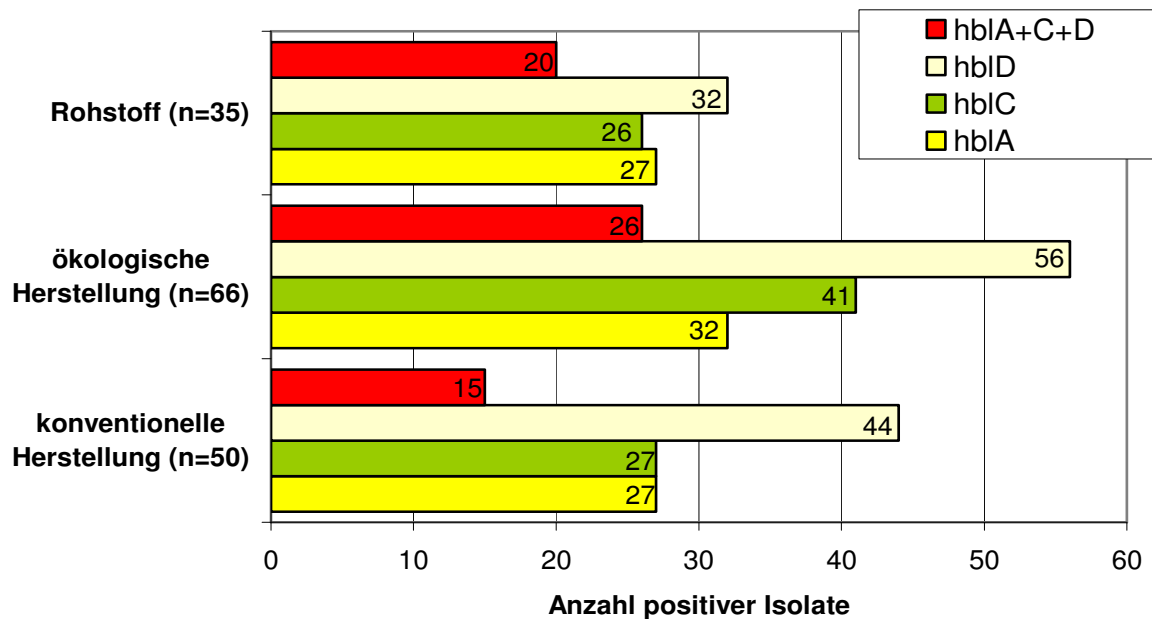


Abb. 20: Vorkommen codierender Gene des *hbl*-Operons in *B. cereus* Isolaten aus Gewürzen konventioneller und ökologischer Herstellung sowie in Gewürzrohstoffen (n= Gesamtzahl der untersuchten Isolate).

4.3.1.2. Codierende Gene des *nhe*-Operons

Das *nheA*-Gen, das die gleichnamige Komponente des Nhe-Komplexes codiert (Lund und Granum 1996), wurde in 129 (85,4 %; n=151) Isolaten nachgewiesen (Abb. 21). Die Gene *nheB* und *nheC*, verantwortlich für die Codierung der gleichlautenden Komponenten des Nhe-Enterotoxins (Lund und Granum 1996) wurden in 112 (74,2 %) Isolaten detektiert. (Abb. 21).

Wie die Abbildung 21 zeigt, wiesen 105 (69,5 %) der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen *B. cereus* Isolate alle drei Gene auf.

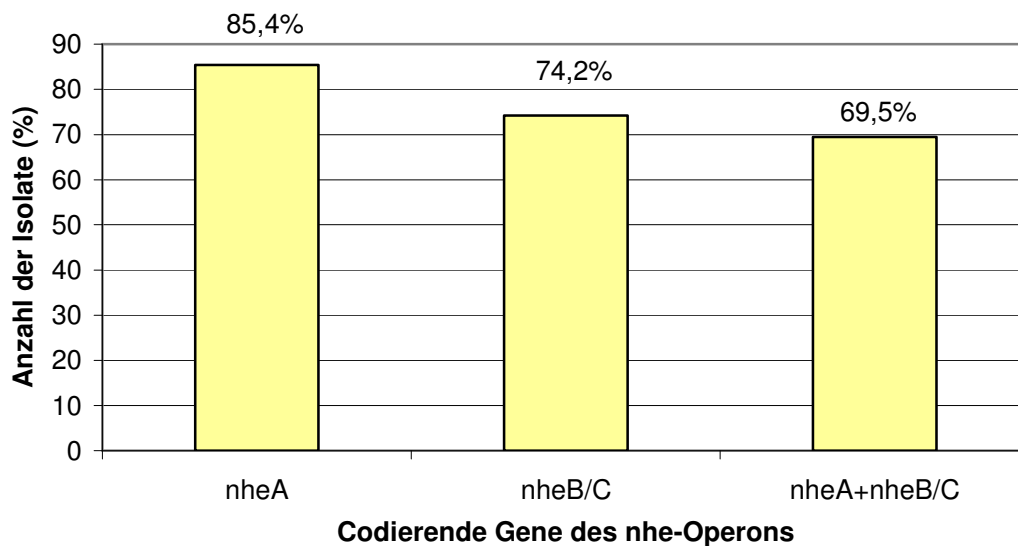


Abb. 21: Vorkommen codierender Gene des Nhe-Komplexes innerhalb der untersuchten *B. cereus* Isolate (n=151).

In der Abbildung 22 ist das Vorkommen der Gene des *nhe*-Operons bezogen auf die jeweilige Gewürzsorte aus denen die Isolate stammen dargestellt: Das gleichzeitige Vorliegen der Gene *nheA*, *nheB* und *nheC* wiesen alle Isolate aus Nelken und Paprika sowie mehr als die Hälfte der Isolate aus Curry, Ingwer, Kümmel, Majoran, schwarzem Pfeffer, weißem Pfeffer und Rosmarin auf. In Knoblauch wurde dies bei keinem Isolat detektiert.

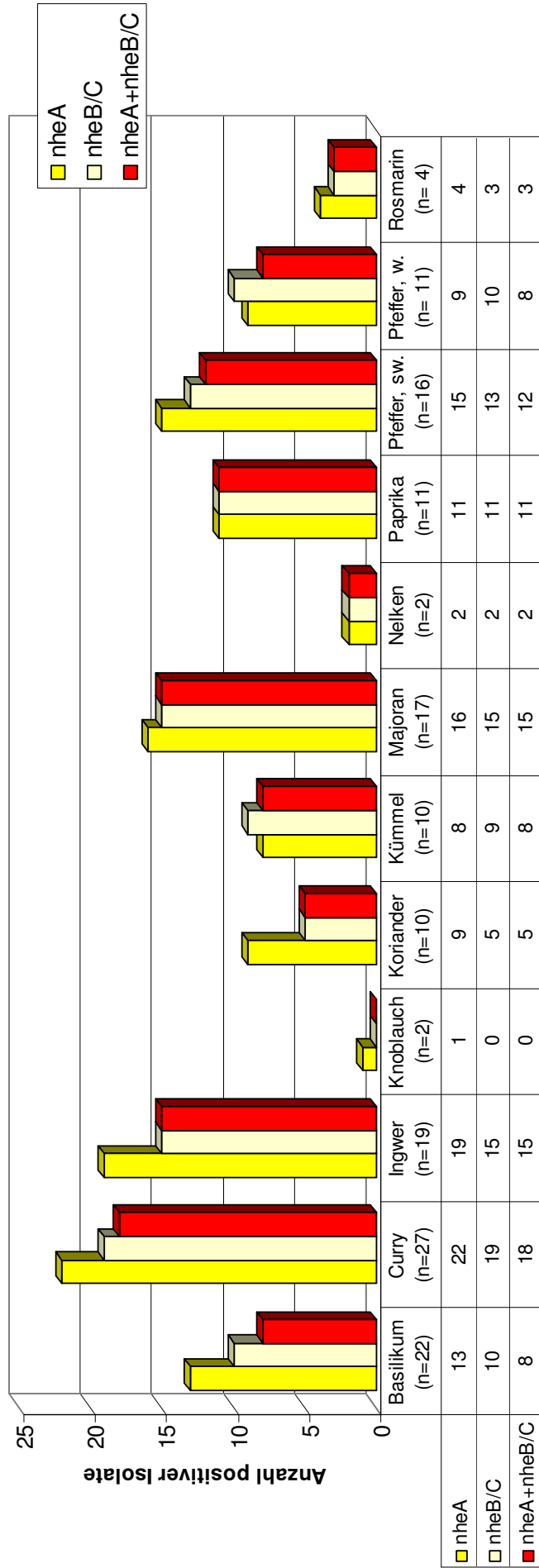


Abb. 22: Vorkommen codierender Gene des *nhe*-Operons in *B. cereus* Isolationen aus verschiedenen Gewürzsorten.

Die Abbildung 23 zeigt das Vorkommen der Gene des *nhe*-Operons in *B. cereus* Isolaten, aufgliedert nach der Herstellungsart der Gewürze aus denen die Isolate stammten: In jeder Produktgruppe wiesen mehr als zwei Drittel der Isolate das Gen *nheA*, die Gene *nheB/C* bzw. das gleichzeitige Vorhandensein der drei Gene auf.

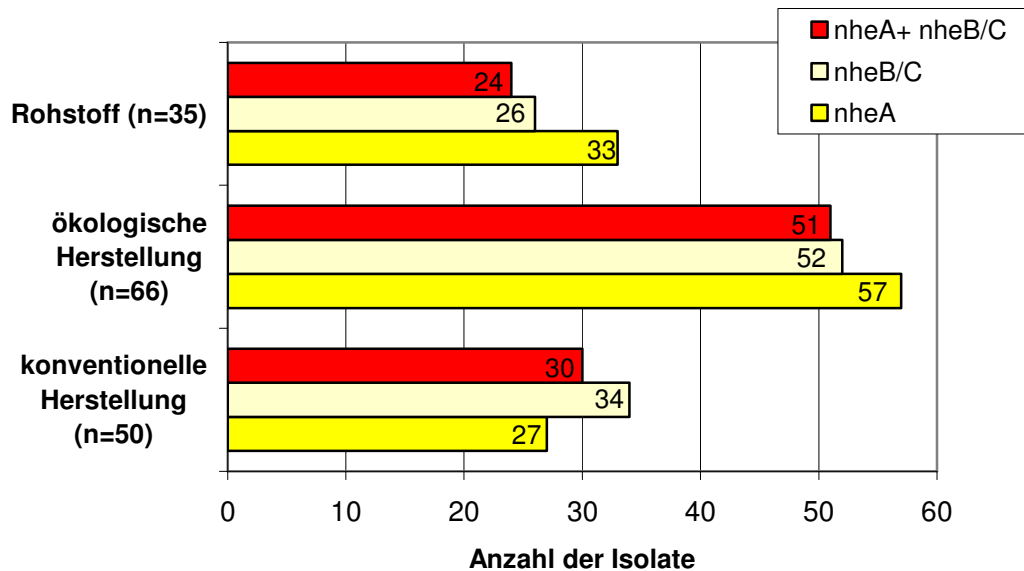


Abb. 23: Vorkommen codierender Gene des *nhe*-Operons in *B. cereus* Isolaten aus Gewürzen konventioneller und ökologischer Herstellung sowie in Gewürzrohstoffen.

4.3.2 Toxinexpression der Isolate

Für den direkten Nachweis der *B. cereus* Enterotoxine Non-Hemolytic Enterotoxin-Komplex (Nhe) und Hämolysin BL Enterotoxin (HBL) wurden alle Isolate (n=151) in zwei kommerziell erhältliche Immunoassays (TECRA-ELISA und Oxoid BCET-RPLA Kit) eingesetzt (siehe 3.2.5.1.2.).

4.3.2.1 ELISA

Im TECRA-ELISA, der auf dem Nachweis der NheA-Komponente des Nhe-Enterotoxinkomplexes basiert (Lund und Granum 1996), zeigten 122 der untersuchten Isolate (81 %; n= 151) eine positive Reaktion (Abb. 24).

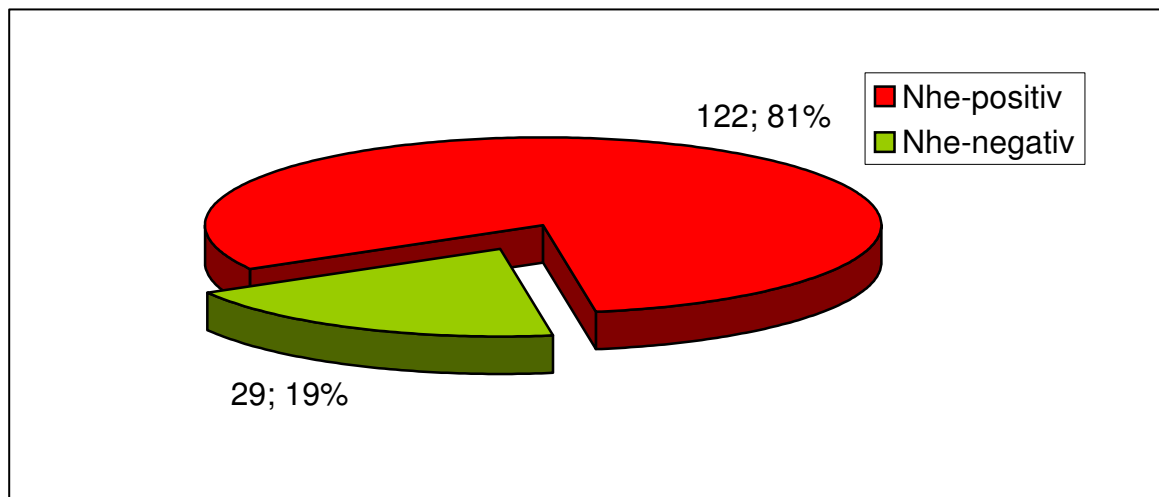


Abb. 24: Anteil Nhe-produzierender Isolate an der Gesamtzahl der analysierten *B. cereus* Isolate (n=151).

In der Abbildung 25 ist der Anteil Nhe-produzierender Isolate an der Gesamtzahl der untersuchten Isolate je analysierter Gewürzsarten dargestellt:

Alle *B. cereus* Isolate, die aus Basilikum (n=22), Koriander (n=10), Kümmel (n=10), Nelken (n=2) und Rosmarin (n=4) gewonnen wurden, wurden als Nhe-Bildner identifiziert. Unter den Isolaten aus Knoblauch (n=2) war keine Nhe-Bildung nachweisbar.

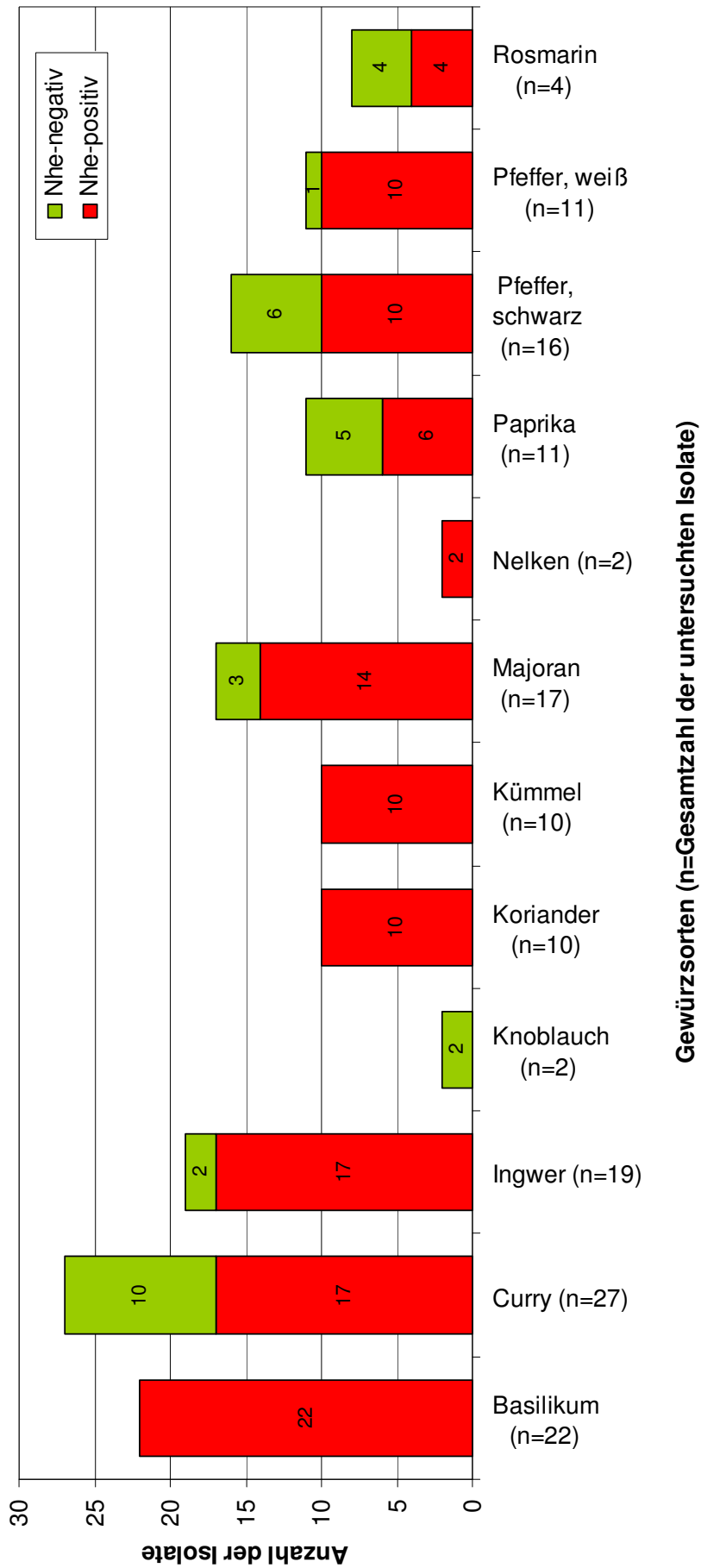


Abb. 25: Anteil der Nhe-Bildner an der jeweiligen Gesamtzahl der *B. cereus* Isolate der verschiedenen Gewürze.

Betrachtet nach der Herstellungsart der Gewürze, aus denen die *B. cereus* Isolate stammten, stellt sich der Anteil an Nhe-Produzenten wie folgt dar (Abb. 26):

Die Nhe-Bildung wurde bei mehr als zwei Drittel der *B. cereus* Isolate aus konventionell und ökologisch hergestellten Gewürzen sowie aus Rohstoffen detektiert.

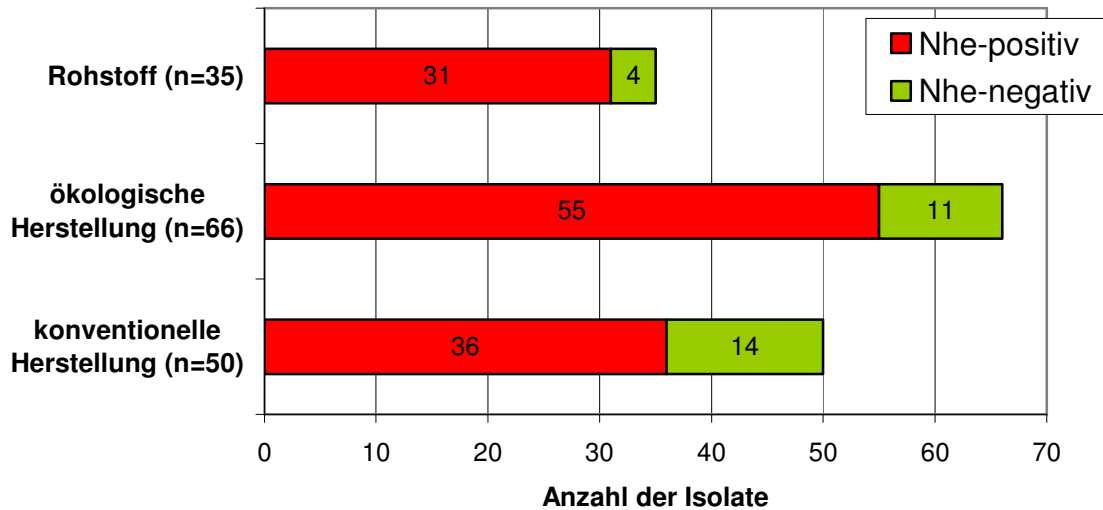


Abb. 26: Anteil der Nhe-Produzenten an der Gesamtzahl der *B. cereus* Isolate aus konventionell und ökologisch hergestellten Gewürzen sowie aus Rohstoffen.

4.3.2.2 Reverse Passive Latex Agglutination

Das BCET-RPLA Kit weist über eine Reverse Passive Latex Agglutination (RPLA) die L₂-Komponente des HBL-Enterotoxinkomplexes nach (Beecher und Wong, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung dieses Tests eine HBL-Bildung bei 58,3% (88; n=151) der untersuchten *B. cereus* Isolate nachgewiesen (Abb. 27).

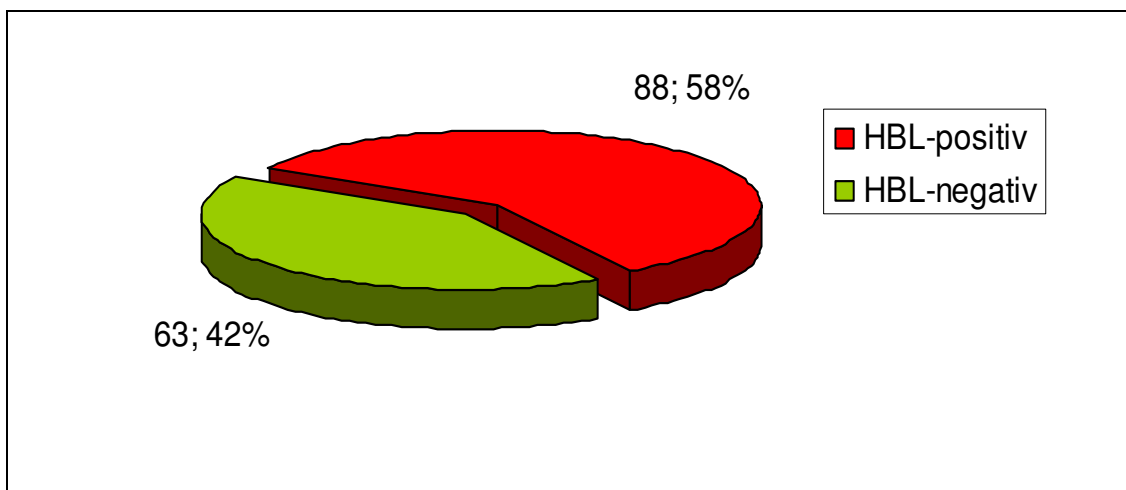


Abb. 27: Anteil HBL-produzierender *B. cereus* Isolate an der Gesamtzahl (n=151).

Die Abbildung 28 gibt eine Übersicht über den Anteil der HBL-Bildner an der Gesamtzahl der *B. cereus* Isolate der jeweiligen Gewürzsorte. Die Anzahl der Toxin-Produzenten entsprach in Ingwer, Knoblauch und Koriander der Gesamtzahl der Isolate aus diesen Gewürzsorten. Die Isolate aus Nelken wiesen keine HBL-Bildung auf.

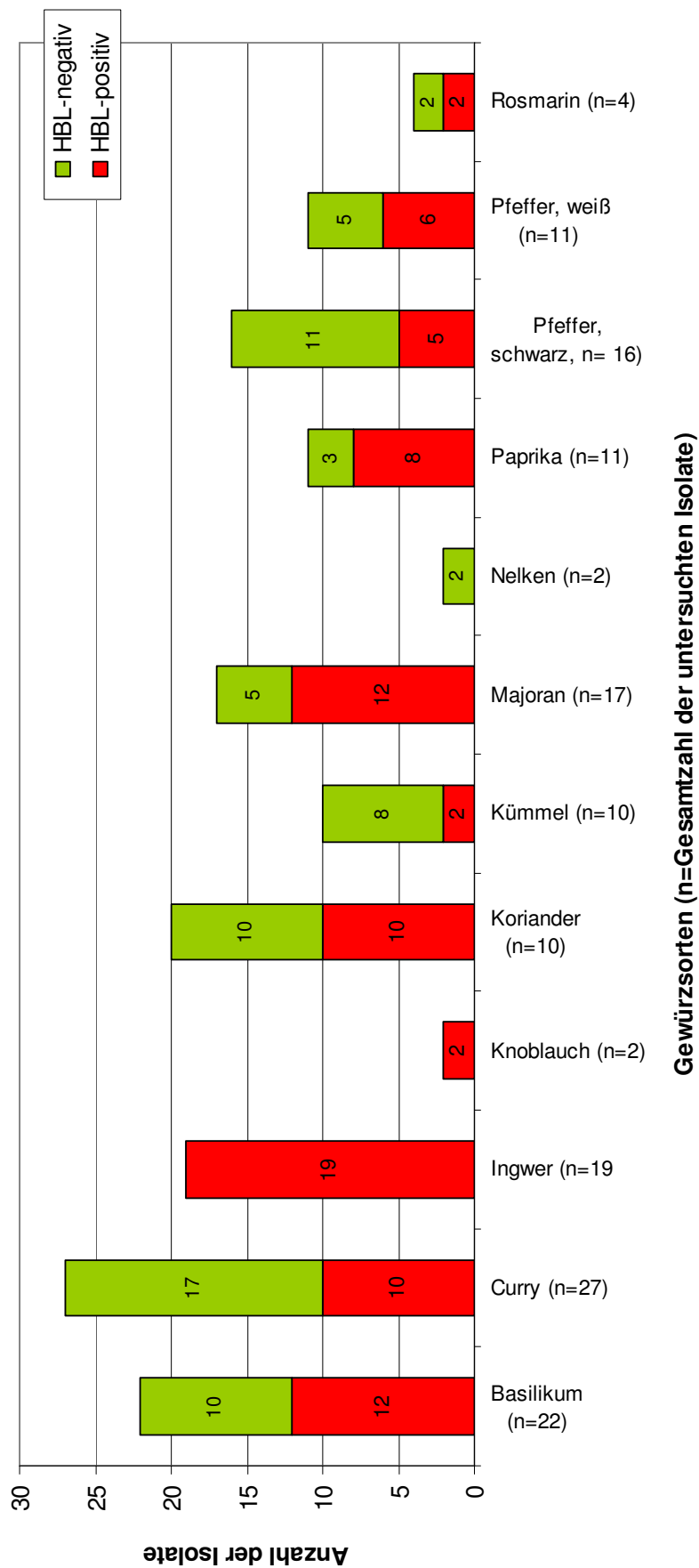


Abb. 28: Anteil der HBL-Bildner an der Gesamtzahl der *B. cereus* Isolate der verschiedenen Gewürze.

Aufgeliedert nach Herstellungsart der Gewürze, aus denen die Isolate stammen, stellt sich der Anteil der HBL-Bildner an der jeweiligen Gesamtzahl der Isolate folgendermaßen dar (Abb. 29):

Als HBL-Bildner wurden mehr als zwei Drittel der *B. cereus* Isolate aus konventionell hergestellten Gewürzen sowie aus Rohstoffen identifiziert. Unter den Isolaten aus ökologischen Gewürzprodukten lag ihr Anteil bei ca. der Hälfte.

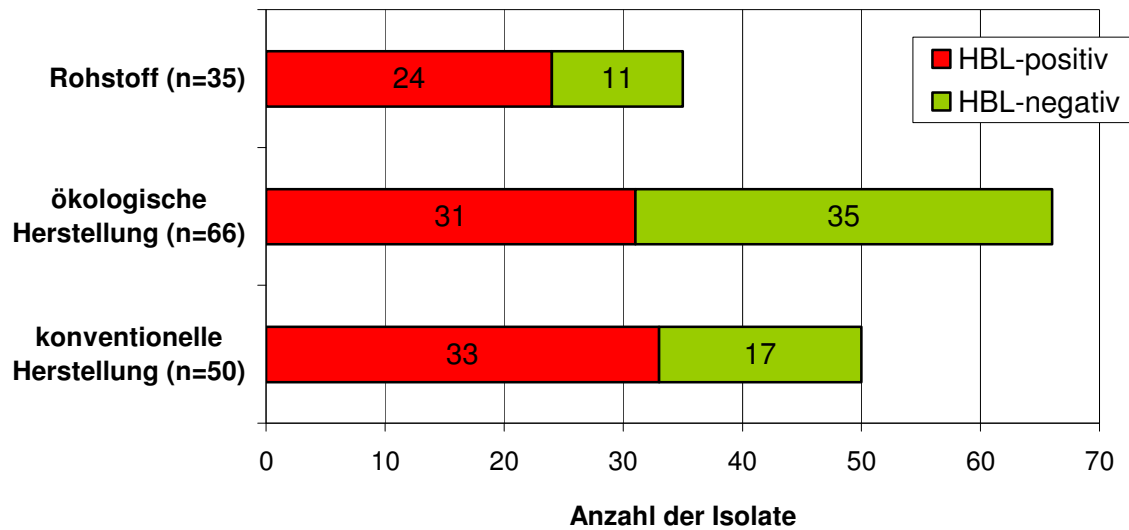


Abb. 29: Anteil der HBL-Produzenten an der Gesamtzahl der *B. cereus* Isolate aus konventionell und ökologisch hergestellten Gewürzen sowie aus Rohstoffen.

4.3.3. Verhältnis reiner Nhe-Produzenten zu HBL-/ und Nhe-Produzenten

Von den insgesamt 151 untersuchten *B. cereus* Isolaten wurden 122 (81 %) als Nhe-Bildner (siehe 4.3.2.1.) und 88 (58 %) als HBL-Bildner (siehe 4.3.2.2.) identifiziert. Da alle HBL-Bildner zugleich auch Nhe-Produzenten waren, lag das Verhältnis von reinen Nhe-Produzenten zu HBL-/Nhe-Produzenten bei 34 : 88.

4.3.4. Vergleich der Ergebnisse: Toxinogenität – Toxinproduktion

Nhe-Komplex

Mittels PCR-Analysen wurde in 129 Isolaten das *nheA*-Gen detektiert, in 105 Isolaten das gleichzeitige Vorliegen der Gene *nheA*, *nheB/C* (siehe 4.3.1.2.). Im ELISA wurden 122 Isolate als Nhe-Produzenten identifiziert (siehe 4.3.2.1.).

Sowohl das *nheA*-Gen als auch die Nhe-Bildung wiesen 103 Isolate auf. Das Vorliegen aller drei Gene des *nhe*-Operons sowie die Nhe-Toxinbildung wurden bei 78 Isolaten festgestellt.

HBL-Komplex

Das *hblC*-Gen wurde mittels PCR in 94 Isolaten nachgewiesen, das gemeinsame Vorkommen der Gene *hblA*, *hblC*, und *hblD* in 61 Isolaten (siehe 4.3.2.2.). Als HBL-Bildner wurden durch die reverse passive Latexagglutination 88 Isolate identifiziert (siehe 4.3.2.2.).

Insgesamt 79 Isolate zeigten sowohl das *hblC*-Gen als auch die HBL-Bildung, sowie 50 Isolate das Vorliegen aller drei Gene bei gleichzeitiger Toxinexpression.

4.4. Emetisches Toxinbildungsvermögen der *B. cereus* Isolate

4.4.1 Stärkehydrolysetest

Da nur Stärkehydrolyse-negative *B. cereus* Stämme Cereulid-Bildner sind (Agata et al. 1996; Nishikawa et al. 1996), wurden alle *B. cereus* Isolate (n=151) hinsichtlich einer ersten Charakterisierung einem Stärkehydrolysetest unterzogen (siehe 3.2.5.2.1.). Wie der Abbildung 30 zu entnehmen ist, zeigten 39,7 % der untersuchten Isolate keinen Stärke-Abbau.

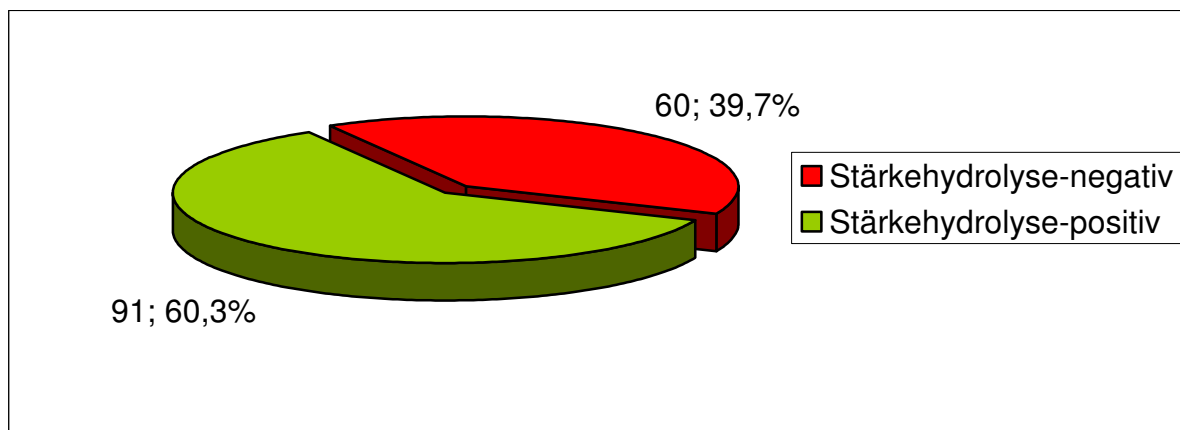


Abb. 30: Anteil Stärkehydrolyse-negativer Isolate an der Gesamtzahl der analysierten *B. cereus* Isolate (n=151).

4.4.2 Nachweis der Toxinogenität

Zur Charakterisierung der emetischen Toxinogenität wurden die Stärkehydrolyse-negativen Isolate (n=60) einer PCR-Analyse unterzogen (siehe 3.2.5.2.2.). Der für emetische *B. cereus* spezifische PCR-Nachweis, basiert auf der Detektion der nichtribosomalen Peptidsynthetase (NRPS), welche an der Synthese des Cereulids beteiligt ist (Ehling-Schulz et al. 2004b).

Von den insgesamt 60 Stärkehydrolyse-negativen Isolaten zeigten 16 eine positive Reaktion in der PCR. Bezogen auf die Gesamtzahl der *B. cereus* Isolate entspricht das einem Anteil von 11 % (Abb. 31).

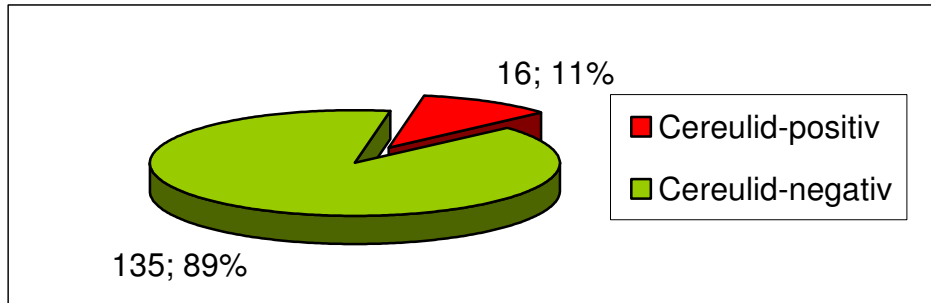


Abb. 31: Anteil der in der Emetic-PCR positiven Isolate bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten *B. cereus* Isolate (n=151).

4.4.3 Nachweis der Zytotoxizität

Alle *B. cereus* Isolate, die keine Stärkehydrolyse zeigten (n=60), wurden wie in Abschnitt 3.2.5.2.3. beschrieben, unter Verwendung eines auf HEp2-Zellen basierenden MTS-Zellkulturtest auf ihre Zytotoxizität überprüft (Burgess und Horwood 2006; Finlay et al. 1999).

Anhand ihrer zytotoxischen Aktivität wurden sieben der Isolate als Cereulid-Produzenten identifiziert und ein Vorkommen von 4,6 % für emetische Toxinbildner bestimmt (Abb. 32).

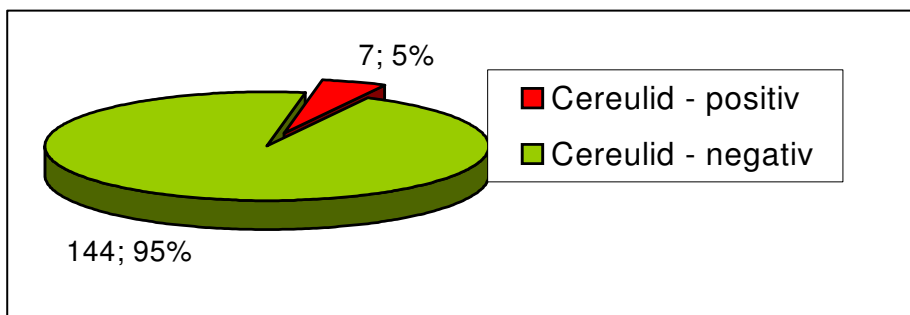


Abb. 32: Anteil Cereulid-produzierender Isolate an der Gesamtzahl der *B. cereus* Isolate (n= 151) in der vorliegenden Arbeit.

Die Cereulid-produzierenden Isolate stammten aus den Gewürzsorten Basilikum, Rosmarin und weißer Pfeffer. In Abbildung 33 ist ihr Anteil an der jeweiligen der Gesamtzahl der *B. cereus* Isolate aus diesen Gewürzen dargestellt.

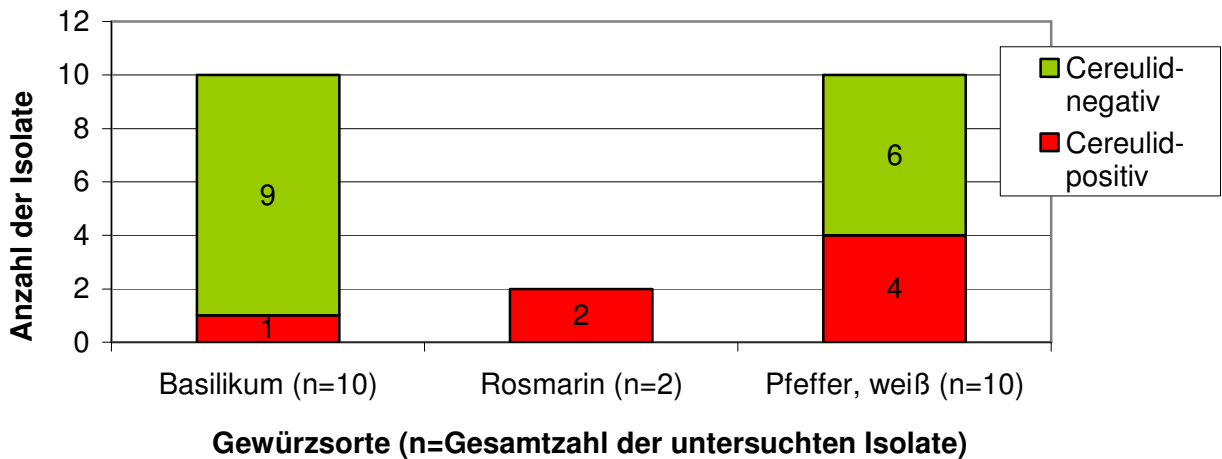


Abb. 33: Prävalenz von Cereulid-Bildnern in den Gewürzsorten Basilikum, Rosmarin und weißer Pfeffer.

Der Anteil der Cereulid-Produzenten an der Gesamtzahl der *B. cereus* Isolate aus konventionell hergestellten Gewürzen ist in Abbildung 34 dargestellt. Unter den *B. cereus* Isolaten, die aus Gewürzen ökologischer Herstellung stammten, wurde kein Cereulid-Bildner identifiziert (Abb. 34).

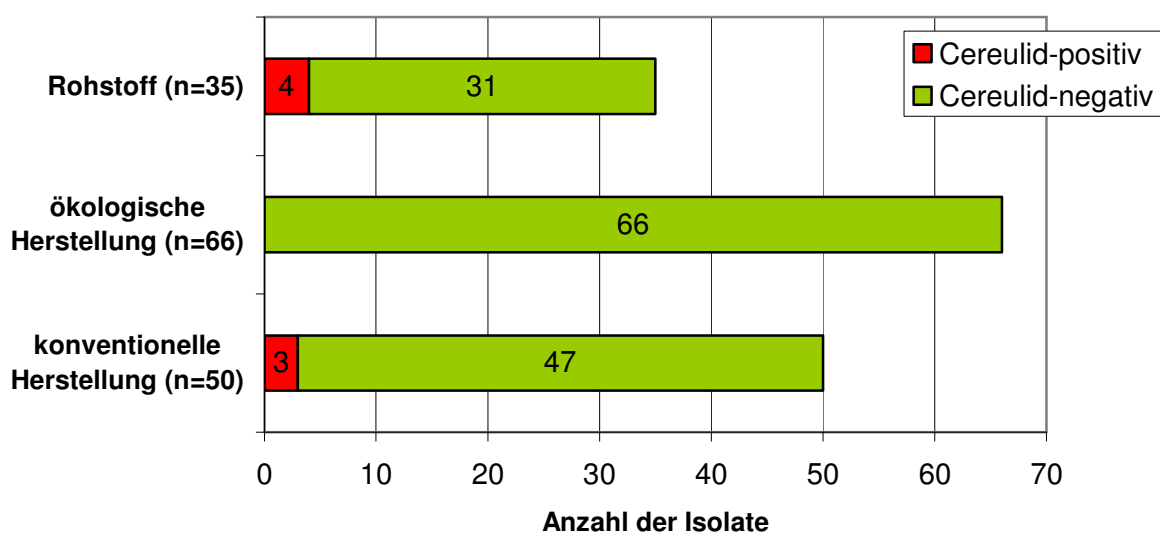


Abb. 34: Anteil emetischer Isolate an der Gesamtzahl der Isolate aus konventionell und ökologisch hergestellten Gewürzen sowie aus Gewürzrohstoffen.

4.4.4 Vergleich der Ergebnisse: Toxinogenität – Zytotoxizität

In der Emetic-PCR wurde bei 16 Isolaten eine positive Reaktion festgestellt (siehe 4.4.2.), im Zellkulturtest zum Nachweis einer zytotoxischen Aktivität bei sieben Isolaten (siehe 4.4.3.). Bei allen zytotoxischen Isolaten (Cereulid-Bildner) handelte es sich zugleich um Emetic-PCR positive Isolate.

Alle Cereulid-Bildner waren darüber hinaus auch Nhe-Produzenten.

4.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

4.5.1 Mikrobiologischer Status der untersuchten Gewürze

Insgesamt wurden zwölf verschiedene Gewürzsorten auf ihren mikrobiologischen Status untersucht. Je Gewürzsorte wurden fünf Proben analysiert: je zwei Erzeugnisse aus konventioneller und ökologischer Herstellung sowie ein Erzeugnis aus der Rohstoffproduktion. Mittels kultureller Verfahren wurden die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl sowie die Kontamination mit *Enterobacteriaceae* und präsumtiven *B. cereus* bestimmt. Im Folgenden sind die Ergebnisse aufgegliedert nach Gewürzsorten bzw. nach der Herstellungsart des Gewürzes dargestellt.

Wie die Tabelle 29 zeigt, wurde eine variierende Keimbelastung sowohl zwischen den Gewürzen als auch zwischen den Produkten einer Sorte festgestellt. Eine statistische Auswertung wurde aufgrund der geringen Probenzahl je Gewürzsorte (n=5) nicht vorgenommen.

Tab. 29: Überblick über den mikrobiologischen Status der untersuchten Gewürzsorten.

Gewürzsorte ¹⁾	aerobe GKZ ²⁾	<i>Enterobacteriaceae</i> ²⁾	präsumtive <i>B. cereus</i> ²⁾
Basilikum	10 ⁴ -10 ⁵	<10 ¹ -10 ³	<10 ¹ -10 ³
Curry	10 ⁴ -10 ⁶	<10 ¹ -10 ³	10 ¹ -10 ³
Ingwer	10 ³ -10 ⁷	<10 ¹ -10 ³	<10 ¹ -10 ³
Knoblauch	10 ³ -10 ⁵	<10 ¹ -10 ²	<10 ¹ -10 ²
Koriander	<10 ¹ -10 ⁴	<10 ¹ -10 ³	<10 ¹ -10 ³
Kümmel	10 ² -10 ⁴	<10 ¹ -10 ³	<10 ¹ -10 ³
Majoran	10 ³ -10 ⁶	<10 ¹ -10 ³	<10 ¹ -10 ³
Nelken	<10 ¹ -10 ⁵	<10 ¹	≤10 ¹
Paprika	10 ⁵ -10 ⁶	<10 ¹ -10 ²	<10 ¹ -10 ²
Pfeffer, schwarz	10 ³ -10 ⁶	<10 ¹	<10 ¹ -10 ³
Pfeffer, weiß	10 ² -10 ⁶	<10 ¹ -10 ²	<10 ¹ -10 ³
Rosmarin	<10 ¹ -10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹ -10 ²

¹⁾ Je Sorte wurden fünf Proben untersucht.

²⁾ Keimzahl in KbE/g.

Die aerobe Gesamtkeimbelastung lag zwischen $<10^1$ und 10^7 KbE/g. Die geringsten Keimbelastungen ($<10^1$ - 10^3 KbE/g) wiesen dabei die Sorten Koriander, Kümmel, Nelken und Rosmarin auf. Die höchsten Keimzahlen (10^6 bis 10^7 KbE/g) wurden hingegen in Curry, Ingwer, Majoran, Paprika sowie schwarzem und weißem Pfeffer festgestellt.

Nahezu alle Gewürzsorten zeigten eine Belastung mit *Enterobacteriaceae* zwischen $<10^1$ und 10^3 KbE/g. Hingegen wurde in Nelken und schwarzem Pfeffer eine Kontamination mit *Enterobacteriaceae* von $<10^1$ detektiert.

Die Kontamination mit präsumtiven *B. cereus* lag ebenfalls in nahezu allen Gewürzsorten zwischen $<10^1$ und 10^3 KbE/g. In Knoblauch und Rosmarin wurde eine Anzahl präsumtiver *B. cereus* von $<10^1$ bis 10^2 KbE/g nachgewiesen, in Nelken von $<10^1$ KbE/g.

In der Tabelle 30 sind die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen aufgegliedert nach der Herstellungsart der verschiedenen Gewürzprodukte dargestellt: Sowohl in den konventionell hergestellten Gewürzen als auch in den Rohstoffprodukten lag die aerobe Gesamtkeimzahl zwischen $<10^1$ - 10^6 KbE/g, in den ökologisch produzierten Gewürzen zwischen $<10^1$ bis 10^7 KbE/g. Die Belastung mit *Enterobacteriaceae* variierte von $<10^1$ bis 10^2 unter den konventionellen Gewürzen, sowie von $<10^1$ bis 10^3 unter den ökologischen Gewürzen und den Rohstoffprodukten. Hingegen lag die Anzahl präsumtiver *B. cereus* bei allen drei Herstellungsarten zwischen $<10^1$ und 10^3 KbE/g.

Tab. 30: Überblick über den mikrobiologischen Status der untersuchten Gewürze aus konventioneller und ökologischer Herstellung sowie aus der Rohstoffproduktion.

Herstellungsart	aerobe GKZ	<i>Enterobacteriaceae</i>	präsumtive <i>B. cereus</i>
konventionell	$<10^1$ - 10^6	$<10^1$ - 10^2	$<10^1$ - 10^3
ökologisch	$<10^1$ - 10^7	$<10^1$ - 10^3	$<10^1$ - 10^3
Rohstoffproduktion	$<10^1$ - 10^6	$<10^1$ - 10^3	$<10^1$ - 10^3

Wie die Abbildung 35 zeigt, lag bei einer statistischen Auswertung der *B. cereus* Belastung der Median-Wert in konventionell und ökologisch hergestellten Produkten bei 10^1 KbE/g, in Rohstoffprodukten bei 10^2 KbE/g. In allen drei Kategorien lag eine gleichmäßige Verteilung der Werte ohne Ausreißer vor.

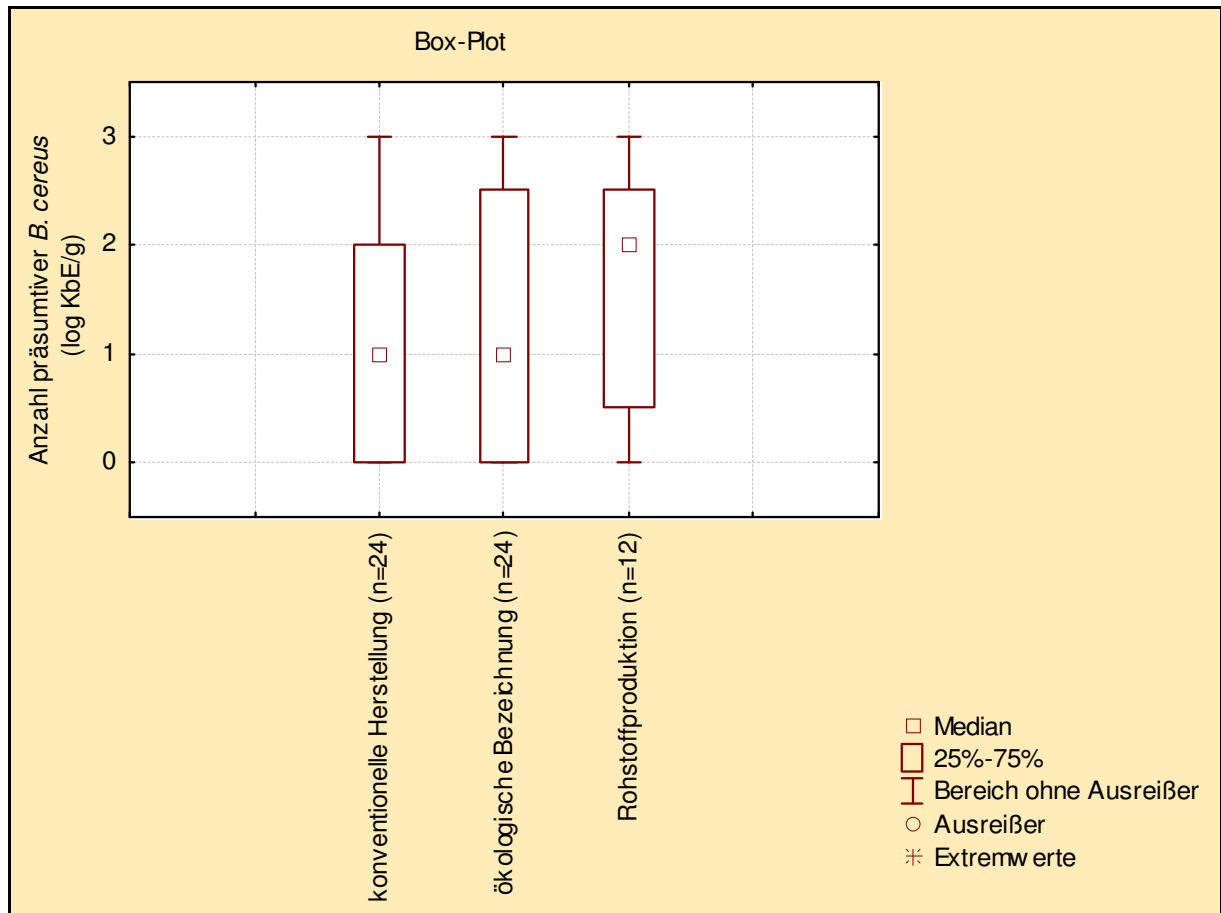


Abb. 35: Anzahl präsumtiver *B. cereus* in Gewürzen verschiedener Herstellungsarten.

4.5.2 Relatives Toxinbildungsvermögen der *B. cereus* Isolate

In der vorliegenden Arbeit wurden 151 *B. cereus* Isolate aus verschiedenen Gewürzproben hinsichtlich ihres Toxinbildungsvermögen analysiert:

Als HBL-/Nhe-Bildner wurden 88 (58,3 %), als reine Nhe-Bildner 27 (18 %) sowie als Cereulid-/Nhe-Produzenten 7 (5 %) der Isolate identifiziert. Insgesamt 29 (19 %) der Isolate zeigten keine nachweisbare Toxinproduktion (Abb. 36).

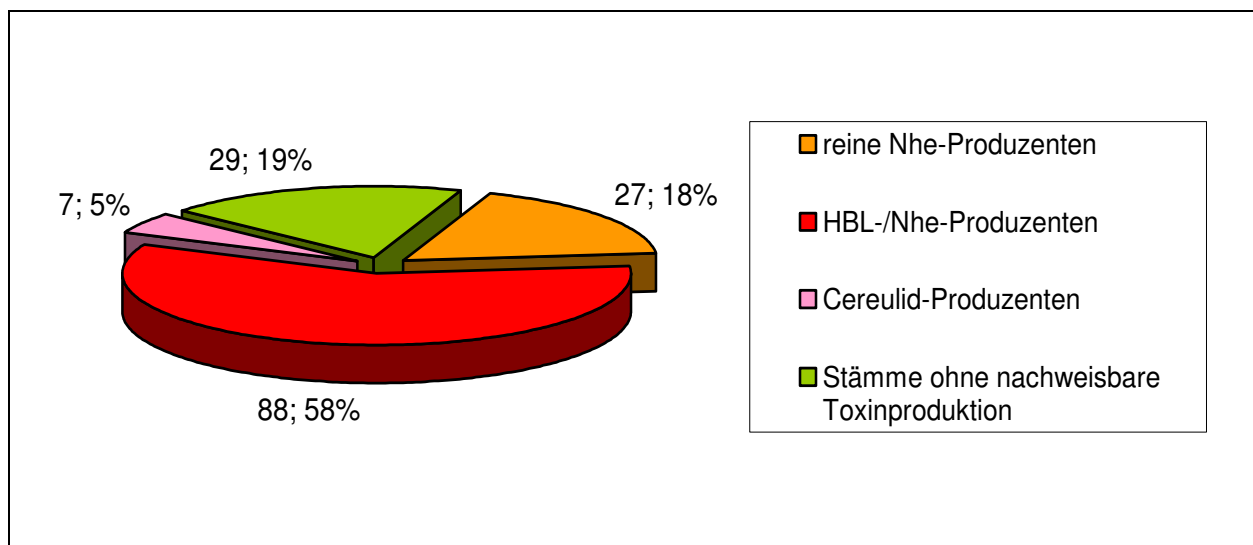


Abb. 36: Relatives Toxinbildungsvermögen der untersuchten *B. cereus* Isolate (n=151).

Die Abbildung 37 zeigt das Toxinbildungsvermögen der *B. cereus* Isolate, bezogen auf die Gewürzsorte, aus der sie gewonnen wurden. HBL-/ Nhe-Bildner lagen bis auf die Sorten Knoblauch und Nelken in allen Gewürzen vor. Reine Nhe-Bildner wurden in den Gewürzsorten Basilikum, Curry, Kümmel, Majoran, Nelken und schwarzem Pfeffer detektiert. Als Cereulid-Produzenten wurden *B. cereus* Isolate aus den Gewürzen Basilikum, weißer Pfeffer und Rosmarin identifiziert. Isolate ohne nachweisbare Cereulid- und Enterotoxinproduktion stammten aus Curry, Ingwer, Knoblauch, Majoran, Paprika, sowie aus schwarzem und weißem Pfeffer.

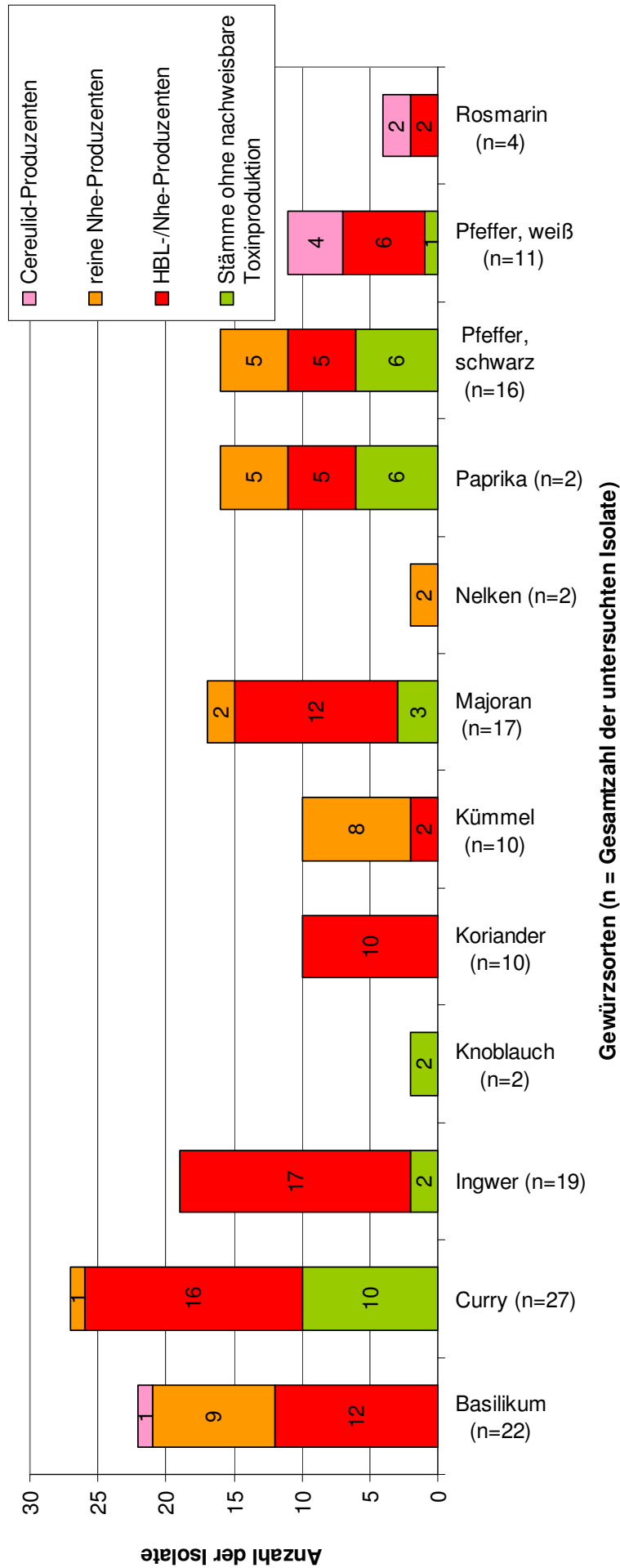


Abb. 37: Relatives Toxinbildungsvermögen von *B. cereus* Isolaten aus verschiedenen Gewürzsorten.

In der Abbildung 38 ist das Toxinbildungsvermögen der Isolate, betrachtet nach der Herstellungsart der Gewürze, aus denen die Isolate stammten, dargestellt:

Mehr als zwei Drittel der Isolate aus konventionellen Produkten sowie aus Rohstoffen wurden als HBL-/Nhe-Produzenten bestimmt. In ökologisch erzeugten Produkten waren dies nahezu die Hälfte der Isolate. Als reine Nhe-Bildner wurden 24 Isolate aus ökologischen Gewürzen und drei Isolate aus Rohstoffen identifiziert. Unter den Isolaten aus konventioneller Herstellung wurden diese Toxinbildner nicht nachgewiesen.

Cereulid-Produzenten wurden unter den Isolaten aus Rohstoffen sowie aus konventionellen Produkten identifiziert.

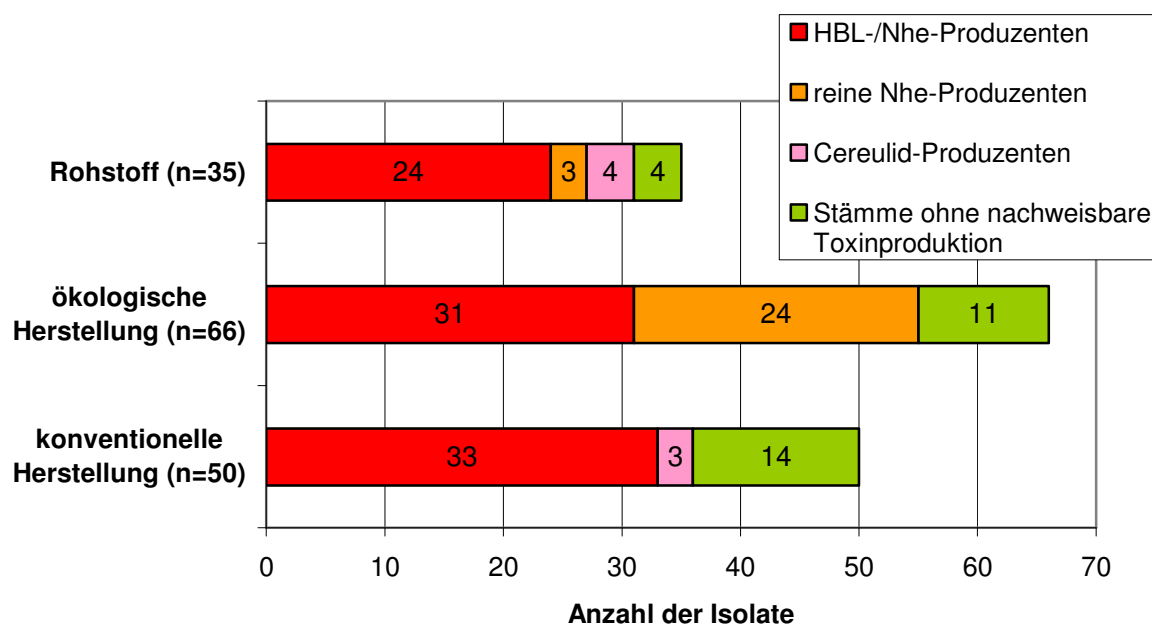


Abb. 38: Relatives Toxinbildungsvermögen von *B. cereus* Isolaten aus konventionell und ökologisch erzeugten Gewürzen sowie aus Gewürzrohstoffen.

4.6. Mikrobiologische Untersuchung mariniertes Fleischzubereitungen

Vielfach wird darauf hingewiesen, dass der Eintrag von *B. cereus* in Lebensmittel über Gewürze erfolgen kann (Baumgart, 2004; EFSA, 2004; ICMSF, 2005; Krämer, 2002), aktuelle Studien hierzu sind allerdings nicht dokumentiert. In der vorliegenden Arbeit sollte daher ergänzend zum Vorkommen von *B. cereus* in Gewürzen untersucht werden, inwieweit eine Kontamination von Lebensmitteln mit diesem Erreger aus der Verwendung von Gewürzen resultiert.

Zu diesem Zweck wurden die aerobe Gesamtkeimzahl sowie die Anzahl präsumtiver *B. cereus* in marinierten Steaks aus dem Einzelhandel (n=20) und in selbst hergestellten marinierten Fleischzubereitungen (n=20) analysiert. Für die Marinaden wurden vier verschiedene Gewürze verwendet, die jeweils eine definierte *B. cereus* - Anzahl von 10^3 KbE/g aufwiesen.

4.6.1 Einzelhandelsproben

4.6.1.1 Aerobe Gesamtkeimzahl

Untersuchung der Proben zum Zeitpunkt des Erwerbs

Wie die Abbildung 39 und die Tabelle 36a (Anhang) zeigen, wiesen jeweils drei Produkte (15%, n=20) eine aerobe Gesamtkeimzahl von 10^6 bzw. 10^4 KbE/g auf. In mehr als der Hälfte der Proben (12; 60%) wurde eine Belastung von 10^5 KbE/g festgestellt.

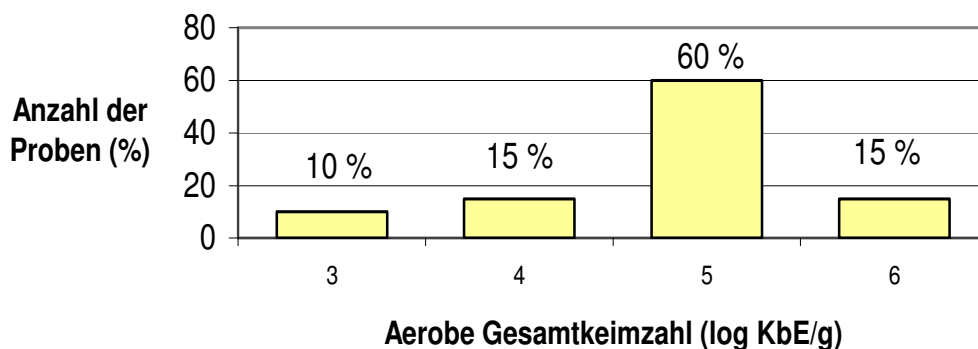


Abb. 39: Aerobe Gesamtkeimzahl in marinierten Fleischzubereitungen (n=20) aus dem Einzelhandel zum Zeitpunkt des Erwerbs.

Untersuchung der Proben nach Kühlung für 7 Tage bei 4 °C

In vier Produkten (15%, n=20) wurde eine aerobe Gesamtkeimzahl von 10^7 KbE/g detektiert. In der Hälfte der Proben (10; 50%) wurde eine Belastung von 10^6 KbE/g festgestellt (Abb. 40 und Tabelle 36b [Anhang]).

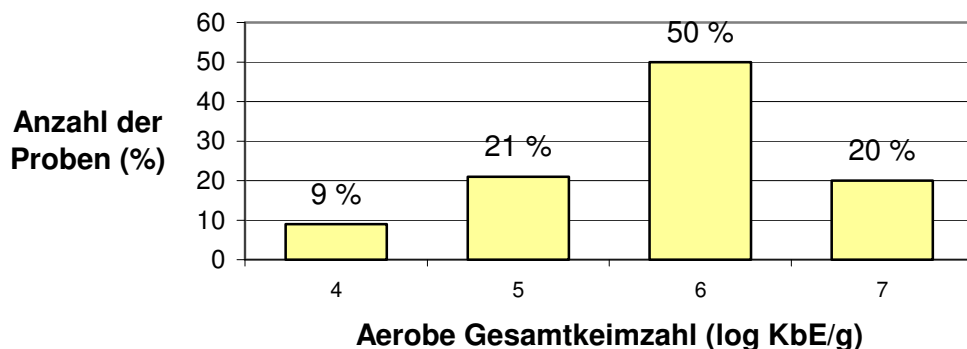


Abb. 40: Aerobe Gesamtkeimzahl in marinierten Fleischzubereitungen (n=20) aus dem Einzelhandel nach Kühlung (7d bei 4 °C).

4.6.1.2 Anzahl präsuntiver *B. cereus*Untersuchung der Proben zum Zeitpunkt des Erwerbs

In elf Produkten (55%) wurde eine Anzahl präsuntiver *B. cereus* von $<10^1$ KbE/g detektiert, in den verbleibenden neun (45 %) zwischen 10^1 und 10^2 KbE/g (Abb. 41 und Tab. 36a [Anhang]).

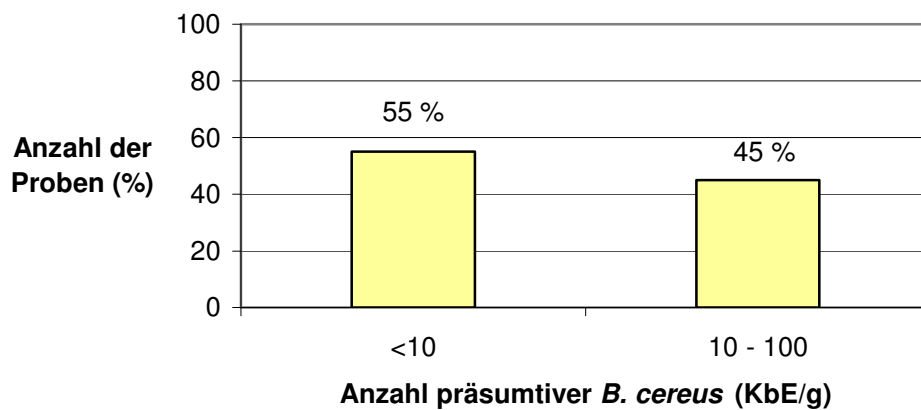


Abb. 41: Anzahl präsuntiver *B. cereus* in marinierten Fleischzubereitungen (n=20) aus dem Einzelhandel zum Zeitpunkt des Erwerbs.

Untersuchung der Proben nach Kühlung für 7 Tage bei 4 °C

In zwölf Produkten (58%) wurde eine Anzahl präsuntiver *B. cereus* von $<10^1$ KbE/g detektiert, in den verbleibenden acht (42 %) von 10^1 bis 10^2 KbE/g (Abb. 42 und Tab. 36b [Anhang]).

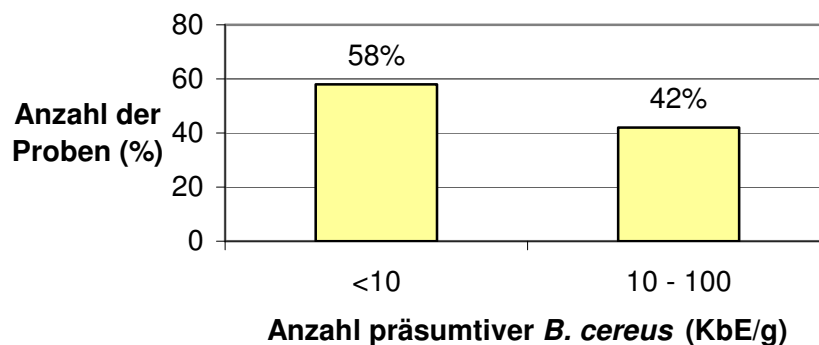


Abb. 42: Anzahl präsuntiver *B. cereus* in marinierten Fleischzubereitungen (n=20) aus dem Einzelhandel nach Kühlung (7d bei 4 °C).

4.6.2 Proben aus eigener Herstellung

4.6.2.1 Aerobe Gesamtkeimzahl

Untersuchung der Proben zum Zeitpunkt der Herstellung

Eine aerobe Gesamtkeimzahl von 10^4 KbE/g wurde in 5 % der Proben (n=20) festgestellt, von 10^5 KbE/g in 60 % sowie von 10^6 KbE/g in 35 % der Produkte (Abb. 43 und Tab. 37a [Anhang]).

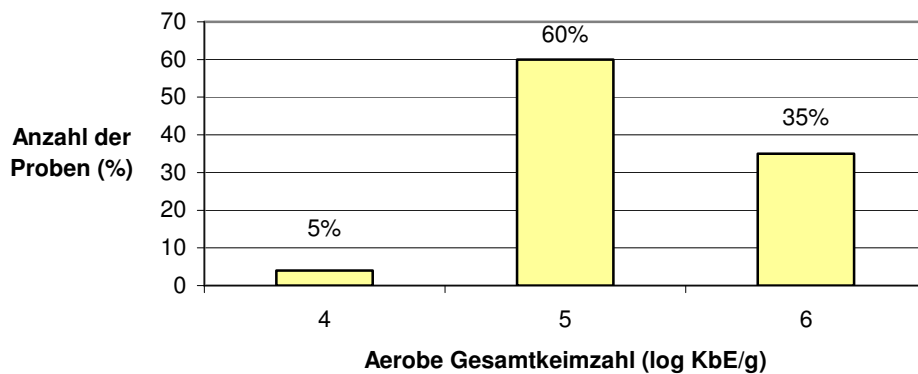


Abb. 43: Aerobe Gesamtkeimbelastung mariniertes Fleischzubereitungen aus eigener Herstellung.

Untersuchung der Proben nach Kühlung für 7 Tage bei 4 °C

Insgesamt 15 (75 %; n=20) der Proben aus eigener Herstellung wiesen eine aerobe Gesamtkeimzahl von 10^7 KbE/g auf, sowie fünf dieser Proben (25 %) eine Keimzahl von 10^6 KbE/g (Abb. 44 und Tab. 37b [Anhang]).

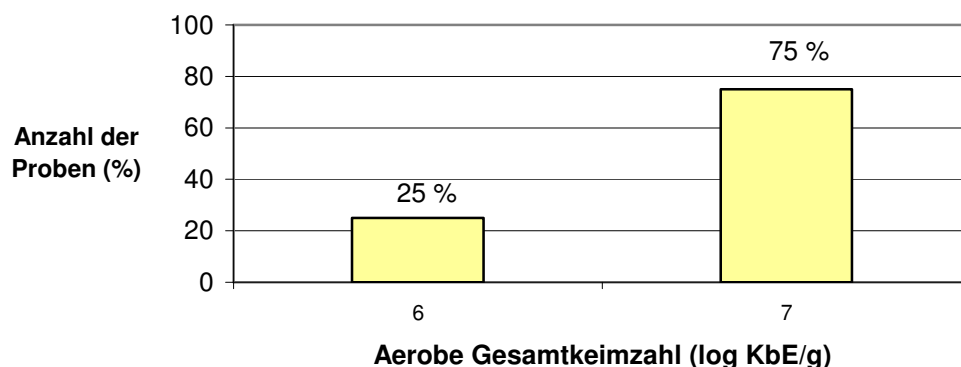


Abb. 44: Aerobe Gesamtkeimbelastung mariniertes Fleischzubereitungen aus eigener Herstellung nach Kühlung (7d bei 4 °C).

4.6.2.2 Anzahl präsuntiver *B. cereus*Untersuchung der Proben zum Zeitpunkt der Herstellung

In elf Produkten (55 %; n=20) wurde eine Anzahl präsuntiver *B. cereus* zwischen 10^1 und 10^2 KbE/g festgestellt. In den verbleibenden neun Proben (45 %) wurde kein *B. cereus* detektiert (Abb. 45 und Tab. 37a [Anhang]).

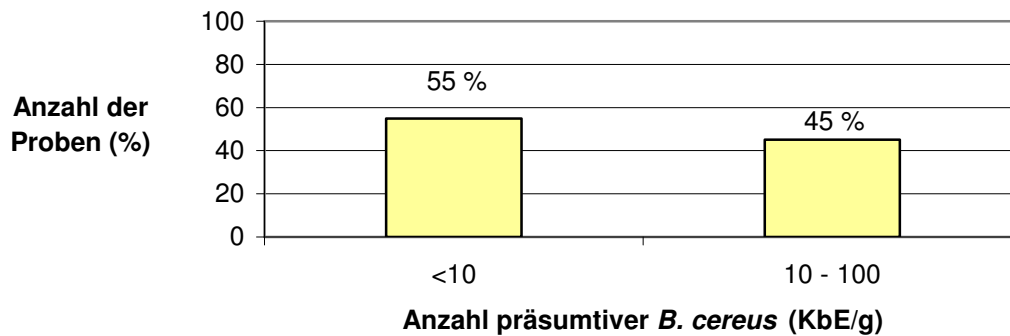


Abb. 45: Anzahl präsuntiver *B. cereus* in marinierten Fleischzubereitungen aus eigener Herstellung.

Untersuchung der Proben nach Kühlung für 7 Tage bei 4 °C

In sieben Produkten (34 %; n=20) wurde eine Anzahl präsuntiver *B. cereus* zwischen 10^1 und 10^2 KbE/g festgestellt. In dreizehn Proben (66 %) wurde kein *B. cereus* detektiert (Abb. 46 und Tab. 37b [Anhang]).

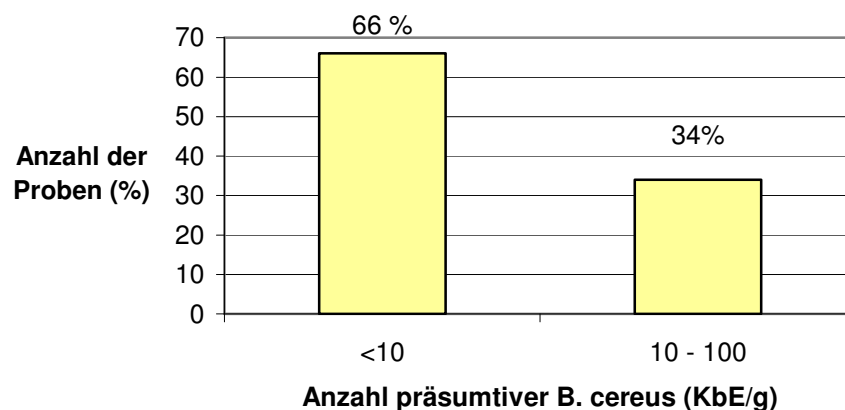


Abb. 46: Anzahl präsuntiver *B. cereus* in marinierten Fleischzubereitungen aus eigener Herstellung.

5. Diskussion

B. cereus ist ein ubiquitärer Sporenbildner, der sowohl lebensmitteltechnologische als auch -hygienische Relevanz besitzt: Aufgrund ausgeprägter proteolytischer Eigenschaften zählt er zu den wichtigsten Verursachern von Qualitätsminderung und Verderb bei Lebensmitteln (Heyndrickx und Scheldeman, 2002). Daneben kommt Toxin-bildenden Vertretern eine große Bedeutung als Auslöser Lebensmittelbedingter Erkrankungen zu. So können pathogene *B. cereus* beim Menschen zwei Formen einer gastrointestintalen Erkrankung hervorrufen, das diarrhöeische und das emetische Syndrom (Granum, 2001). Als Sporenbildner können diese Keime Erhitzungsprozesse von Lebensmitteln / Speisen überleben, unter für sie günstigen Bedingungen wieder auskeimen und sich vermehren (Kramer und Gilbert, 1989).

Da nahezu alle Isolate aus Lebensmitteln ein enterotoxisches Potential aufweisen, stellt sich eine lebensmittelhygienische Beurteilung von *B. cereus* gegenwärtig problematisch dar.

Gewürze werden vielfach als Vektor für *B. cereus*-Kontaminationen von Lebensmitteln genannt (EFSA, 2004; ICMSF, 2005), weshalb das Vorkommen dieses Erregers in Gewürzen unter den Gesichtspunkten des vorbeugenden Verbraucherschutzes und der Qualitätssicherung zu betrachten ist. Aktuelle Studien über *B. cereus* als mögliche Eintragsquelle sind allerdings nicht publiziert. Auch liegen derzeit nur wenig aktuelle Angaben aus dem europäischen Raum über die tatsächliche Belastung von Gewürzen mit diesem Erreger vor.

Vor diesem Hintergrund sollte das Vorkommen und die Toxizität von *B. cereus* in Gewürzen untersucht werden, um zeitgemäße Daten zur Bewertung der mikrobiologischen Sicherheit von Gewürzen zu gewinnen. Hierfür wurden folgende Aspekte / Fragestellungen bearbeitet:

- Erstellung einer Übersicht über das Vorkommen von *B. cereus* in Gewürzen sowie deren mikrobiologische Gesamtbelastung mittels konventioneller Analysemethoden,
- Etablierung einer Real-Time PCR für einen schnellen und zuverlässigen *B. cereus* Nachweis in Gewürzproben, als Alternative zu zeitaufwendigen und diagnostisch ungenauen konventionellen Kulturverfahren (MPN- Methode),

- Charakterisierung des Toxinprofils von *B. cereus* Isolaten, die aus den Gewürzproben gewonnen wurden,
- Untersuchung mittels Challenge-Test, inwieweit eine Kontamination von Lebensmitteln mit *B. cereus* tatsächlich aus der Verwendung von Gewürzen resultiert.

5.1 Mikrobiologischer Status der untersuchten Gewürze

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwölf verschiedene Gewürzsorten untersucht. Je Sorte wurden fünf Proben analysiert: je zwei Erzeugnisse aus konventioneller und ökologischer Herstellung sowie ein Erzeugnis aus der Rohstoffproduktion. Zunächst wurde mittels kultureller Verfahren die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl in diesen Gewürzprodukten bestimmt, sowie anschließend die Belastung mit *Enterobacteriaceae* und präsumtiven *B. cereus*.

Insgesamt wiesen die analysierten Produkte eine mittel- bis hochgradige Gesamtkeimbelastung auf: In 42 % der Proben wurden Gesamtkeimzahlen von 10^5 bis 10^7 KbE/g festgestellt. Eine Bewertung dieser Ergebnisse anhand von Richt- und Warnwerten ist derzeit nicht möglich, da weder von der DGHM noch von der Europäischen Kommission Empfehlungen für eine akzeptable aerobe Gesamtkeimbelastung existieren.

Geringe Keimbelastungen ($<10^1$ bis 10^4 KbE/g) wurden in den Sorten Koriander, Kümmel, Nelken und Rosmarin detektiert. Hohe Keimzahlen (10^5 bis 10^7 KbE/g) zeigten hingegen Curry, Ingwer, Majoran, Paprika sowie schwarzer und weißer Pfeffer. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Angaben anderer Untersuchungen überein, in denen die aerobe Gesamtkeimzahl dieser als mikrobiologisch problematisch geltenden Gewürze, Werte von 10^6 bis 10^9 KbE/g erreichte (Banerjee und Sarkar, 2003; De Boer et al., 1985; Hara-Kudo et al., 2006; Wojcik-Stopczynska und Jakubowska, 2005). In Abhängigkeit von der Produktionsart der Gewürze, wurden hohe aerobe Keimzahlen in einem Viertel der konventionell hergestellten Produkte (6; n=24), sowie in (nahezu) der Hälfte der ökologischen (12; n=24) und Rohstoffprodukte (5; n=12) festgestellt.

Die variierenden Keimbelastungen zwischen den einzelnen Gewürzsorten sowie zwischen den Produkten verschiedener Herstellungsweisen, sind auf eine Vielzahl

unterschiedlicher Einflussfaktoren zurückzuführen. Auf diese soll jedoch erst nach zusammenfassender Betrachtung der Untersuchungsergebnisse zur Belastung von Gewürzen mit *Enterobacteriaceae* und *B. cereus* näher eingegangen werden.

Die Kontamination der analysierten Gewürze (n=60) mit *Enterobacteriaceae* lag zwischen $<10^1$ und 10^3 KbE/g. Mehr als zwei Drittel der Proben (39; 65 %) wiesen Keimzahlen von $<10^1$ KbE/g auf. Die höchste Belastung (10^3 KbE/g) wurde in 13,3 % der Proben festgestellt.

Die Europäische Kommission hat in einem Programm zur Bewertung der mikrobiologischen Sicherheit von Gewürzen, einen Warnwert für *Enterobacteriaceae* von 10^3 KbE/g vorgeschlagen (Europäische Kommission, 2004). Demnach sind in der vorliegenden Arbeit acht Proben (13,3 %) als unzureichend zu bewerten.

Eine Probe stammte aus konventioneller- und vier Proben aus ökologischer Herstellung, sowie drei Proben aus der Rohstoffproduktion. Hierbei handelte es sich um die Gewürzsorten Basilikum, Curry, Ingwer, Koriander, Kümmel und Majoran. In anderen Studien wurde in den genannten Sorten eine *Enterobacteriaceae* - Belastung bis 10^4 und 10^5 kbE/g festgestellt (Banerjee und Sarkar, 2003; De Boer et al., 1985; Zschaler, 1979).

In Nelken, schwarzer Pfeffer und Rosmarin waren keine *Enterobacteriaceae* nachweisbar. Hingegen finden sich in der Literatur Angaben, dass schwarzer Pfeffer mit bis zu 10^5 KbE/g belastet sein kann (Banerjee und Sarkar, 2003).

Obwohl in den drei genannten Gewürzen keine *Enterobacteriaceae* detektiert wurden, kann eine Kontamination der Proben mit Salmonellen, humanpathogenen Vertretern dieser Familie, nicht ausgeschlossen werden. So können Salmonellen nur durch eine optimale Voranreicherung nachgewiesen werden, da antimikrobiell wirksame Substanzen von Gewürzen die Vermehrung dieser Keime während der Analyse hemmen können. Dieser Effekt wurde für Knoblauch, Zwiebeln und Nelken belegt (Graubaum et al., 2005). Verschiedene Salmonellenbefunde wurden bisher für Paprika und schwarzem Pfeffer publiziert (Banerjee und Sarkar, 2003; D'Aoust, 1994; Hara-Kudo et al., 2006).

Die Bestimmung präsumtiver *B. cereus* in den Gewürzprodukten (n=60) erfolgte zunächst quantitativ auf PEMBA. Insgesamt wiesen die Proben eine geringgradige Belastung mit diesem Erreger auf, die zwischen $<10^1$ (36,7 %) und 10^3 KbE/g (20 %)

lag. Somit muss festgehalten werden, dass keine Gewürzprobe die Richt- und Warnwerte für *B. cereus* in Gewürzen (DGHM, 2007) überschritten hat. Diese werden von der DGHM mit 10^3 bzw. 10^4 KbE/g angegeben. Zudem ist die bakteriologische Sicherheit der untersuchten Gewürze hinsichtlich der *B. cereus* - Kontamination gemäß einem Bewertungsschema der Europäischen Kommission für mikrobiologischen Sicherheit von Gewürzen als zufriedenstellend zu beurteilen. Der empfohlene Richtwert liegt hier ebenfalls bei 10^3 KbE/g (Europäische Kommission, 2004).

Unter den einzelnen Gewürzsorten wurde diese Keimbelastung in Basilikum, Curry, Ingwer und Majoran festgestellt. Zudem waren diese Proben neben Paprika und schwarzem Pfeffer häufig mit präsumtiven *B. cereus* belastet, d.h. jeweils vier bzw. fünf der analysierten Proben (n=5) je Gewürz. Diese Werte stimmen sehr gut mit den Angaben anderer Studien überein, in denen die genannten Sorten ebenfalls eine *B. cereus* Belastung bis 10^3 KbE/g aufwiesen (Erol et al., 1999; Graubaum et al., 2005; Kneifel und Berger, 1994; Zschaler, 1979). Für Curry und Ingwer sind zudem Analysen publiziert, die eine *B. cereus* Anzahl bis 10^5 KbE/g bestimmten (Kneifel und Berger, 1994).

Die geringsten *B. cereus* - Kontaminationen wiesen Nelken auf. Hier wurden in vier Proben $<10^1$ KbE/g, bzw. in einer Probe 10^1 KbE/g nachgewiesen. Allerdings sind für diese Gewürzsorten auch *B. cereus* Gehalte bis 10^3 und 10^4 KbE/g beschrieben (Giaccone et al., 1996; Kneifel und Berger, 1994).

In Abhängigkeit von der Produktionsart, wurde eine Anzahl präsumtiver *B. cereus* zwischen $<10^1$ und 10^3 KbE/g, sowohl in den konventionell und ökologisch hergestellten Gewürzen als auch in den Rohstoffprodukten detektiert. Nach einer statistischen Auswertung der *B. cereus*- Belastung lag der Median-Wert in konventionell und ökologisch hergestellten Produkten (je n=24) bei 10^1 KbE/g, in Rohstoffprodukten (n=12) bei 10^2 KbE/g. Dies ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen Probenzahlen zwischen den konventionellen / ökologischen Gewürzen und den Rohstoffen nur als eine Tendenz anzusehen.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden insgesamt 171 präsumtive Kolonien aus den untersuchten Gewürzproben (n=60) isoliert. Nach biochemischer und molekularbiologischer Analyse der Zugehörigkeit der Isolate zur Spezies *B. cereus*, wurden 151 Kolonien als *B. cereus* bestätigt. Diese Isolate stammten aus 35

Gewürzproben, was einem Vorkommen von *B. cereus* in 58 % der Proben entspricht. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus der Real-Time PCR, über die *B. cereus* direkt in Gewürzen nachgewiesen wurde, ergibt sich insgesamt ein Anteil *B. cereus* positiver Proben an der Gesamtzahl von 70 %. In der Literatur variieren die Angaben hierzu stark, sie liegen zwischen 4 und 85 % der jeweils untersuchten Proben (Banerjee und Sarkar, 2003; Giaccone et al., 1996; Little et al., 2003).

Bezogen auf die Herstellungsart der untersuchten Gewürzprodukte, lag der Anteil *B. cereus* positiver Proben an der Gesamtprobenzahl sowohl in konventionell und ökologisch hergestellten Gewürzen als auch in Gewürzrohstoffen bei ungefähr zwei Dritteln. Unter den einzelnen Gewürzen wiesen Curry, Ingwer, Kümmel, Koriander und schwarzer Pfeffer die häufigste Belastung mit *B. cereus* auf, in allen der insgesamt fünf analysierten Proben je Sorte wurde der Erreger nachgewiesen. In den Sorten Basilikum, Majoran, Paprika und weißer Pfeffer waren jeweils vier der Proben (n=5) *B. cereus* positiv. Nelkenprodukte (n=5) wiesen hingegen nur drei positive Proben auf, sowie Knoblauchprodukte nur eine (n=5). Insgesamt stimmten diese Ergebnisse sehr gut mit denen der konventionellen Bestimmung auf PEMBA überein. Auch hier zeigten Curry, Basilikum, Ingwer und Majoran die häufigste, sowie Nelken und Knoblauch die geringste Belastung. Die Angaben zum Vorkommen von *B. cereus* differieren allerdings zwischen den verschiedenen publizierten Studien. So wurde z. B. in einer Untersuchung von Pfeffer *B. cereus* in 80 % der Gesamtprobenzahl (n=25) bestimmt, während dieser Keim in einer anderen Studie in keiner Pfefferprobe nachgewiesen wurde (n=5) (Banerjee und Sarkar, 2003; Erol et al., 1999).

Die Differenz zwischen der Anzahl präsumtiver *B. cereus* Isolate (n=171) und der Anzahl bestätigter Isolate (n=151) ist vermutlich auf eine verminderte Spezifität des Nährbodens infolge der hohen Begleitflora der Gewürze zurückzuführen. Durch diese werden die diagnostischen Charakteristika von *B. cereus* auf PEMBA negativ beeinflusst (Fricker et al., 2007b). So können auf diesem Nährboden noch andere Eigelb-verwertende Keime wachsen, wie z. B. *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* oder *Proteus vulgaris* (Oxoid, 1993), die dann anhand der Kolonief orm und -farbe nur schlecht von *B. cereus* unterscheidbar sind. Zudem zeigen alle Vertreter der *B. cereus*-Gruppe, bis auf *B. anthracis*, eine starke Expression von Proteinasen, die zu einem Anstieg des pH-Wertes führen und somit auch im Erscheinen typischer pfauenblauer Kolonien auf PEMBA resultieren (Fricker et al.,

2007b). So wurden in dieser Studie zwei der Isolate, die nicht als *B. cereus* bestätigt wurden, als *B. thuringiensis* identifiziert. Diese Aspekte zeigen eingehend die Notwendigkeit, neue molekularbiologische Verfahren, wie die Real-Time PCR, als Alternative zu den herkömmlichen Kulturverfahren zu etablieren.

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse zur mikrobiologischen Belastung von Gewürzen ist zu festzustellen, dass sowohl innerhalb dieser Studie als auch im Vergleich zu anderen Studien, die Keimzahlen zwischen den verschiedenen Gewürzsorten häufig differieren. Dies ist auf eine Vielzahl unterschiedlicher Einflussfaktoren zurückzuführen:

Zum einem ist die mikrobielle Kontamination stark abhängig von der Art und Herkunft der Gewürzsorte sowie von Umwelteinflüssen (Baxter und Holzapfel, 1982; Bhat et al., 1987; Purseglove et al., 1981). Unter anderem weisen Kräuter und Gewürze, die in Bodennähe wachsen, wie z. B. Majoran und Basilikum, meist höhere Keimgehalte als bodenferne Gewürze, wie z. B. Nelken, auf (Purseglove et al., 1981). In der vorliegenden Arbeit wurden in den Sorten Basilikum und Majoran ebenfalls eine höhere mikrobielle Kontaminationen als im Vergleich zu Nelken festgestellt.

Im Zusammenhang mit der geringen Keimbelastung von Nelken, sind zudem die antimikrobiellen Eigenschaften einiger Gewürze, wie Nelken, Knoblauch und Zimt, als ein wesentlicher Einflussfaktor zu nennen. Untersuchungen zeigten, dass Extrakte dieser Gewürze einen inhibitorischen Einfluss auf das Wachstum pathogener Lebensmittelkeime, wie *B. cereus*, ausüben (Sofia et al., 2006; Shan et al., 2007).

Hingegen ist die hohe mikrobiologische Kontamination von Curry wahrscheinlich darauf zurückzuführen, das es sich hier um eine Gewürzmischung aus verschiedenen Einzelgewürzen handelt, die untereinander ein stark variierendes Keimspektrum aufweisen (Graubaum et al., 2005).

Neben den genannten Faktoren beeinflussen aber auch Trocknung, Transport, Verarbeitung und Lagerung entscheidend den mikrobiologischen Status von Gewürzen (Julseth und Deibel, 1974; Juri et al., 1986; Kaferstein, 1976; Malmsten et al., 1991). So sind luftgetrocknete Gewürze meist weitaus höher keimbelastet als mechanisch / gefriergetrocknete Gewürze (Malmsten et al., 1991), und vakuumverpackte Gewürzprodukte stärker kontaminiert als aerob verpackte

(Malmsten et al., 1991). Auch weisen Produkte, die bei 35 °C gelagert worden sind, höhere Keimzahlen auf als diese bei 25 °C (Malmsten et al., 1991).

Desweiteren erklären die Unterschiede in der Gewürzveredelung die differierenden Keimbelastungen zwischen den konventionell- / ökologisch-hergestellten Produkten und den Rohstoffen. So lassen die Ergebnisse dieser Studie tendenziell vermuten, dass konventionelle Gewürze etwas geringer belastet sind als ökologische Gewürze und Rohstoffprodukte.

Im Öko-Anbau von Gewürzen ist z. B. das sehr effektive Verfahren der ionisierenden Bestrahlung zur Entkeimung verboten. Zudem dürfen keine Pestizide eingesetzt werden (Felgentreff und Otto, 2005). Bei den Rohstoffen ist zu bedenken, dass diese größtenteils aus Entwicklungsländern stammen, in denen die Lebensmittelhygiene-Standards im Vergleich zu den westlichen Ländern oft wesentlich geringer sind. Zudem handelt es sich hier um reine Naturprodukte, die keiner mikrobiellen Dekontamination unterzogen wurden.

Da in dieser Arbeit die Anzahl der Proben je Gewürzsorte (n=5) für statistische Auswertungen zu gering waren, kann die Tendenz zum stark- (z. B. Curry, Ingwer) oder gering belasteten Gewürz (z. B. Nelken, Knoblauch) nur als eine Vermutung angesehen werden. Diese müsste in weiteren Untersuchungen mit höheren Probenzahlen überprüft werden. Ähnliches gilt für den Vergleich der Gewürze in Abhängigkeit von der Herstellungsweise. Da die Probenzahl zwischen konventionellen / ökologischen Gewürzen (je n=24) und Rohstoffprodukten (n=12) differierten, kann auch hier die Tendenz, dass konventionelle Produkte etwas geringer keimbelastet sind, nur als Vermutung betrachtet werden. Diese müsste in weiteren Untersuchungen mit entsprechenden Probenzahlen bestätigt werden.

Weitergehend wäre die Belastung der Rohstoffe in Abhängigkeit zu ihrer Herkunft, den Provenienzen, zu untersuchen. Dies ist angesichts eines stetig wachsenden Welthandels im Zuge der Globalisierung insbesondere unter den Gesichtspunkten „Qualitätsverbesserung/ -gewährleistung“ zu betrachten.

5.2 Etablierung eine Real – Time PCR als Alternative zum konventionellen MPN-Verfahren

Um auch geringste Mengen des Erregers erfassen zu können wurden die Produkte, in denen eine Kontamination von $\leq 10^1$ KbE/g festgestellt wurde, zusätzlich nach selektiver Anreicherung im MPN-Verfahren und mittels Real-Time PCR Assay untersucht. Letzterer wurde als Alternative zum konventionellen MPN-Verfahren erarbeitet. Dieses Kulturverfahren ist in der Durchführung zeitaufwendig (ca. 5 d) und ermöglicht nur den Nachweis präsumtiver *B. cereus*. Da der hierfür verwendete Nährboden (PEMBA) insbesondere bei einer hohen Begleitflora der Gewürze eine verminderte Spezifität aufweist (Fricker et al., 2007b), sind weiterführende molekularbiologische und/oder biochemische Analysen zur Speziesidentifizierung erforderlich. Dies ist wiederum sehr zeitintensiv. Hingegen ermöglicht die Real-Time PCR einen direkten Erregernachweis, der keiner weiteren Speziesidentifikation mehr bedarf und innerhalb von zwei Tagen durchführbar ist. Hierfür wurde die DNA-Extraktion dahingehend etabliert, dass auch die DNA noch versporter *B. cereus* mit erfasst werden kann. Zum anderen wurde das Extraktionsprotokoll so weit optimiert, dass PCR-Inhibitoren, die auf Inhaltsstoffe der Gewürze zurückzuführen sind, eliminiert werden. Aufgrund des vorangehenden Schrittes der selektiven Anreicherung ist keine absolute Erregerquantifizierung realisierbar. Jedoch sind durch diesen auch im MPN-Verfahren nur tendenzielle Aussagen möglich. Die Ergebnisse der Real-Time PCR wurden daher nur qualitativ, d.h. als *B. cereus*-positiv oder *B. cereus*-negativ, gewertet.

Im MPN-Verfahren wurden bei 16 der insgesamt 24 analysierten Proben, die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung auf PEMBA bestätigt. Hingegen wurde in acht Produkten eine *B. cereus* Belastung zwischen 10^1 und 10^2 KbE/g festgestellt. Für eine Probe konnte in der MPN-Tabelle anhand der gebildeten Indexziffer keine Anzahl präsumtiver *B. cereus* ermittelt werden. Dies ist entweder auf eine fehlerhafte Methodik oder einen ungeeigneten Einsatzbereich des Verfahrens zurückzuführen (LFGB, 2006).

Mittels Real-Time PCR wurde *B. cereus* in insgesamt 21 der untersuchten Proben (n=24) detektiert. In vier dieser Proben wurde der Erreger in den zwei

Kulturverfahren mit einer Anzahl von $<10^1$ bzw $<0,30 \times 10^1$ bestimmt, d. h. er war nicht nachweisbar.

In drei Produkten wurde der Keim mittels PCR nicht festgestellt. Jedoch wurde *B. cereus* in diesen Proben auch nicht über die zwei konventionellen Kulturverfahren identifiziert. Hierbei handelte es sich um zwei Proben „Knoblauch“ sowie um eine Probe „Pfeffer, weiß“.

Insgesamt ist daher festzustellen, dass die Real-Time PCR eine zuverlässige Alternative zum konventionellen MPN-Verfahren bietet, um auch kleinste Mengen des Erregers in Gewürzen identifizieren zu können. Dies ist insbesondere im Hinblick auf das gesundheitsgefährdende Potential pathogener *B. cereus* von Bedeutung.

5.3 Relatives Toxinbildungsvermögen der *B. cereus* Isolate

Angesichts des gesundheitsgefährdenden Risikos, dass von pathogenen *B. cereus* ausgeht, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit das diarrhoeische und emetische Toxinbildungsvermögen der Isolate näher charakterisiert.

Zunächst wurde mittels PCR-Analysen die diarrhöische Toxinogenität der *B. cereus* Isolate (n=151) untersucht. Das Vorliegen aller drei Gene des HBL-Komplexes (*hblA*, *hblC*, *hblD*), welches eine maximale biologische Aktivität dieses Enterotoxins bedingt, wurde in insgesamt 61 (40,4 %) Isolaten festgestellt. Auch in anderen Studien wiesen 40 – 60 % der untersuchten *B. cereus* Stämme die Gene für alle drei Komponenten auf (Hansen und Hendriksen, 2001; in't Veld et al., 2001; Pruss et al., 1999).

Die PCR-Analysen zum Vorkommen der Gene des Nhe-Komplex, detektierten die Kombination der codierende Gene (*nheA*, *nheB*, *nheC*), die auch bei diesem Enterotoxin für eine maximale biologische Aktivität verantwortlich ist, in insgesamt 105 (69,5 %) der untersuchten *B. cereus* Isolate. Dieses Ergebnis erscheint sehr niedrig, da andere Studien ein Vorkommen aller drei Gene in ≥ 90 % der untersuchten Stämme ergaben (Guinebretiere et al., 2002; Hansen und Hendriksen, 2001; in't Veld et al., 2001; Moravek et al., 2006).

Die Diskrepanz zwischen diesen Angaben kann auf falsch-negative Ergebnisse in der PCR zurückzuführen sein. Diese resultieren vermutlich aus einem Polymorphismus in den *nhe*-Sequenzen, der insbesondere für *B. cereus* Stämme

aus Lebensmitteln beschrieben wurde (Guinebretiere et al., 2002.). Zur Bestätigung PCR-negativer Ergebnisse wurden daher in anderen Studien Southern-Blot Analysen als ein PCR-unabhängiges Verfahren durchgeführt (Guinebretiere et al., 2002.; Moravek et al., 2006). Möglicherweise sind die abweichenden Ergebnisse aber auch darauf zurückzuführen, dass nicht geklärt ist, ob es sich bei den 151 *B. cereus* Isolaten um 151 verschiedene Stämme handelt. Somit kann eine Verfälschung der Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Dies müsste in weiterführenden Untersuchungen zur Biotypisierung, wie z.B. der Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE), überprüft werden (Liu et al., 1997).

Bezogen auf die Herstellungsart des Gewürz, aus denen die *B. cereus* Isolate (n=151) gewonnen wurden, lässt die Analyse keine Unterschiede in der Toxinogenität der Isolate erkennen. Hingegen lässt sich hinsichtlich der Gewürzsorte, aus denen die Isolate stammen, die Tendenz ableiten, dass Isolate aus Basilikum und Knoblauch eine geringe Toxinogenität, Isolate aus Majoran und Rosmarin hingegen eine hohe Toxinogenität aufweisen. Jedoch kann aufgrund der sehr unterschiedlichen Anzahl der Isolate kein aussagekräftiger Vergleich gezogen werden. Auch finden sich in der Literatur hierzu keine Angaben.

Für den direkten Nachweis des Nhe- und des HBL- Enterotoxins wurden die *B. cereus* Isolate (n=151) in zwei kommerziell erhältliche Immunoassays (BDE ELISA-Kit, Tecra und BCET-RPLA Kit, Oxoid) eingesetzt. Unter Verwendung des ELISA wurden 122 (81 %) Isolate als Nhe-Bildner identifiziert, mittels des RPLA -Kits 88 (58 %) als HBL-Bildner. Alle HBL-Bildner waren zugleich auch Nhe-Bildner. Dies stimmt gut mit den Ergebnissen anderer Studien überein (Soares et al., 2005; Banerjee und Sarkar, 2004). Allerdings ist beim Vergleich mit den Angaben anderer Studien immer auch die quantitativ stark divergierende Enterotoxinproduktion von *B. cereus* Stämmen zu berücksichtigen (Moravek et al., 2006). Untersuchungen ergaben, dass „food-poisoning“- Isolate tendenziell höhere Enterotoxinmengen, insbesondere Nhe, als „food-borne“- Isolate produzieren (Guinebretiere et al., 2002; Moravek et al., 2006). Dies lässt einen Unterschied in der Genexpression zwischen „food-borne“ und „food-poisoning“ *B. cereus* Stämmen vermuten (Guinebretiere et al., 2002). Somit ist letztendlich eine fundierte Aussage zum enterotoxischen Potential nur über eine Quantifizierung der Toxine möglich (Moravek et al., 2006).

In der vorliegenden Studie zeigte sich bei einigen der untersuchten *B. cereus* Isolate eine Diskrepanz zwischen der Toxinogenität und Toxinexpression: Im ELISA, der auf dem Nachweis der NheA-Komponente basiert, wurden 122 Isolate als Nhe-Produzenten identifiziert. Mittels PCR-Analysen wurde das *nheA*-Gen in 129 Isolaten detektiert, die Kombination der Gene *nheA*, *nheB/C*, die als Voraussetzung für eine maximale biologische Toxinaktivität gilt, in 105 Isolaten. Hingegen wurde das *nheA*-Gen als auch die gleichzeitige Nhe-Bildung in nur 103 Isolaten festgestellt, das Vorliegen aller drei Gene des *nhe*-Operons und die Nhe-Toxinbildung bei 78 Isolaten.

Mittels des BCET-RPLA Testkits, welches die hblC-Komponente detektiert, wurden 88 Isolate als HBL- Bildner identifiziert. Über PCR-Analysen wurde das *hblC*-Gen in 94 Isolaten nachgewiesen, das gemeinsame Vorkommen der Gene *hblA*, *hblC*, und *hblD* in 61 Isolaten. Insgesamt 79 Isolate zeigten das *hblC*-Gen und 50 Isolate die Kombination der drei Gene bei einer gleichzeitigen HBL-Bildung.

Die Unterschiede zwischen der Toxinogenität und Toxinexpression resultieren möglicherweise aus der eingeschränkten Spezifität der Immunoassays. So weisen beide Tests neben den genannten Toxinkomponenten weitere Exoproteine von *B. cereus* nach, wodurch falsch-positive Ergebnisse erzielt werden können (Beecher und Wong, 1994b; Lund und Granum, 1996a). Hingegen wurde auch gezeigt, dass BCET-RPLA negative Stämme, im Affenfütterungstest Diarrhoeisches Toxin produzierten (Day et al., 1994). So sind im Hinblick auf die quantitativ divergierende Enterotoxinproduktion von „food-borne“ und „food-poisoning“ *B. cereus* (Moravek et al., 2006) insbesondere bei der Analyse gering-toxinbildender *B. cereus* Stämme falsch negative Ergebnisse nicht auszuschließen (Brett, 1998).

Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der PCR-Analysen und der Immunoassays kann jedoch auch auf falsch-negative Ergebnisse in der PCR zurückzuführen sein. Diese resultieren, wie bereits oben beschrieben, vermutlich aus einem Polymorphismus in den *hbl*- und *nhe*-Sequenzen, der überwiegend bei *B. cereus* Stämmen aus Lebensmitteln beobachtet wurde (Guinebretiere et al., 2002).

Insgesamt ist festzuhalten, dass in allen untersuchten Gewürzsorten diarrhöische Toxinbildner identifiziert wurden. Eine Tendenz über ein mehr oder weniger gehäuftes Vorkommen in den verschiedenen Sorten ist nicht festzustellen. Allerdings kann aufgrund der sehr unterschiedlichen Anzahl der Isolate kein statistisch

abgesicherter Vergleich gezogen werden. In der Literatur finden sich Angaben, dass HBL-Bildner in Nelken, Koriander und schwarzem Pfeffer nachgewiesen wurden. In dieser Studie wurde in Nelken Nhe-Produzenten, nicht aber HBL-Produzenten identifiziert. Über das Vorkommen von Nhe-Bildnern sind keine Daten publiziert. Bezogen auf die Herstellungsart, aus der die Isolate gewonnen wurden, sind ebenfalls keine eindeutigen Unterschiede im diarrhöischen Toxinbildungsvermögen zu erkennen.

Zur Bestimmung des emetischen Toxinbildungsvermögens wurden alle *B. cereus* Isolate hinsichtlich einer ersten Charakterisierung einem Stärkehydrolyse-Test unterzogen, da nur Stärkehydrolyse-negative Stämme emetisches Toxin produzieren können (Agata et al., 1996; Nishikawa et al., 1996). Alle *B. cereus* Isolate, die keine Stärkehydrolyse zeigten (n=60), wurden dann mittels PCR-Analysen hinsichtlich ihrer emetischen Toxinogenität charakterisiert und über einen Hep2-Zellen/MTS-Zellkulturtest auf ihre Zytotoxizität überprüft.

Der für emetische *B. cereus* spezifische PCR-Assay basiert auf dem Nachweis der nichtribosomalen Peptidsynthetase (NRPS), welche bedeutend an der Synthese des Cereulids beteiligt ist (Ehling-Schulz et al., 2004b). In der vorliegenden Arbeit wurde NRPS in insgesamt 16 Isolaten detektiert. Bezogen auf die Gesamtzahl der *B. cereus* Isolate (n=151) entspricht dies einem Anteil von 11%. Im parallel durchgeführten Zellkulturtest wurden sieben Isolate anhand ihrer zytotoxischen Aktivität als Cereulid-Produzenten identifiziert. Der Anteil der Cereulid-Bildner an der Gesamtzahl der untersuchten Isolate (n=151) lag demzufolge bei 4,6 %. Bei allen zytotoxischen Isolaten (Cereulid-Bildnern) handelte es sich zugleich um positive Emetic-PCR Isolate. Darüber hinaus waren alle Cereulid-Bildner auch Nhe-Produzenten. Die insgesamt sieben Cereulid-Produzenten wurden unter *B. cereus* Isolaten aus den Gewürzen Basilikum (10%; n=9), weißer Pfeffer (40%; n=10) und Rosmarin (100%; n=2) identifiziert. Davon stammten vier aus Rohstoffprodukten, sowie drei aus konventionell hergestellten Gewürzen. Unter den *B. cereus* Isolaten, die aus Gewürzen ökologischer Herstellung stammten, wurde kein emetischer Toxinbildner identifiziert.

Die Ergebnisse stimmen sehr gut mit denen anderer Studien überein, in denen eine Prävalenz emetischer *B. cereus* Stämme zwischen 2 und 7,5% der untersuchten Isolate festgestellt wurde (Kreuzberger, 2007; Schulz, 2004; Taylor und Gilbert, 1975). Der Unterschied zwischen der Anzahl positiver PCR Isolate und zytotoxischer

Isolate, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Isolate zwar genetisch zur Toxinbildung fähig sind, aber bei den vorliegenden Wachstumsbedingungen kein oder nur wenig Toxin exprimierten. Die Quantität der emetischen Toxinexpression hängt von einer Vielzahl extrinsischer Faktoren ab, wie z. B. Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffsättigung oder das Vorhandensein bestimmter Aminosäuren (Ehling-Schulz et al., 2004a). *In vitro* wurden die höchsten Toxintiter in 10 %iger Magermilch, im Vergleich zu Tryptose-Bouillon oder Hirn-Herz-Bouillon, festgestellt. In Peptonwasser wurde hingegen keine Cereulidproduktion detektiert (Finlay et al., 1999b). Zudem variiert die Toxinexpression unter den verschiedenen emetischen *B. cereus* Stämmen zwischen 0,02 und 230 µg / mL (Ehling-Schulz et al., 2004a).

5.4 Gewürze als mögliche Eintragsquelle für *B. cereus* in Lebensmittel

Ergänzend zum Vorkommen und zur Toxizität von *B. cereus* in Gewürzen, sollte im Challenge-Test mit marinierten Fleischzubereitungen untersucht werden, inwieweit ein Eintrag des Erregers in Lebensmittel über damit hergestellte kontaminierte Gewürze erfolgt. Im ersten Schritt erfolgte eine Analyse der mikrobiologischen Belastung des Lebensmittels. Hierfür wurden die aerobe Gesamtkeimzahl sowie die Anzahl präsumtiver *B. cereus* in marinierten Steaks aus dem Einzelhandel (n=20) bestimmt. Die Anzahl präsumtiver *B. cereus* lag zwischen $<10^1$ und 10^2 KbE/g, die aerobe Gesamtkeimbelastung zwischen 10^3 und 10^6 KbE/g. Die wiederholte Untersuchung der Proben nach siebentägiger Kühlung bei 4°C, ergab eine Zunahme der aeroben Gesamtkeimzahl um eine Zehnerpotenz. Hingegen blieb die Anzahl präsumtiver *B. cereus* gleich.

Im eigentlichen Challenge-Test wurden selbst hergestellte marinierte Fleischzubereitungen (n=20), die mit einer definierten *B. cereus* - Anzahl von 10^3 KbE/g beimpft wurden, analysiert. Diese Keimmenge richtete sich nach der höchsten Anzahl an *B. cereus*, die in der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde. Zudem entsprach sie dem derzeit empfohlenen Richtwert für *B. cereus* in Gewürzen (DGHM, 2007; Europäische Kommission, 2004). Im unbehandelten Fleisch war kein *B. cereus* nachweisbar.

Bei der Untersuchung der selbst hergestellten Produkte wurde eine aerobe Gesamtkeimzahl zwischen 10^4 und 10^6 KbE/g sowie ein Vorkommen präsumtiver *B.*

cereus zwischen $<10^1$ und 10^2 KbE/g bestimmt. Nach der Kühlagerung (7 Tage, 4 °C) der Proben, wurden wie zuvor in den Einzelhandelsproben eine Zunahme der aeroben Gesamtkeimzahl um eine Zehnerpotenz und ein gleichbleibender *B. cereus* – Gehalt verzeichnet.

Die Analysenwerte der selbst hergestellten Proben stimmten somit nahezu mit den Werten der Handelsprodukte überein, was auf optimale Versuchsbedingungen bei diesem Challenge-Versuch schließen lässt. Dieser zeigte, dass die Verwendung *B. cereus* kontaminierter Gewürze in Zusammenhang mit dem Vorkommen des Erregers in damit hergestellten Lebensmitteln besteht. Somit können Gewürze durchaus als Vektor für *B. cereus* in Lebensmittel fungieren. In einer anderen Studie wurden ähnliche Ergebnisse erzielt: In frisch zubereitem Aloo Dam, einer Kartoffel-Speise, in der kein *B. cereus* nachweisbar war, wurde nach Zugabe von kontaminierten Kardamom mit 10^4 *B. cereus*/g eine Anzahl präsumtiver *B. cereus* von 10^2 KbE/g detektiert (Banerjee und Sarkar, 2004).

Der Anstieg der aeroben Gesamtkeimzahl ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass eine Marinierung und / oder Kühlagerung nicht immer einen negativen Effekt auf das Überleben bzw. Vermehrungsverhalten von Mikroorganismen ausübt (Bjorkroth, 2005). Hingegen sind die nahezu unveränderten *B. cereus* -Gehalte in frischen und längere Zeit aufbewahrten Produkten, möglicherweise dadurch zu erklären, dass der pH-Wert von Marinaden zumeist unter dem Wert 4,5 und somit unterhalb der pH-Optima für eine Vermehrung der meisten Erreger, wie z.B. *B. cereus* (4,4 bis 4,9) liegt. Allerdings wird aufgrund des hohen Pufferungsvermögens des Fleisches, der pH-Wert im Fleischprodukt nicht merklich abgesenkt (Bjorkroth, 2005), was wiederum als eine Erklärung für den Anstieg der Gesamtkeimzahl angesehen werden kann. Bei *B. cereus* spielt dieser Aspekt keine Rolle, da es sich hier um einen Oberflächenkeim handelt. Eine hygienische Gewinnung und Verarbeitung der Gewürze sowie eine einwandfreie Herstellung der damit gewürzten Lebensmittel sind daher für einen hohen Verbraucherschutz von essentieller Bedeutung.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in dieser Übersichtsarbeit zum Vorkommen von *B. cereus* in Gewürzen sowie deren mikrobiologische Gesamtbelastung, die untersuchten Produkte eine gute mikrobiologische Qualität aufwiesen. So waren nahezu alle der Gewürzproben (n=60) als mikrobiologisch unbedenklich einzustufen.

Um einen hohen Qualitätsstandard fortwährend gewährleisten zu können, bedarf es jedoch einer ständigen Überprüfung der Werte in einem amtlichen Programm der Lebensmittelüberwachung. Die hierfür nach §64 LFGB anzuwendenden kulturellen Verfahren sind, was den *B. cereus*-Nachweis betrifft, zeitaufwendig. Zudem weisen sie bei einer hohen Begleitflora eine verminderte Spezifität auf, was die Notwendigkeit neuer Nachweisverfahren eingehend unterstreicht. Vor diesem Hintergrund wurde für die Identifizierung auch kleinster *B. cereus* Mengen ein Real-Time PCR-Assay als Alternative zum konventionellen MPN-Verfahren etabliert. Dieser erlaubt im Gegensatz zur MPN-Methode einen schnellen und zuverlässigen Erregernachweis, der keiner weiteren biochemischen oder molekularbiologischen Speziesbestätigung mehr bedarf. Über konventionelle Methoden lässt sich zudem nur der Status quo von *B. cereus* in Gewürzen charakterisieren, nicht jedoch das toxikologische Profil. Dies ist jedoch unbedingt erforderlich, da mittels molekularbiologischer und immunochemischer Methoden sowie im Zellkulturtest 81% der Isolate (n=151), die aus den Gewürzen gewonnen wurden als Toxinbildner identifiziert wurden.

Zudem wurde gezeigt, dass eine *B. cereus* Kontamination von Lebensmitteln durchaus aus der Verwendung damit hergestellter, belasteter Gewürze resultieren kann. Jedoch ist das Risiko für den Verbraucher hinsichtlich einer Lebensmittelvergiftung durch kontaminierte Gewürze als gering einzustufen. Zwar wurde *B. cereus* in 70 % der untersuchten Proben (n= 60) detektiert, allerdings in Keimzahlen, die nach derzeitigem Stand der Wissenschaft keine Lebensmittelvergiftung auslösen können. Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass zwischen 10^5 und 10^6 Toxinbildner pro Gramm Lebensmittel aufgenommen werden müssen um das diarrhoeische oder emetische Syndrom auszulösen (Granum, 2001). Dennoch ist das Gesundheitsrisiko, das von toxinbildenden *B. cereus* ausgeht nicht zu unterschätzen, da z. B. die emetische Krankheitsform auch in Verbindung mit Lebensmitteln festgestellt wurde, die nur 10^3 KbE/ g enthielten. Zudem genügt schon die Aufnahme geringerer Toxinmengen (8 µg/kg) um Vomitus und Nausea auszulösen (Jaaskelainen et al., 2003b).

Das Vorkommen von *B. cereus* in Gewürzen ist somit unter den Gesichtspunkten eines vorbeugenden Verbraucherschutzes und der Qualitätssicherung zu betrachten, nicht zuletzt da es auch angesichts eines stetig wachsenden Welthandels im Zuge der Globalisierung immer dringlicher wird eine mikrobiologisch unbedenkliche Ware zu

gewährleisten. Letztendlich unterstreicht diese Arbeit somit die Aufforderung der Europäischen Kommission, die bakteriologische und toxikologische Sicherheit von Gewürzen zu bewerten und Daten zum Vorkommen pathogener Mikroorganismen wie *B. cereus* in Gewürzen zu erheben, um ein hohes Verbraucherschutzniveau gewährleisten zu können (Europäische Kommission, 2004). Weitere Untersuchungen mit größeren Probenzahlen sind für eine bessere Risikoabschätzung unumgänglich. Mit dem Real-Time PCR Assay steht hierfür eine schnelle und zuverlässige Methode zur Verfügung, die einen Erregernachweis direkt aus Gewürzproben erlaubt.

6. Zusammenfassung

B. cereus zählt zu den wichtigsten Verursachern von Qualitätsminderung und Verderb bei Lebensmitteln. Daneben wächst die Bedeutung Toxin-bildender *B. cereus* Stämme als Auslöser Lebensmittel-bedingter Erkrankungen, die zwei Formen einer gastrointestintinalen Erkrankung hervorrufen können: das diarrhoeische Syndrom, welches durch verschiedene Enterotoxinkomplexe (HBL, Nhe) induziert wird, und das emetische Syndrom, welches durch ein Dodekadepsipetid (Cereulid) ausgelöst wird.

In komplexen Lebensmitteln werden vielfach Gewürze als Vektor für *B. cereus* - Kontaminationen angesehen. Jedoch sind kaum Studien über Gewürze als mögliche Eintragsquelle für *B. cereus* in Lebensmittel publiziert. Auch liegen nur wenig aktuelle Daten aus dem europäischen Raum über die tatsächliche Belastung von Gewürzen mit diesem Erreger vor.

Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen und die Toxizität von *B. cereus* in Gewürzen analysieren, um eine aktuelle Übersicht über die Kontamination mit diesem Erreger für eine Bewertung der mikrobiologischen Sicherheit von Gewürzen zu gewinnen.

Hierfür wurden insgesamt 60 Gewürzproben zwölf verschiedener Gewürzsorten untersucht. Zunächst wurde mittels kultureller Verfahren die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl sowie die Belastung mit *Enterobacteriaceae* und präsumtiven *B. cereus* bestimmt. Um auch kleinste Mengen des Erregers sicher nachweisen zu können, wurde zudem ein Real-Time PCR Assay als Alternative zur zeitaufwendigen und diagnostisch ungenauen konventionellen MPN- Methode erarbeitet. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden 151 präsumtive Kolonien, die aus den untersuchten Gewürzproben (n=60) isoliert wurden, mittels biochemischer und molekularbiologischer Analyse als *B. cereus* bestätigt. Anschließend wurde die Toxigenität und Toxizität der Isolate mittels PCR, immunchemischer Nachweisverfahren (ELISA, RPLA) sowie im Zellkulturtest charakterisiert. Darüberhinaus wurde im Challenge-Test mit marinierten Fleischerzeugnissen untersucht, inwieweit eine Kontamination von Lebensmitteln mit *B. cereus* tatsächlich aus der Verwendung kontaminierter Gewürze resultiert.

Nach mikrobiologischer Analyse der Gewürzprodukte (n=60), waren nahezu alle der Proben als mikrobiologisch unbedenklich einzustufen. Kein Produkt hat den von der DGHM und der Europäischen Kommission empfohlenen Richtwert für *B. cereus* in Gewürzen von 10^3 KbE/g überschritten. Mit dem Real-Time PCR-Assay wurde zudem eine zuverlässige Alternative zum konventionellen MPN - Verfahren erarbeitet, der es ermöglichte auch kleinste *B. cereus* Mengen nach selektiver Anreicherung in den Gewürzproben zu identifizieren. Dies ist insbesondere im Hinblick auf das gesundheitsgefährdende Potential pathogener *B. cereus* von Bedeutung. So wurden 81% der Isolate (n=151), die aus den Gewürzen gewonnen wurden als diarrhöische und/oder emetische Toxinbildner identifiziert.

Zudem wurde gezeigt, dass eine *B. cereus* Kontamination von Lebensmitteln durchaus aus der Verwendung damit hergestellter, belasteter Gewürze resultieren kann. Jedoch ist das Risiko für den Verbraucher hinsichtlich einer Lebensmittelvergiftung durch kontaminierte Gewürze als gering einzustufen. Zwar wurde *B. cereus* in 70 % der insgesamt 60 untersuchten Proben detektiert, allerdings in Keimzahlen, die nach derzeitigem Stand der Wissenschaft keine Lebensmittelvergiftung auslösen können. Dennoch ist das Gesundheitsrisiko, das von toxinbildenden *B. cereus* ausgeht nicht zu unterschätzen, da sie als Sporenbildner Erhitzungsprozesse von Lebensmitteln überleben, wieder auskeimen und sich vermehren können.

Das Vorkommen von *B. cereus* in Gewürzen ist somit unter den Gesichtspunkten eines vorbeugenden Verbraucherschutzes und der Qualitätssicherung zu betrachten, nicht zuletzt da es auch angesichts eines stetig wachsenden Welthandels im Zuge der Globalisierung immer dringlicher wird eine mikrobiologisch unbedenkliche Ware zu gewährleisten.

Letztendlich sind weitere Untersuchungen mit größeren Probenzahlen für eine bessere Risikoabschätzung unumgänglich. Mit dem Real-Time PCR Assay steht hierfür eine schnelle und zuverlässige Methode zur Verfügung, die einen Erregernachweis direkt aus Gewürzproben erlaubt.

7. Summary

B. cereus is considered as one of the most important origins of reduction in food-quality and food –spoilage. Increasingly, toxin-forming strains are recognized as the causative agent of two forms of gastrointestinal diseases connected to food poisoning: the diarrhoeal syndrome, induced by distinct enterotoxin-complexes (HBL, Nhe), and the emetic syndrome, caused by a dodecadepsipeptide (cereulide).

In complex foods spices often are regarded as vectors for *B. cereus*–contaminations. However, studies about spices as a potential entry source for this pathogen in foods are little published. Also, only few current data from Europe on the prevalence of *B. cereus* in spices are available.

The aim of the present work was to analyse the occurrence and toxicity of *B. cereus* in spices to gain a current overview of the contamination level with regard to assess the bacteriological safety of spices.

Therefore, a total of 60 samples of twelve different kinds of spices were investigated. At first, the count of total aerobic mesophilic bacteria, *Enterobacteriaceae* and presumptive *B. cereus* were determined by conventional culture methods. Moreover, for reliable detection of also least counts of *B. cereus*, a Real-Time PCR assay was developed as an alternative method to the time-consuming and diagnostic-imprecise conventional MPN-technique.

In the further course of this work, 151 presumptive colonies, isolated from the examined spices samples (n=60) were confirmed by biochemical and biomolecular analyses. Their toxigenicity and toxicity were subsequently characterised by PCR, immunochemical (ELISA, RPLA) and cell biological tests.

At least, challenge tests with marinated meat products were performed to investigate whether contaminations of food with *B. cereus* are a consequence of using contaminated spices.

According to the results of the microbiological analyses of the spice samples (n=60), the microbiological safety of nearly all tested products were satisfactory. None of the products exceeded the standard value of 10^3 CfU/g, which is recommended by the DGHM and the European Commission. By development of the Real-Time PCR assay as a reliable alternative to the conventional MPN technique, also least counts of *B.*

cereus were identified in the spice samples after enrichment. This is of particular importance with regard to the potential health risk of *B. cereus*, as 81 % of the isolates, obtained from the tested spices, were identified as diarrhoeal or/und emetic toxinformers.

Furthermore it was shown, that a *B. cereus* contamination of foods can be necessarily a result of the addition of contaminated spices. But the consumer risk of food-poisoning in conjunction with spices is to be classified as small. Though *B. cereus* was detected in 70 % of the 60 spice samples, the pathogen did not reach microbial counts, which are assumed to provoke illness. However, the health risk of toxinforming *B. cereus* is not to be underestimated because as sporeformers they are able to survive cooking und pasteurization und then germinate und multiply.

Hence, the occurrence of *B. cereus* in spices is to be considered with respect to a preventive consumer protection und quality assurance, not least due to the increasing global trade, which requires microbiological satisfactory goods.

Eventually, further analyses with a higher amount of samples are indispensable for a better risk assessment. For this purpose the Real-Time PCR assay provides a fast und reliable method to detect the pathogen directly in spice products.

8. Literaturverzeichnis

- Agata, N., M. Mori, M. Ohta, S. Suwan, I. Ohtani, und M. Isobe. 1994. A Novel Dodecadepsipeptide, Cereulide, Isolated from *Bacillus-Cereus* Causes Vacuole Formation in Hep-2 Cells. *Fems Microbiology Letters* 121:31-34.
- Agata, N., M. Ohta, Y. Arakawa, und M. Mori. 1995a. The *Bcet* Gene of *Bacillus-Cereus* Encodes An Enterotoxic Protein. *Microbiology-Uk* 141:983-988.
- Agata, N., M. Ohta, M. Mori, und M. Isobe. 1995b. A Novel Dodecadepsipeptide, Cereulide, Is An Emetic Toxin of *Bacillus-Cereus*. *Fems Microbiology Letters* 129:17-19.
- Agata, N., M. Ohta, und M. Mori. 1996. Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. *Current Microbiology*. 33:67-69.
- Agata, N., M. Ohta, und K. Yokoyama. 2002. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *International Journal of Food Microbiology* 73:23-27.
- Ajuwape, A. T. P., A. A. Roberts, O. O. Solarin, und A. I. Adetosoye. 2005. Bacteriological and haematological studies of clinical mastitis in goats in Ibadan, OYO State, Nigeria. *Small Ruminant Research* 60:307-310.
- Andersson, M. A., E. L. Jaaskelainen, R. Shaheen, T. Pirhonen, L. M. Wijnands, und M. S. Salkinoja-Salonen. 2004. Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments *International Journal of Food Microbiology* 94:175-183.
- Andersson, M. A., R. Mikkola, J. Helin, M. C. Andersson, und M. Salkinoja-Salonen. 1998. A novel sensitive bioassay for detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores. *Applied and Environmental Microbiology* 64:1338-1343.
- Anonymus. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* - Colony count technique at 30 degrees C. ISO 7932:2004, TC 34/SC 9.
- Asano, S., Y. Nukumizu, H. Bando, T. Iizuka, und T. Yamamoto. 1997. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 63:1054-1057.
- Ash, C. und M. D. Collins. 1992. Comparative-Analysis of 23S-Ribosomal Rna Gene-Sequences of *Bacillus-Anthraxis* and Emetic *Bacillus-Cereus* Determined by Pcr-Direct Sequencing. *Fems Microbiology Letters* 94:75-80.
- Ash, C., J. A. E. Farrow, M. Dorsch, E. Stackebrandt, und M. D. Collins. 1991. Comparative-Analysis of *Bacillus-Anthraxis*, *Bacillus-Cereus*, and Related Species on the Basis of Reverse-Transcriptase Sequencing of 16S Ribosomal-Rna. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41:343-346.

- Banerjee, M. und P. K. Sarkar. 2003. Microbiological quality of some retail spices in India. *Food Research International* 36:469-474.
- Banerjee, M. und P. K. Sarkar. 2004. Growth and enterotoxin production by sporeforming bacterial pathogens from spices. *Food Control* 15:491-496.
- Battisti, Laurie, B. D. Green, und C. B. Thorne. 1985. Mating System for transfer of Plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology* 162(2): 543-550.
- Baumgart. 2004. Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Behr's Verlag, Hamburg.
- Baxter, R. und W. H. Holzapfel. 1982. A Microbial Investigation of Selected Spices, Herbs, and Additives in South-Africa. *Journal of Food Science* 47:570-&.
- Beattie, S. H. und A. G. Williams. 1999. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Letters in Applied Microbiology*. 28:221-225.
- Beecher, D. J. und J. D. Macmillan. 1990. A Novel Bicomponent Hemolysin from *Bacillus-Cereus*. *Infection and Immunity* 58:2220-2227.
- Beecher, D. J. und J. D. Macmillan. 1991. Characterization of the Components of Hemolysin-BI from *Bacillus-Cereus*. *Infection and Immunity* 59:1778-1784.
- Beecher, D. J., T. W. Olsen, E. B. Somers, und A. C. L. Wong. 2000. Evidence for contribution of tripartite hemolysin BL, phosphatidylcholine-preferring phospholipase C, and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis. *Infection and Immunity* 68:5269-5276.
- Beecher, D. J., J. L. Schoeni, und A. C. L. Wong. 1995. Enterotoxic Activity of Hemolysin BI from *Bacillus-Cereus*. *Infection and Immunity* 63:4423-4428.
- Beecher, D. J. und A. C. L. Wong. 1994a. Identification and Analysis of the Antigens Detected by two Commercial *Bacillus-Cereus* Diarrheal Enterotoxin Immunoassay Kits. *Applied and Environmental Microbiology* 60:4614-4616.
- Beecher, D. J. und A. C. L. Wong. 1994b. Improved Purification and Characterization of Hemolysin BI, A Hemolytic Dermonecrotic Vascular-Permeability Factor from *Bacillus-Cereus*. *Infection and Immunity* 62:980-986.
- Beecher, D. J. und A. C. L. Wong. 1997. Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus* - Hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. *Journal of Biological Chemistry* 272:233-239.
- Beutling, D. und C. Bottcher. 1998. *Bacillus cereus* - a risk factor in foods. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 49:90-96.

- Beyer, W., C. Bartling, und H. Neubauer. 2004. Methods for the identification of *Bacillus anthracis* in clinical and environmental samples. *Tierärztliche Umschau* 58:653-662.
- Bhat, R., H. Geeta, und P. R. Kulkarni. 1987. Microbial Profile of Cumin Seeds and Chili-Powder Sold in Retail Shops in the City-Of-Bombay. *Journal of Food Protection* 50:418-&.
- Bjorkroth, J. 2005. Microbiological ecology of marinated meat products. *Meat Science* 70:477-480.
- Buckenhuskes, H. J. und M. Rendlen. 2004. Hygienic problems of phytogetic raw materials for food production with special emphasis to herbs and spices. *Food Science and Biotechnology* 13:262-268.
- Bulla, L. A., Jr., D. B. Bechtel, K. J. Kramer, Y. I. Shethna, A. I. Aronson, und P. C. Fitz-James. 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *Critical Reviews in Microbiology*. 8:147-204.
- Burgess, G. W. und P. F. Horwood. 2006. An Improved HEp2-cell Cytoxicity assay for the detetction of Emetic Strains of *Bacillus cereus*. Development of Improved Molecular Detection Methods for *Bacillus cereus* Toxins. Australian Government / RIRDC; Barton, Australia.
- Buttke, T. M., J. A. Mccubrey, und T. C. Owen. 1993. Use of An Aqueous Soluble Tetrazolium Formazan Assay to Measure Viability and Proliferation of Lymphokine-Dependent Cell-Lines. *Journal of Immunological Methods* 157:233-240.
- Cerneia, C., V. Miclaus, N. Fit, V. Cozma, und C. Gherman. 2002. Sarcoptic mange in calves: bacteriological and histopathological studies. *Revista Scientia Parasitologica* 3.
- Chastain, C. B. und D.L. Harris. 1974. Association of *Bacillus cereus* with food poisoning in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 164: 489-499.
- Choma, C. und P. E. Granum. 2002. The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. *Fems Microbiology Letters* 217:115-119.
- Choma, C., M. H. Guinebretiere, F. Carlin, P. Schmitt, P. Velge, P. E. Granum, und C. Nguyen-The. 2000. Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *Journal of Applied Microbiology* 88:617-625.
- Choo, E., S. S. Jang, K. Kim, K. G. Lee, S. Heu, und S. Ryu. 2007. Prevalence and genetic diversity of *Bacillus cereus* in dried red pepper in Korea. *Journal of Food Protection* 70:917-922.
- Coretti, K. 1955. Der Keimgehalt von Gewürzen. *Fleischwirtschaft* 7:305-308.

- Daffonchio, D., S. Borin, G. Frova, R. Gallo, E. Mori, R. Fani, und C. Sorlini. 1999. A randomly amplified polymorphic DNA marker specific for the *Bacillus cereus* group is diagnostic for *Bacillus anthracis*. *Applied and Environmental Microbiology* 65:1298-1303.
- De Boer, E., W. M. Spiegelberg, und F. W. Janssen. 1985. *Microbiology of Spices and Herbs*. *Antonie van Leeuwenhoek* 51:435-438.
- Deutsches Lebensmittelbuch. 1998. *Leitsätze für Gewürze und andere würzende Zutaten*.
- DGHM. 2007. *Veröffentlichte mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln - Stand Mai 2007*.
- Dierick, K., E. Van Coillie, I. Swiecicka, G. Meyfroidt, H. Devlieger, A. Meulemans, G. Hoedemaekers, L. Fourie, M. Heyndrickx, und J. Mahillon. 2005. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus* - associated food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology* 43:4277-4279.
- Dietrich, R., C. Fella, S. Strich, und E. Martlbauer. 1999. Production and characterization of monoclonal antibodies against the hemolysin BL enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65:4470-4474.
- Dietrich, R., K. Mauersberger, und E. Martlbauer. 1997. Use of the MTT test for the detection of *B.-cereus* enterotoxin. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 48:77-81.
- Dietrich, R., M. Moravek, C. Burk, P. E. Granum, und E. Martlbauer. 2005. Production and characterization of antibodies against each of the three subunits of the *Bacillus cereus* nonhemolytic enterotoxin complex. *Applied and Environmental Microbiology* 71:8214-8220.
- Drobniowski, F. A. 1993. *Bacillus-Cereus and Related Species*. *Clinical Microbiology Reviews* 6:324-338.
- Duc, L., T. Dong, N. Logan, A. Sutherland, J. Taylor, und S. Cutting. 2005. Cases of emesis associated with bacterial contamination of an infant breakfast cereal product. *International Journal of Food Microbiology* 102.
- D'Aoust, J.-Y. 1994. Salmonella and the international food trade. *International Journal of Food Microbiology* 24:11-31.
- EFSA. 2004. Opinion on the Scientific panel on Biological hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs. *The EFSA Journal* 175:1-49.
- Ehling-Schulz, M., M. Fricker, und S. Scherer. 2004a. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Molecular Nutrition & Food Research* 48:479-487.
- Ehling-Schulz, M., M. Fricker, und S. Scherer. 2004b. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *Fems Microbiology Letters* 232:189-195.

- Ehling-Schulz, M., B. Svensson, M. H. Guinebretiere, T. Lindback, M. Andersson, A. Schulz, M. Fricker, A. Christiansson, P. E. Granum, E. Martlbauer, C. Nguyen-The, M. Salkinoja-Salonen, und S. Scherer. 2005. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology-Sgm* 151:183-197.
- Erol, I., O. Kuplulu, und S. Karagoz. 1999. Microbiological quality of some spices consumed in Ankara. *Veteriner Fakultesi Dergisi, Ankara Universitesi* 46.
- Europäische Kommission. 2004. Empfehlung der Kommission für ein amtliches Programm zur Lebensmittelüberwachung für 2004. *Amtsblatt der Europäischen Union* L6/29.
- Fabio, A., A. Corona, E. Forte, und P. Quaglio. 2003. Inhibitory activity of spices and essential oils on psychrotrophic bacteria. *Microbiologica* 26:115-120.
- Fachverband der Gewürzindustrie. 2007. Die Gewürze und ihre industrielle Veredelung. www.gewürzindustrie.de.
- Faille, C., F. Fontaine, und T. Benezech. 2001. Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. *Journal of Applied Microbiology* 90:892-900.
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations statistics). 2005. *Statistical Yearbook 2004*.
- Farkas, J. 2006. Irradiation for better foods. *Trends in Food Science & Technology* 17:148-152.
- Felgentreff, U. und K. H. Otto. 2005. Bio-Kräuter, -Gewürze, -Aromaextrakte. Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft.
- Finlay, W. J. J., N. A. Logan, und A. D. Sutherland. 1999. Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 65:1811-1812.
- Francis, K. P., R. Mayr, F. von Stetten, G. S. A. B. Stewart, und S. Scherer. 1998. Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3525-3529.
- Fricker, M., U. Messelhauser, U. Busch, S. Scherer, und M. Ehling-Schulz. 2007a. Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology* 73.
- Fricker, M., R. Reissbrodt, und M. Ehling-Schulz. 2007b. Evaluation of standard und new chromogenic selective plating media for isolation and identification of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*. In Press, Corrected Proof.

- Frohlich, T. 1991. Treatment of *Bacillus-Cereus* Dermatitis in Horses. Tierärztliche Umschau 46:390-&.
- Fuselli, S., B. Filsinger, R. Fritz, and M. Yeannes, I. 2004. Microbiological study of garlic (*Allium sativum* L.) and onion (*Allium cepa* L.) dehydrated. Revista Argentina de Microbiologia 36.
- Gadir, A. E. A., G. Hildebrandt, J. Kleer, B. Molla, M. Kyule, and M. Baumann. 2005. Prevalence and risk factors of camel (*Camelus dromedarius*) mastitis based on bacteriological examinations in selected regions of Ethiopia. Journal of Camel Practice und Research 12:33-36.
- Gareis, M. und A. Walz. 1994. Vergiftungsfälle bei Rottweilerwelpen durch Milchpulver, kontaminiert mit *B. cereus*. Tierärztliche Umschau 49. 319-322.
- Gerhardt, U. 1994. Gewürze in der Lebensmittelindustrie. 2 ed. Behr, Hamburg.
- Giaccone, V., G. Colavita, S. Torriani, R. M. Ciocca, und R. Augelli. 1996. Occurrence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in spices. Archiv für Lebensmittelhygiene 47:47-49.
- Giffel, M., R. Beumer, S. Leijendekkers, und F. Rombouts. 1996. Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands. Food Microbiology 13.
- Giffel, M., R. Beumer, B. Slaghuis, und F. Rombouts. 1995. Occurrence and characterization of (psychrotrophic) *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands. Netherlands Milk and Dairy Journal 49.
- Giffel, M. C. T., R. R. Beumer, P. E. Granum, und F. M. Rombouts. 1997. Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in the Netherlands. International Journal of Food Microbiology 34:307-318.
- Glatz, B. A. und J. M. Goepfert. 1973. Extracellular Factor Synthesized by *Bacillus-Cereus* Which Evokes A Dermal Reaction in Guinea-Pigs. Infection and Immunity 8:25-29.
- Glatz, B. A., W. M. Spira, und J. M. Goepfert. 1974. Alteration of Vascular-Permeability in Rabbits by Culture Filtrates of *Bacillus-Cereus* and Related Species. Infection und Immunity 10:229-303.
- Gonzales, J. M., Jr., W. C. Dulmage, und B. C. Carlton. 1981. Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. Plasmid 5:351-365.
- Goodwin, C. J., S. J. Holt, S. Downes, und N. J. Marshall. 1995. Microculture Tetrazolium Assays - A Comparison Between 2 New Tetrazolium Salts, Xtt and Mts. Journal of Immunological Methods 179:95-103.
- Granum, P. E. 1997. *Bacillus cereus*. Food microbiology: fundamentals and frontiers. M. P. Doyle, ed. ASM Press, Washington D. C.

- Granum, P. E. 2001. *Bacillus cereus*. Food microbiology: fundamentals and frontiers. M. P. Doyle, ed. ASM Press, Washington D. C.
- Granum, P. E., A. Andersson, C. Gayther, M. T. Giffel, H. Larsen, T. Lund, und K. OSullivan. 1996. Evidence for a further enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. Fems Microbiology Letters 141:145-149.
- Granum, P. E. und T. Lund. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. Fems Microbiology Letters 157:223-228.
- Granum, P. E., K. O'Sullivan, und T. Lund. 1999. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cerceus*. Fems Microbiology Letters 177:225-229.
- Graubaum, D., J. Kleer, und G. Hildebrandt. 2005. The suitable relation between sample and buffered peptonwater for the pre-enrichment of Salmonella in spices. Fleischwirtschaft 85:105-109.
- Guinebretiere, M. H., O. Berge, P. Normand, C. Morris, F. Carlin, und C. Nguyen-The. 2001. Identification of bacteria in pasteurized zucchini purees stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purees. Applied and Environmental Microbiology 67:4520-4530.
- Guinebretiere, M. H., V. Broussolle, und C. Nguyen-The. 2002. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. Journal of Clinical Microbiology 40:3053-3056.
- Guinebretiere, M. H. und C. Nguyen-The. 2003. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing line, differentiated by two PCR-based methods. Fems Microbiology Ecology 43:207-215.
- Gupta, R. S. 1995. Evolution of the Chaperonin Families (Hsp60, Hsp10 und Tcp-1) of Proteins and the Origin of Eukaryotic Cells. Molecular Microbiology 15:1-11.
- Hansen, B. M. und N. B. Hendriksen. 2001. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. Applied and Environmental Microbiology 67:185-189.
- Hansen, B. M., P. E. Hoiby, G. B. Jensen, und N. B. Hendriksen. 2003. The *Bacillus cereus* bceT enterotoxin sequence reappraised. Fems Microbiology Letters 223:21-24.
- Hara-Kudo, Y., K. Ohtsuka, Y. Onoue, Y. Otomo, I. Furukawa, A. Yamaji, Y. Segawa, und K. Takatori. 2006. Salmonella prevalence and total microbial und spore populations in spices imported to Japan. Journal of Food Protection 69:2519-2523.
- Heinrichs, J. H., D. J. Beecher, J. D. Macmillan, und B. A. Zilinskas. 1993b. Molecular-Cloning and Characterization of the Hbla Gene Encoding the B-Component of Hemolysin BI from *Bacillus-Cereus*. Journal of Bacteriology 175:6760-6766.

- Helgason, E., D. A. Caugant, I. Olsen, und A. B. Kolsto. 2000. Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. *Journal of Clinical Microbiology* 38:1615-1622.
- Heyndrickx, M. und P. Scheldeman. 2002. Bacilli associated with spoilage in dairy and other food products. Page 64 in *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*. R. H. M. L. N. a. D. V. P. Berkeley, ed. Blackwell Science, Oxford.
- Hughes, S., B. Bartholomew, J. C. Hardy, und J. M. Kramer. 1988. Potential Application of A Hep-2 Cell Assay in the Investigation of *Bacillus-Cereus* Emetic-Syndrome Food Poisoning. *Fems Microbiology Letters* 52:7-11.
- Hussain, S., M. Willayat, F. Peer, und R. Rafia. 2006. Antibigram and microbiological studies of clinical mastitis. *Indian Journal of Veterinary Medicine* 26.
- ICMSF. 2005. *Microorganisms in Food 6: Microbial Ecology of Food Commodities*. 2 ed. Chapman & Hall.
- in't Veld, P. H., W. S. Ritmeester, E. H. M. fgou-van Asch, J. B. Dufrenne, K. Wernars, E. Smit, und F. M. van Leusden. 2001. Detection of genes encoding for enterotoxins and determination of the production of enterotoxins by HBL blood plates and immunoassays of psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* isolated from pasteurised milk. *International Journal of Food Microbiology* 64:63-70.
- Jaaskelainen, E. L., M. M. Haggblom, M. A. Andersson, L. Vanne, und M. S. Salkinoja-Salonen. 2003a. Potential of *Bacillus cereus* for producing an emetic toxin, cereulide, in bakery products: Quantitative analysis by chemical and biological methods. *Journal of Food Protection* 66:1047-1054.
- Jaaskelainen, E. L., V. Teplova, M. A. Andersson, L. C. Andersson, P. Tammela, M. C. Andersson, T. I. Pirhonen, N. E. L. Saris, P. Vuorela, und M. S. Salkinoja-Salonen. 2003b. In vitro assay for human toxicity of cereulide, the emetic mitochondrial toxin produced by food poisoning *Bacillus cereus*. *Toxicology in Vitro* 17:737-744.
- Julseth, R. M. und R. H. Deibel. 1974. Microbial Profile of Selected Spices and Herbs at Import. *Journal of Milk and Food Technology* 37:414-419.
- Juri, M. L., H. Ito, H. Watanabe, und N. Tamura. 1986. Distribution of Microorganisms in Spices and Their Decontamination by Gamma-Irradiation. *Agricultural and Biological Chemistry* 50:347-355.
- Kaferstein, F. K. 1976. Microflora of Parsley. *Journal of Milk and Food Technology* 39:837-840.
- Kaul, M. und N. Taneja. 1989. A note on the microbial quality of selected spices. *Journal of Food Science Technology* 26:169-170.

- Kim, Y. R., J. Czajka, und C. A. Batt. 2000. Development of a fluorogenic probe-based PCR assay for detection of *Bacillus cereus* in nonfat dry milk. *Applied and Environmental Microbiology* 66:1453-1459.
- Kirkbride, C. A., J. E. Collins, und C. E. Gates. 1986. Porcine Abortion Caused by *Bacillus* Sp. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 188:1060-1061.
- Kneifel, W. und E. Berger. 1994. Microbiological Criteria of Random Samples of Spices and Herbs Retailed on the Austrian Market. *Journal of Food Protection* 57:893-901.
- Krämer, J. 2002. *Lebensmittelmikrobiologie*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Kramer, J. M. und R. J. Gilbert. 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *Foodborne bacterial pathogens*. M. P. Doyle, ed. Marcel Dekker Inc.; New York; USA.
- Krause, N., R. Dietrich, M. Becker, M. Moravek, E. Märtlbauer, und J. Slaghuis. 2006. Evaluierung des Duopath-Systems zum Nachweis von *Bacillus cereus* Enterotoxinen. Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle Sonderausgabe.
- Kreuzberger, Ch. 2007. Charakterisierung der Toxizität von *Bacillus cereus*-Isolaten aus Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Kuo, W. S. und K. F. Chak. 1996. Identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 62:1369-1377.
- Laurent, Y., S. Arino, und L. Rosso. 1999. A quantitative approach for studying the effect of heat treatment conditions on resistance and recovery of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology* 48:149-157.
- Lechner, S., R. Mayr, K. P. Francis, B. M. Pruss, T. Kaplan, E. Wiessner-Gunkel, G. S. A. B. Stewart, und S. Scherer. 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:1373-1382.
- Lee, S. Y., H. J. Chung, J. H. Shin, R. H. Dougherty, und D. H. Kang. 2006. Survival and growth of foodborne pathogens during cooking and storage of oriental-style rice cakes. *Journal of Food Protection* 69:3037-3042.
- Leistritz, W. 1997. Methods of bacterial reduction in spices. *Spices* 660:7-10.
- Lindback, T., A. Fagerlund, M. S. Rodland, und P. E. Granum. 2004. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology-Sgm* 150:3959-3967.

- Little, C. L., R. Omotoye, und R. T. Mitchell. 2003. The microbiological quality of ready-to-eat foods with added spices. *International Journal of Environmental Health Research* 13:31-42.
- Lund, T., M. L. De Buyser, und P. E. Granum. 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology* 38:254-261.
- Lund, T. und P. E. Granum. 1996. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *Fems Microbiology Letters* 141:151-156.
- Lund, T. und P. E. Granum. 1997. Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology-Uk* 143:3329-3336.
- Mahler, H., A. Pasi, J. M. Kramer, P. Schulte, A. C. Scoging, W. Bar, und S. Krahenbuhl. 1997. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *New England Journal of Medicine* 336:1142-1148.
- Makino, S., Y. Iinumaokada, T. Maruyama, T. Ezaki, C. Sasakawa, und M. Yoshikawa. 1993. Direct Detection of *Bacillus-Anthraxis* Dna in Animals by Polymerase Chain-Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 31:547-551.
- Malmsten, T., K. Paakkonen, und L. Hyvonen. 1991. Packaging and Storage Effects on Microbiological Quality of Dried Herbs. *Journal of Food Science* 56:873-875.
- Mantynen, V. und K. Lindstrom. 1998. A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 64:1634-1639.
- Mckee, L. H. 1995. Microbial-Contamination of Spices and Herbs - A Review. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 28:1-11.
- Melling, J., B. J. Capel, P. C. B. Turnbull, und R. J. Gilbert. 1976. Identification of A Novel Enterotoxigenic Activity Associated with *Bacillus-Cereus*. *Journal of Clinical Pathology* 29:938-940.
- Menestrina, G., M. la Serra, und G. Prevost. 2001. Mode of action of beta-barrel pore-forming toxins of the staphylococcal alpha-hemolysin family. *Toxicon* 39:1661-1672.
- Mikkola, R., N. E. L. Saris, P. A. Grigoriev, M. A. Andersson, und M. S. Salkinoja-Salonen. 1999. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide - The emetic toxin of *B. cereus*. *European Journal of Biochemistry* 263:112-117.
- Montville, T. J. und K. R. Matthews. 2005. Spores and their significance. *Food Microbiology*. ASM Press, Washington DC, USA.
- Moravek, M., R. Dietrich, C. Buerk, V. Broussolle, M. H. Guinebretiere, P. E. Granum, C. Nguyen-The, und E. Martlbauer. 2006. Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. *Fems Microbiology Letters* 257:293-298.

- Moravek, M., M. Wegscheider, A. Schulz, R. Dietrich, C. Burk, und E. Martlbauer. 2004. Colony immunoblot assay for the detection of hemolysin BL enterotoxin producing *Bacillus cereus*. *Fems Microbiology Letters* 238:107-113.
- Nakamura, L. K. 1998. *Bacillus pseudomycoides* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:1031-1035.
- Netten, P., A. Moosdijk, P. Hoensel, D. Mossel, und I. Perales. 1990. Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *Journal of Applied Bacteriology* 69.
- Nishikawa, Y., J. M. Kramer, M. Hanaoka, und A. Yasukawa. 1996. Evaluation of serotyping, biotyping, plasmid banding pattern analysis, und HEp-2 vacuolation factor assay in the epidemiological investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. *International Journal of Food Microbiology* 31:149-159.
- Notermans, S. und C. A. Batt. 1998. A risk assessment approach for foodborne *Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Microbiology* 84:51S-61S.
- Oxoid. 1993. Handbuch der Oxoid Erzeugnisse für mikrobiologische Zwecke. Eigenverlag Oxoid, Wesel, Deutschland.
- Park, S. H., H. J. Kim, J. H. Kim, T. W. Kim, und H. Y. Kim. 2007. Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17:1177-1182.
- Pingle, M. R., K. Granger, P. Feinberg, R. Shatsky, B. Sterling, M. Rundell, E. Spitzer, D. Larone, L. Golightly, und F. Barany. 2007. Multiplexed identification of blood-borne bacterial pathogens by use of a novel 16S rRNA gene PCR-ligase detection reaction-capillary electrophoresis assay. *Journal of Clinical Microbiology* 45:1927-1935.
- Pruss, B. M., R. Dietrich, B. Nibler, E. Martlbauer, und S. Scherer. 1999. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology* 65:5436-5442.
- Purseglove, J. W., E. G. Brown, C. L. Green, und S. R. J. Robbins. 1981. *Spices*. Longman, London.
- Ranganatha, H. G., S. Zaki, und B. S. Keshavamurthy. 1981. *Bacillus-Cereus* As A Cause of Abortion in A Mare. *Current Science* 50:458.
- Reissbrodt, R. 2005. Chromogene und fluorogene Kulturmedien in der mikrobiologischen Diagnostik. *Der Mikrobiologe* 6:6-11.
- Reyes, J. E., J. M. Bastias, M. R. Gutierrez, und M. D. O. Rodriguez. 2007. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean school feeding program. *Food Microbiology* 24:1-6.
- Roenner, U., U. Husmark, und A. Henriksson. 1990. Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. *Journal of Applied Bacteriology* 69:550-556.

- Rosenberger, A. und H. Weber. 1993. Keimbelastung von Gewürzproben, mikrobiologischer Status im Hinblick auf Richt- und Warnwerte. *Fleischwirtschaft* 73:830-833.
- Rowan, N. J., G. Caldow, C. G. Gemmell, und I. S. Hunter. 2003. Production of diarrheal enterotoxins und other potential virulence factors by veterinary isolates of *Bacillus* species associated with nongastrointestinal infections. *Applied and Environmental Microbiology* 69:2372-2376.
- Roy, A., B. Moktan, und P. K. Sarkar. 2007. Characteristics of *Bacillus cereus* isolates from legume-based Indian fermented foods. *Food Control* 18:1555-1564.
- Ryan, P. A., J. D. Macmillan, und B. A. Zilinskas. 1997. Molecular cloning und characterization of the genes encoding the L(1) und L(2) components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* 179:2551-2556.
- Satchell F., V.R.Bruce, G.Allen, W.H.Andrews, und H.R.Gerber. 1982. Microbiological survey of selected imported spices und associated fetal pellets specimens. *J. Assoc. off. Anal. Chem.* 72:632-637.
- Schoeni, J. L. und A. C. L. Wong. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning und its toxins. *Journal of Food Protection* 68:636-648.
- Schrimpf, G. 2002. *Gentechnische Methoden*. 3 ed. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Schulten, S. M., P. H. In't Veld, N. J. D. Nagelkerke, S. Scotter, M. L. De Buyser, P. Rollier, und C. Lahellec. 2000. Evaluation of the ISO 7932 standard for the enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *International Journal of Food Microbiology* 57:53-61.
- Schulz, A. 2004. Zum Nachweis des emetischen Toxins von *Bacillus cereus*. Dissertation vet. med., Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Schweiggert, U., R. Carle, und A. Schieber. 2007. Conventional und alternative processes for spice production - a review. *Trends in Food Science & Technology* 18:260-268.
- Seidel, E., C. Pfisterer, S. Hormansdorfer, und J. Bauer. 1996. Detection of toxinogenic *Bacillus cereus*. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B-Infectious Diseases und Veterinary Public Health* 43:421-428.
- Seltow, P. 1994. Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. *Journal of Applied Bacteriology* 76:49-60.
- Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, und J. G. Holt. 1996. Systematic Bacteriology. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. J. P. Butler, ed. Williams & Wilkins, Baltimore, London, Los Angeles, Sydney.

- Spira, W. M. und J. M. Goepfert. 1972. *Bacillus-Cereus*-Induced Fluid Accumulation in Rabbit Ileal Loops. *Applied Microbiology* 24:341-&.
- Stenfors, L. P., R. Mayr, S. Scherer, und P. E. Granum. 2002. Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. *Fems Microbiology Letters* 215:47-51.
- Subbulakshmi, G. und M. Naik. 2002. Nutritive value and technology of spices: Current status and future perspectives. *Journal of Food Science and Technology-Mysore* 39:319-344.
- Taylor, A. J. und R. J. Gilbert. 1975. *Bacillus-Cereus* Food Poisoning - Provisional Serotyping Scheme. *Journal of Medical Microbiology* 8:543-550.
- Thangamani, R., R. Mattada, und R. Sankaran. 1975. Microbial contamination in spices. *Indian Food Packer* 29:11-13.
- Turnball, P. C. B. und J. M. Kramer. 1991. *Bacillus*. Page 296 in *Manual of clinical microbiology*. A. Balows, J. W. Hausler, Herrmann.K-L., H. D. Isenberg, und H. J. Shadomy, eds. American Society for Microbiology, Washinton D.C.
- Ulukulani, Z., E. Karadag, M. Elmali, und A. Gurbuz. 2005. Microbiological quality of some ground spices sold openly in the retail shops of Igdir. *Vetreiner bilimleri dergisi* 21:31-37.
- Valero, M., L. A. Hernandez-Herrero, und M. J. Giner. 2007. Survival, isolation and characterization of a psychrotrophic *Bacillus cereus* strain from a mayonnaise-based ready-to-eat vegetable salad. *Food Microbiology* 24:671-677.
- van Netten, P. und J. M. Kramer. 1992. Media for the detection and enumeration of *Bacillus cereus* in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 17:85-99.
- Wernery, U., M. Ali, und J. E. Cooper. 1996. *Bacillus cereus* abortion in a nine year old dromedary camel - A case report. *Journal of Camel Practice und Research* 3:153.
- Wijnands, L. M., J. B. Dufrenne, F. M. Rombouts, P. H. In't Veld, und F. M. Van Leusden. 2006. Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in The Netherlands. *Journal of Food Protection* 69:2587-2594.
- Wojcik-Stopczynska, B. und B. Jakubowska. 2005. Estimation of microbiological quality of spices delivered by various producers. *Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis, Scientia Alimentaria* 246:303-311.
- Yadava, R. 2004. *Bacillus cereus* from fried rice and chawmin. *Journal of Veterinary Public Health* 2.
- Yamada, S., E. Ohashi, N. Agata, und K. Venkateswaran. 1999. Cloning und nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:1483-1490.

Zschaler, R. 1979. Nachweis von Mikroorganismen, Untersuchungskriterien bei getrockneten sowie bei begasten Lebensmitteln. Ernährungswirtschaft, Lebensmitteltechnik. 61-65.

Gesetze und Verordnungen

EG-ÖKO-Verordnung; Verordnung (EWG) Nr. 2092/91 des Rates vom 24. Juni 1991 über den ökologischen Landbau und die entsprechende kennzeichnung der landwirtschaftlichen Erzeugnisse und Lebensmittel (ABl. Nr. L 198 vom 22.07.1991,); Stand April 2007

Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch – LFGB) in der Fassung der Bekanntmachung vom 26. April 2006 (BGBl. I S. 945)

Verordnung über die Behandlung von Lebensmitteln mit Elektronen, Gamma- und Röntgenstrahlen, Neutronen oder ultravioletten Strahlen (Lebensmittelbestrahlungsverordnung – LMBestrV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 31. Oktober 2006

Tab. 30a: Übersicht über die analysierten Gewürze.

Gewürzsorte	Bezeichnung / Handelsname	Labornummer	Herkunft	Erwerb
Basilikum	„Basilikum, gerebelt“	1	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Basilikum, gerebelt“	42	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Basilikum, gerebelt“	61	Ökologische Herstellung	Bioladen (Reformhaus)
	„Basilikum, gerupft“	62	Ökologische Herstellung	Bioladen
	„Basilikum, gerebelt“	41	Rohstoffproduktion	Gewürzwerk
Curry	„Curry, indian“	3	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Curry“	47	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Currypulver, indisch“	63	Ökologische Herstellung	Bioladen
	„Curry“	67	Ökologische Herstellung	Bioladen
	„Curry, indian“	33	Rohstoffproduktion	Gewürzwerk
Ingwer	„Ingwer, gemahlen“	8	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Ingwer, gemahlen“	19	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Ingwer, gemahlen“	36	Ökologische Herstellung	Gewürzwerk
	„Ingwer, gemahlen“	56	Ökologische Herstellung	Bioladen
	„Ingwer, gemahlen“	37	Rohstoffproduktion	Gewürzwerk

Tab. 30b: Übersicht über die analysierten Gewürze.

Gewürzsorte	Bezeichnung / Handelsname	Labornummer	Herkunft	Erwerb
Knoblauch	„Knoblauch, granuliert“	27	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Knoblauch, granuliert“	48	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Knoblauch, gemahlen“	25	Ökologische Herstellung	Gewürzwerk
	„Knoblauchpulver“	57	Ökologische Herstellung Rohstoffproduktion	Bioladen (Reformhaus) Gewürzwerk
Koriander	„Koriander, gemahlen“	44	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Koriander, gemahlen“	66	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Koriander, ganz“	58	Ökologische Herstellung	Bioladen (Reformhaus)
	„Koriander, gemahlen“	65	Ökologische Herstellung	Bioladen
	„Koriander, gemahlen“	35	Rohstoffproduktion	Gewürzwerk
Kümmel	„Kümmel, gemahlen“	9	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Kümmel, ganz“	50	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Kümmel, ganz“	59	Ökologische Herstellung	Bioladen (Reformhaus)
	„Kümmel“	64	Ökologische Herstellung	Bioladen
	„Kümmel, ganz“	22	Rohstoffproduktion	Gewürzwerk

Tab. 30c: Übersicht über die analysierten Gewürze.

Gewürzsorte	Bezeichnung / Handelsname	Labornummer	Herkunft	Erwerb
Majoran	„Majoran, gerebelt“	28	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Majoran, gerebelt“	49	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Majoran, gerebelt“	6	Ökologische Herstellung	Gewürzwerk
	„Majoran, gerebelt“	55	Ökologische Herstellung	Bioladen
	„Majoran, gerebelt“	40	Rohstoffproduktion	Gewürzwerk
Nelken	„Nelken, ganz“	18	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Nelken, gemahlen“	29	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Nelken, ganz“	60	Ökologische Herstellung	Bioladen (Reformhaus)
	„Nelken, gemahlen“	69	Ökologische Herstellung	Bioladen (Reformhaus)
	„Nelken, gemahlen“	21	Rohstoffproduktion	Gewürzwerk
Paprika	„Paprika, edelsüss“	10	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Paprika, edelsüss“	43	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Paprika, edelsüss“	11	Ökologische Herstellung	Gewürzwerk
	„Paprika“	12	Ökologische Herstellung	Gewürzwerk
	„Paprika, edelsüss“	23	Rohstoffproduktion	Gewürzwerk

Tab. 30d: Übersicht über die analysierten Gewürze.

Gewürzsorte	Bezeichnung / Handelsname	Labornummer	Herkunft	Erwerb
Pfeffer, schwarz	„Pfeffer, schwarz, gemahlen“	5	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Pfeffer, schwarz, gemahlen“	46	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Pfeffer, schwarz, gemahlen“	4	Ökologische Herstellung	Gewürzwerk
	„Pfeffer, schwarz, gemahlen“	53	Ökologische Herstellung	Bioladen
	„Pfeffer, schwarz, gemahlen“	39	Rohstoffproduktion	Gewürzwerk
Pfeffer, weiß	„Pfeffer, weiß, gemahlen“	2	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Pfeffer, weiß, gemahlen“	45	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Pfeffer, weiß, gemahlen“	13	Ökologische Herstellung	Gewürzwerk
	„Pfeffer, weiß, gemahlen“	52	Ökologische Herstellung	Bioladen
	„Pfeffer, weiß, gemahlen“	20	Rohstoffproduktion	Gewürzwerk
Rosmarin	„Rosmarin, geschnitten“	17	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Rosmarin, geschnitten“	51	Konventionelle Herstellung	Supermarkt
	„Rosmarin, geschnitten“	54	Ökologische Herstellung	Bioladen
	„Rosmarin, geschnitten“	68	Ökologische Herstellung	Bioladen (Reformhaus)
	„Rosmarin, geschnitten“	38	Rohstoffproduktion	Gewürzwerk

Tab. 31: Bezeichnungen der untersuchten marinierten Fleischzubereitungen.

Bezeichnung	Probennummer
Schweinenackensteak in Pfeffer-Knoblauch-Marinade	MF1
Biersteaks, mariniert mit Original Köstritzer Schwarzbier	MF2
Paprika-Nackensteaks, zart mariniert	MF3
Bauchscheiben vom Schwein, mariniert	MF4
Schweinelachssteaks in feiner Burgundermarinade	MF5
Halssteaks in Kräutermarinade	MF6
Marinierte Holzällerscheiben	MF7
Schweinenackensteaks Puszta	MF8
Halssteaks in Western-Marinade	MF9
Kräuternackensteaks, zart mariniert	MF10
Grillscheiben Knoblauch-Art	MF11
Grillscheiben Pfälzer-Art	MF12
Holzällerscheiben, gewürzt	MF13
Marinierte Schweinenackensteaks mit herzhafter Paprika-Marinade	MF14
Marinierte Schweinenackensteaks mit herzhafter Kräuter-Marinade	MF15
Saftige Schweinesteaks, mariniert	MF16
Kräutersteaks aus dem Schweinenacken	MF17
Minutensteaks „Paprika“	MF18
Licher Bier-Steaks mariniert	MF19
Schwenksteak aus dem Schweinenacken	MF20

Tab. 32: Aerobe Gesamtkeimzahl in Gewürzsorten (n= 12) unterschiedlicher Herstellungsweisen.

Gewürzsorte	Herkunft		
	Konventionelle Herstellung	Ökologische Herstellung	Rohstoffproduktion
	GKZ ^{a)} (Lab.No.) ^{b)}	GKZ ^{a)} (Lab.No.) ^{b)}	GKZ ^{a)} (Lab.No.) ^{b)}
Basilikum	3,8 x 10 ⁵ (1)	3,2 x 10 ⁵ (61)	6,1 x 10 ⁵ (41)
	2,7 x 10 ⁴ (42)	7,6 x 10 ⁴ (62)	
Curry	1,0 x 10 ⁶ (3)	2,9 x 10 ⁶ (63)	3,4 x 10 ⁴ (33)
	9,0 x 10 ⁵ (47)	8,0 x 10 ⁵ (67)	
Ingwer	7,0 x 10 ⁵ (8)	5,6 x 10 ⁴ (36)	9,6 x 10 ³ (37)
	6,5 x 10 ⁴ (19)	2,3 x 10 ⁷ (56)	
Knoblauch	5,6 x 10 ⁴ (27)	5,0 x 10 ⁵ (25)	5,0 x 10 ³ (30)
	4,2 x 10 ⁴ (48)	1,9 x 10 ³ (57)	
Koriander	3,0 x 10 ² (44)	2,6 x 10 ³ (58)	2,8 x 10 ⁴ (35)
	< 10 ¹ (66)	1,0 x 10 ⁴ (65)	
Kümmel	2,4 x 10 ⁴ (9)	3,1 x 10 ⁴ (59)	7,5 x 10 ³ (22)
	2,8 x 10 ³ (50)	2,6 x 10 ² (64)	
Majoran	1,8 x 10 ⁴ (28)	2,3 x 10 ⁶ (6)	2,1 x 10 ³ (40)
	1,4 x 10 ⁴ (49)	1,6 x 10 ⁶ (55)	
Nelken	5,0 x 10 ² (18)	2,7 x 10 ² (60)	1,3 x 10 ⁵ (21)
	1,0 x 10 ³ (29)	< 10 ¹ (69)	
Paprika	9,1 x 10 ⁵ (10)	7,7 x 10 ⁵ (11)	2,6 x 10 ⁵ (23)
	2,6 x 10 ⁶ (43)	1,2 x 10 ⁶ (12)	
Pfeffer, schwarz	6,4 x 10 ⁴ (5)	3,5 x 10 ⁵ (4)	3,9 x 10 ⁶ (39)
	2,5 x 10 ³ (46)	3,0 x 10 ⁶ (53)	
Pfeffer, weiß	3,4 x 10 ³ (2)	7,5 x 10 ⁵ (13)	6,3 x 10 ⁶ (20)
	1,0 x 10 ² (45)	7,1 x 10 ³ (52)	
Rosmarin	1,7 x 10 ⁴ (17)	5,6 x 10 ³ (54)	5,6 x 10 ⁴ (38)
	< 10 ¹ (51)	1,6 x 10 ³ (68)	

^{a)} GKZ = Gesamtkeimzahl (KbE /g)

^{b)} Lab.No. = Labornummer

Tab. 33: Belastung von Gewürzsorren (n= 12) verschiedener Herstellungsweisen mit *Enterobacteriaceae*.

Gewürzsorren	Herkunft		
	Konventionelle Herstellung	Ökologische Herstellung	Rohstoffproduktion
	KbE/g ^{a)} (Lab.No.) ^{b)}	KbE/g ^{a)} (Lab.No.) ^{b)}	KbE/g ^{a)} (Lab.No.) ^{b)}
Basilikum	5,0 x 10 ² (1) < 10 ¹ (42)	2,7 x 10 ² (61) 1,6 x 10 ³ (62)	6,1 x 10 ³ (41)
Curry	< 10 ¹ (3) < 10 ¹ (47)	< 10 ¹ (63) < 10 ¹ (67)	1,7 x 10 ³ (33)
Ingwer	1,9 x 10 ³ (8) < 10 ¹ (19)	< 10 ¹ (36) < 10 ¹ (56)	< 10 ¹ (37)
Knoblauch	1,0 x 10 ² (27) 3,6 x 10 ¹ (48)	2,5 x 10 ¹ (25) < 10 ¹ (57)	< 10 ¹ (30)
Koriander	5,7 x 10 ² (44) < 10 ¹ (66)	7,3 x 10 ¹ (58) 1,2 x 10 ³ (65)	6,0 x 10 ¹ (35)
Kümmel	< 10 ¹ (9) < 10 ¹ (50)	3,0 x 10 ³ (59) 2,6 x 10 ² (64)	< 10 ¹ (22)
Majoran	< 10 ¹ (28) 1,4 x 10 ² (49)	8,8 x 10 ³ (6) 2,0 x 10 ¹ (55)	1,6 x 10 ³ (40)
Nelken	< 10 ¹ (18) < 10 ¹ (29)	< 10 ¹ (60) < 10 ¹ (69)	< 10 ¹ (21)
Paprika	< 10 ¹ (10) < 10 ¹ (43)	< 10 ¹ (11) 6,0 x 10 ² (12)	< 10 ¹ (23)
Pfeffer, schwarz	< 10 ¹ (5) < 10 ¹ (46)	< 10 ¹ (4) < 10 ¹ (53)	< 10 ¹ (39)
Pfeffer, weiß	< 10 ¹ (2) 2,1 x 10 ² (45)	< 10 ¹ (13) < 10 ¹ (52)	< 10 ¹ (20)
Rosmarin	< 10 ¹ (17) < 10 ¹ (51)	< 10 ¹ (54) < 10 ¹ (68)	< 10 ¹ (38)

^{a)} Anzahl der *Enterobacteriaceae* in KbE/ g Gewürz

^{b)} Lab.No. = Labornummer

Tab. 34: Belastung verschiedener Gewürzsornten (n = 12) unterschiedlicher Herstellungsarten mit präsuntiven *B. cereus*.

Gewürzsornte	Herkunft		Rohstoffproduktion KbE/g ^{a)} (Lab.No.) ^{b)}
	Konventionelle Herstellung KbE/g ^{a)} (Lab.No.) ^{b)}	Ökologische Herstellung KbE/g ^{a)} (Lab.No.) ^{b)}	
Basilikum	1,5 x 10 ³ (1) < 10 ¹ (42)	3,6 x 10 ² (61) 5,0 x 10 ² (62)	2,3 x 10 ² (41)
Curry	1,8 x 10 ¹ (3) 4,1 x 10 ² (47)	1,8 x 10 ³ (63) 6,0 x 10 ³ (67)	3,0 x 10 ² (33)
Ingwer	3,2 x 10 ³ (8) < 10 ¹ (19)	3,2 x 10 ³ (36) 9,0 x 10 ³ (56)	3,2 x 10 ³ (37)
Knoblauch	2,0 x 10 ² (27) 1,4 x 10 ² (48)	2,3 x 10 ² (25) < 10 ¹ (57)	< 10 ¹ (30)
Koriander	< 10 ¹ (44) < 10 ¹ (66)	< 10 ¹ (58) 3,6 x 10 ³ (65)	1,0 x 10 ² (35)
Kümmel	1,0 x 10 ³ (9) < 10 ¹ (50)	3,6 x 10 ¹ (59) < 10 ¹ (64)	< 10 ¹ (22)
Majoran	1,0 x 10 ¹ (28) 2,7 x 10 ² (49)	1,5 x 10 ³ (6) 5,0 x 10 ² (55)	1,8 x 10 ² (40)
Nelken	< 10 ¹ (18) < 10 ¹ (29)	< 10 ¹ (60) 1,4 x 10 ¹ (69)	< 10 ¹ (21)
Paprika	1,0 x 10 ² (10) 8,2 x 10 ² (43)	1,0 x 10 ² (11) < 10 ¹ (12)	1,0 x 10 ² (23)
Pfeffer, schwarz	2,7 x 10 ¹ (5) < 10 ¹ (46)	2,3 x 10 ¹ (4) 4,1 x 10 ¹ (53)	2,0 x 10 ³ (39)
Pfeffer, weiß	< 10 ¹ (2) < 10 ¹ (45)	1,0 x 10 ¹ (13) < 10 ¹ (52)	1,2 x 10 ³ (20)
Rosmarin	1,0 x 10 ¹ (17) 1,4 x 10 ² (51)	< 10 ¹ (54) < 10 ¹ (68)	5,0 x 10 ¹ (38)

^{a)} Anzahl präsuntiver *B. cereus* in KbE /g Gewürz

^{b)} Lab.No. = Labornummer

Tab. 35: Überblick über die Herkunft der im Rahmen der Studie gewonnenen *B. cereus* Isolate (n=151).

Gewürzsorte	Herkunft		
	Konventionelle Herstellung	Ökologische Herstellung	Rohstoffproduktion
	Anzahl der Isolate (Lab.No.) ^{a)}	Anzahl der Isolate (Lab.No.) ^{a)}	Anzahl der Isolate (Lab.No.) ^{a)}
Basilikum	10 (1)	8 (61)	3 (41)
	1 (42)	- (62)	
Curry	3 (3)	3 (63)	6 (33)
	6 (47)	9 (67)	
Ingwer	5 (8)	5 (36)	6 (37)
	- (19)	3 (56)	
Knoblauch	- (27)	- (25)	- (30)
	2 (48)	- (57)	
Koriander	- (44)	- (58)	2 (35)
	- (66)	8 (65)	
Kümmel	2 (9)	8 (59)	- (22)
	- (50)	- (64)	
Majoran	2 (28)	- (6)	4 (40)
	3 (49)	8 (55)	
Nelken	- (18)	- (60)	- (21)
	- (29)	2 (69)	
Paprika	2 (10)	1 (11)	- (23)
	8 (43)	- (12)	
Pfeffer, schwarz	3 (5)	1 (4)	4 (39)
	- (46)	8 (53)	
Pfeffer, weiß	- (2)	1 (13)	10 (20)
	- (45)	- (52)	
Rosmarin	2 (17)	- (54)	- (38)
	1 (51)	1 (68)	

^{a)} Lab.No. = Labornummer der Gewürzprobe aus dem das Isolat gewonnen wurde

Tab. 36a: Aerobe Gesamtkeimzahl und Anzahl präsuntiver *B. cereus* in marinierten Fleischerzeugnissen aus dem Einzelhandel (Untersuchung zum Zeitpunkt des Erwerbs).

Probenr.	Aerobe Gesamtkeimzahl (KbE/g)	präsuntive <i>B. cereus</i> (KbE/g)
MF1	$3,7 \times 10^5$	$<10^1$
MF2	$9,6 \times 10^5$	$<10^1$
MF3	$3,4 \times 10^5$	$1,6 \times 10^1$
MF4	$8,2 \times 10^5$	$<10^1$
MF5	$3,8 \times 10^4$	$<10^1$
MF6	$2,5 \times 10^4$	$<10^1$
MF7	$5,1 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$
MF8	$3,6 \times 10^3$	$<10^1$
MF9	$1,3 \times 10^5$	$1,4 \times 10^1$
MF10	$4,1 \times 10^5$	$<10^1$
MF11	$1,4 \times 10^4$	$1,5 \times 10^1$
MF12	$3,3 \times 10^5$	$1,0 \times 10^1$
MF13	$5,8 \times 10^5$	$<10^1$
MF14	$1,0 \times 10^6$	$1,6 \times 10^1$
MF15	$6,9 \times 10^5$	$<10^1$
MF16	$1,5 \times 10^6$	$1,4 \times 10^1$
MF17	$8,6 \times 10^5$	$1,0 \times 10^1$
MF18	$9,2 \times 10^5$	$<10^1$
MF19	$1,5 \times 10^6$	$<10^1$
MF20	$4,9 \times 10^5$	$1,0 \times 10^1$

Tab. 36b: Aerobe Gesamtkeimzahl und Anzahl präsuntiver *B. cereus* in marinierten Fleischerzeugnissen aus dem Einzelhandel (Untersuchung nach Kühlung für 7d bei 4 °C).

Probenr.	Aerobe Gesamtkeimzahl (KbE/g)	präsuntive <i>B. cereus</i> (KbE/g)
MF1	$2,8 \times 10^6$	$<10^1$
MF2	$6,9 \times 10^6$	$<10^1$
MF3	$8,6 \times 10^5$	$1,8 \times 10^1$
MF4	$2,2 \times 10^6$	$<10^1$
MF5	$5,8 \times 10^5$	$<10^1$
MF6	$1,3 \times 10^5$	$<10^1$
MF7	$5,8 \times 10^4$	$<10^1$
MF8	$6,9 \times 10^4$	$<10^1$
MF9	$1,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^1$
MF10	$1,7 \times 10^6$	$<10^1$
MF11	$5,9 \times 10^5$	$1,5 \times 10^1$
MF12	$1,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^1$
MF13	$9,2 \times 10^6$	$<10^1$
MF14	$1,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^1$
MF15	$4,3 \times 10^6$	$<10^1$
MF16	$1,2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^1$
MF17	$7,0 \times 10^6$	$2,5 \times 10^2$
MF18	$1,4 \times 10^7$	$<10^1$
MF19	$2,2 \times 10^7$	$<10^1$
MF20	$5,8 \times 10^6$	$1,0 \times 10^2$

Tab. 37a: Aerobe Gesamtkeimzahl und Anzahl präsuntiver *B. cereus* in marinierten Fleischerzeugnissen aus eigener Herstellung (Untersuchung zum Zeitpunkt der Herstellung).

Probenr.	Aerobe Gesamtkeimzahl (KbE/g)	präsuntive <i>B. cereus</i> (KbE/g)
MF21	$1,3 \times 10^6$	$<10^1$
MF22	$6,1 \times 10^5$	$1,5 \times 10^1$
MF23	$9,9 \times 10^5$	$2,0 \times 10^1$
MF24	$7,0 \times 10^5$	$<10^1$
MF25	$7,9 \times 10^5$	$<10^1$
MF26	$5,4 \times 10^4$	$6,0 \times 10^2$
MF27	$5,4 \times 10^5$	$5,0 \times 10^2$
MF28	$6,1 \times 10^5$	$3,0 \times 10^1$
MF29	$7,0 \times 10^5$	$<10^1$
MF30	$5,8 \times 10^5$	$3,0 \times 10^1$
MF31	$2,2 \times 10^5$	$3,0 \times 10^1$
MF32	$3,6 \times 10^5$	$<10^1$
MF33	$7,8 \times 10^5$	$2,6 \times 10^1$
MF34	$1,3 \times 10^6$	$2,2 \times 10^1$
MF35	$7,0 \times 10^5$	$<10^1$
MF36	$3,4 \times 10^6$	$<10^1$
MF37	$2,2 \times 10^6$	$<10^1$
MF38	$8,6 \times 10^6$	$<10^1$
MF39	$1,3 \times 10^6$	$5,3 \times 10^1$
MF40	$2,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^1$

Tab. 37b: Aerobe Gesamtkeimzahl und Anzahl präsuntiver *B. cereus* in marinierten Fleischerzeugnissen aus eigener Herstellung (Untersuchung nach Kühlung für 7d bei 4 °C).

Probennr.	Aerobe Gesamtkeimzahl (KbE/g)	präsuntive <i>B. cereus</i> (KbE/g)
MF21	$1,9 \times 10^7$	$<10^1$
MF22	$2,2 \times 10^7$	$<10^1$
MF23	$1,3 \times 10^7$	$1,2 \times 10^1$
MF24	$1,4 \times 10^7$	$<10^1$
MF25	$1,0 \times 10^7$	$<10^1$
MF26	$3,4 \times 10^6$	$2,1 \times 10^2$
MF27	$6,1 \times 10^6$	$3,6 \times 10^2$
MF28	$1,5 \times 10^7$	$1,2 \times 10^1$
MF29	$1,5 \times 10^7$	$<10^1$
MF30	$1,7 \times 10^7$	$3,0 \times 10^1$
MF31	$1,7 \times 10^7$	$3,0 \times 10^1$
MF32	$7,9 \times 10^6$	$<10^1$
MF33	$7,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^1$
MF34	$1,1 \times 10^7$	$<10^1$
MF35	$9,9 \times 10^6$	$<10^1$
MF36	$1,6 \times 10^7$	$<10^1$
MF37	$1,7 \times 10^7$	$<10^1$
MF38	$1,2 \times 10^7$	$<10^1$
MF39	$1,4 \times 10^7$	$6,1 \times 10^1$
MF40	$1,4 \times 10^7$	$<10^1$

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dir. und Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis, Leiter des Institutes für Mikrobiologie und Biotechnologie am Max Rubner - Institut, Kulmbach, für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. E. Märtlbauer, Prodekan der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, danke ich für die Übernahme des Themas.

Bei Frau Dr. R. Pichner möchte ich mich ganz besonders für die jederzeit gewährte Beratung und Unterstützung sowie die sorgfältige Korrekturlesung dieser Arbeit bedanken.

Frau H. Loske und Frau E. Gardill danke ich ganz herzlich für ihre hervorragende technische Unterstützung bei den zahlreichen Untersuchungen. Frau B. Groß danke ich für die großartige Hilfe bei der Durchführung der Zellkulturtests. Bei Frau U. Becker möchte ich mich ganz herzlich für die Hilfe bei der Erstellung von Postern und Präsentationen bedanken.

Ohne die finanzielle Unterstützung durch die Förderergesellschaft für Fleischforschung e.V. wäre die Umsetzung der Projektziele nicht möglich gewesen. Mein Dank gilt daher in besonderem Maße der Förderergesellschaft für die bereitgestellten Mittel im Rahmen des Projektes „Nachweis und Vorkommen von *Clostridium* spp. und *Bacillus cereus* in Fleisch bzw. Gewürzen“.

bedanken.

Dateiname: Untersuchungen zum Vorkommen und zur Toxizität von
Bacillus cereus in Gewürzen.doc
Verzeichnis: F:
Vorlage: C:\Dokumente und
Einstellungen\Bernd\Anwendungsdaten\Microsoft\Vorlagen\Normal.dot
Titel: Untersuchungen zum Vorkommen und zur Toxizität von
Bacillus cereus in Gewürzen
Thema:
Autor: Antje Hammon
Stichwörter:
Kommentar:
Erstelldatum: 11.11.2008 08:35:00
Änderung Nummer: 2
Letztes Speicherdatum: 11.11.2008 08:35:00
Zuletzt gespeichert von: lgl-hammon
Letztes Druckdatum: 11.11.2008 10:40:00
Nach letztem vollständigen Druck
Anzahl Seiten: 170
Anzahl Wörter: 31.585 (ca.)
Anzahl Zeichen: 198.991 (ca.)