

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

**Vorkommen und Charakterisierung des Toxinbildungsvermögens
von *Bacillus cereus*-Isolaten
aus ausgewählten Lebensmitteln**

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

von
Imke Erbslöh
aus
Wuppertal

München 2007

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent: Prof. Dr. Märtlbauer
Korreferent(en): PD Dr. Schalch

Tag der Promotion: 9. Februar 2007

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|---|
| A. dest. | Aqua destillata |
| ALT | Alaninaminotransferase, Leberenzym |
| AST | Aspartataminotransferase, Leberenzym |
| BALB/c | Mausstamm |
| BceT | Enterotoxin T |
| BCET-RPLA | Reverser Latexagglutinationstest zum Nachweis der L ₂ -Komponente des HBL-Enterotoxinkomplex |
| BHI-Bouillon | Hirn-Herz-Bouillon unter Zusatz von Glucose |
| CGY-Bouillon | Nährmedium für <i>B. cereus</i> |
| CTU | Zytotoxische Einheiten |
| Cyt K | Zytotoxin K |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| d/NTP | Desoxy-Nukleosid-Triphosphat |
| DSM | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EIA | enzym-linked immunosorbent assay |
| EntFM | Enterotoxin FM |
| EU | Europäische Union |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| HACCP | Hazard Analysis and Critical Control Point Concept |
| HBL | Hämolysin BL |
| HSA | Humanes Serumalbumin |
| IE | Internationale Einheiten |
| KbE | Kolonie-bildende Einheiten |
| kDa | Kilodalton |
| KG | Körpergewicht |
| kg | Kilogramm |
| LDH | Laktatdehydrogenase, Leberenzymwert |
| mA | Milliampere |
| mM | Millimolar |
| mAk | monoklonale Antikörper |

| | |
|----------|---|
| MEM | Eagles Minimal essential medium, Erhaltungsmedium |
| MHI | Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch, München |
| MIL-Test | Mouse Ileal Loop – Test |
| min | Minute |
| MYP | Mannitol egg yolk polymyxin |
| Nhe | Non-Hemolytic Enterotoxin |
| nM | Nanomolar |
| ORF | Open reading frame |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung |
| PCR | polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion |
| PEMBA | Polymyxin pyruvate egg yolk mannitol bromothymol blue agar |
| PlcR | Exoprotein-Regulator |
| RIL | rabbit ileal loop |
| RT | Raumtemperatur |
| sec | Sekunde |
| SMM | Skim Milk Medium |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TBS | Tris-gepufferte Kochsalzlösung |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| TRIS | Tris-hydroxy-ethyl-aminoethan |
| TSA | Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar |
| TSB | Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon |
| TSPB | Trypton-Soja-Polymyxin-Bouillon |
| VPR | Vascular permeability reaction |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| w/v | Gewicht pro Volumen |
| WST | Zell-Proliferationsreagenz: 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Schrifttum | 3 |
| 2.1 | Allgemeines | 3 |
| 2.2 | Enterotoxine | 4 |
| 2.2.1 | Hämolysin BL (HBL) | 4 |
| 2.2.2 | Non-Hemolytic Enterotoxin (Nhe) | 5 |
| 2.2.3 | Cytotoxin K (Cyt K) | 6 |
| 2.2.4 | <i>Bacillus cereus</i> Enterotoxin T (BcET) | 6 |
| 2.2.5 | Enterotoxin FM (EntFM) | 7 |
| 2.2.6 | Cereulid | 8 |
| 2.3 | Vorkommen von <i>B. cereus</i> in Lebensmitteln | 10 |
| 2.3.1 | Untersuchungen über das allgemeine Vorkommen von <i>B. cereus</i> | 10 |
| 2.3.2 | Vorkommen von emetischen <i>B. cereus</i> -Stämmen | 14 |
| 3 | Eigene Untersuchungen | 15 |
| 3.1 | Materialien | 15 |
| 3.1.1 | Chemikalien und Biochemika | 15 |
| 3.1.2 | Mikroorganismen und Zellkultur | 16 |
| 3.1.2.1 | Bakterien Stämme bzw. Isolate | 16 |
| 3.1.2.2 | Zelllinien | 17 |
| 3.1.3 | Nährmedien | 17 |
| 3.1.4 | Puffer und Lösungen | 18 |
| 3.1.5 | Immunreagenzien | 19 |
| 3.1.6 | Sonstige Materialien | 19 |
| 3.1.7 | Geräte | 20 |
| 3.2 | Allgemeine Methodik | 21 |
| 3.2.1 | Keimzahlbestimmung der Proben mit Oberflächenverfahren (Spatelverfahren) | 21 |
| 3.2.2 | Anreicherung von <i>B. cereus</i> in TSPB nach ISO 21871:2006 (Detection method) | 22 |
| 3.2.3 | Stärkehydrolyse-Test | 23 |
| 3.2.4 | Anzucht von <i>B. cereus</i> in CGY-Bouillon | 23 |
| 3.2.5 | Enzymimmunassay (EIA) | 23 |
| 3.2.5.1 | Indirekter Enzymimmunassay | 24 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.2.5.2 | Sandwich-Enzymimmunassay | 24 |
| 3.2.6 | PCR | 25 |
| 3.2.6.1 | DNA-Extraktion | 25 |
| 3.2.6.2 | Durchführung der PCR | 25 |
| 3.2.6.3 | Gelelektrophorese | 26 |
| 3.2.7 | Zytotoxizitätstest für emetisches Toxin | 27 |
| 3.2.7.1 | Anzucht in Magermilch (SMM) | 27 |
| 3.2.7.2 | Durchführung des Zytotoxizitätstest | 27 |
| 3.3 | Ergebnisse | 29 |
| 3.3.1 | Keimzahlbestimmung auf Schafblutagar | 29 |
| 3.3.1.1 | Anzahl aller auf Schafblutagar gewachsenen Kolonien | 29 |
| 3.3.1.2 | Anzahl der <i>B. cereus</i> -Kolonien nach Keimzahlbestimmung auf Schafblutagar | 30 |
| 3.3.2 | <i>B. cereus</i> Detektion nach TSBP-Anreicherung | 32 |
| 3.3.3 | Vorkommen von <i>B. cereus</i> in den einzelnen Produktgruppen | 34 |
| 3.3.3.1 | Nudeln | 34 |
| 3.3.3.2 | Reis | 36 |
| 3.3.3.3 | Babynahrung | 40 |
| 3.3.3.4 | Convenience Food | 42 |
| 3.3.3.5 | Vergleichende Charakterisierung der Isolate | 44 |
| 3.3.4 | Zubereitete Proben | 47 |
| 4 | Diskussion..... | 49 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 55 |
| | Summary | 56 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 57 |
| 7 | Anhang..... | 70 |

1 Einleitung

Bacillus cereus ist gram-positiv, fakultativ anaerob und besitzt als Sporenbildner eine große Widerstandsfähigkeit gegenüber ungünstigen Umweltbedingungen. Da die Sporen durch die in der Milchwirtschaft üblichen Pasteurisierungsverfahren nicht abgetötet werden, gehört er zu den wichtigsten Verderbserregern von Milch und Milchprodukten, kann aber auch regelmäßig aus den verschiedensten Lebensmitteln, wie z. B. Nudeln, Reis, Gemüse und Fleisch isoliert werden.

Von besonderer lebensmittelhygienischer Relevanz ist, dass der Keim durch die Produktion extrazellulärer Toxine in der Lage ist, zwei verschiedene Arten von Lebensmittelvergiftungen hervorzurufen. Im ersten Fall kommt es nach einer Inkubationszeit von 6 - 18 Stunden zu einer in der Regel selbstlimitierenden Diarrhoe, wie erstmals von HAUGE (1955) im Selbstversuch bestätigt werden konnte. Dieses Krankheitsbild ist auf die Bildung von Enterotoxinen zurückzuführen. Zu nennen sind hier v. a. zwei Proteinkomplexe, das Hämolyisin-BL (HBL; BEECHER & MACMILLAN, 1990) und das nicht hämolytische Enterotoxin (Nhe; LUND & GRANUM, 1996). Andererseits gibt es auch *B. cereus*-Stämme, die in der Lage sind, emetisches Toxin zu produzieren. Dieses auch als Cereulid bezeichnete hitzestabile Toxin, ein zyklisches Dodekadepeptid (AGATA et al., 1994), das präformiert in Lebensmitteln vorliegt, führt nach Aufnahme innerhalb von 1 – 5 Stunden zum typischen Krankheitsbild mit den Leitsymptomen Vomitus und Nausea.

Bei erhitzten Produkten ist *B. cereus* häufig der einzige potentiell pathogene Keim und kann sich insbesondere bei falscher Behandlung (Lagerung bei Raumtemperatur) gut vermehren. Ein besonderes Problem stellen dabei, neben stärkehaltigen Lebensmitteln, Babynahrung und sog. „Convenience Foods“ (EHLING-SCHULZ et al., 2004) dar, d. h. Lebensmittel die vorgekocht und gekühlt verkauft und vom Verbraucher lediglich erwärmt werden.

Die Zahl der am Lehrstuhl für Milchhygiene in den letzten Jahren analysierten Proben mit Verdacht auf eine Lebensmittelvergiftung durch *B. cereus* (in Zusammenarbeit mit der Lebensmittelüberwachung) ist stetig zunehmend. Durch die am Lehrstuhl entwickelten Methoden war eine gleichzeitige Detektierung und Differenzierung der von *Bacillus cereus*-Kulturen gebildeten Enterotoxine möglich (DIETRICH et al., 1999 und 2005; MORAVEK et al., 2004). Zur Überprüfung des emetischen Toxinbildungsvermögens wurden die Isolate

mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) untersucht und im positiven Fall in ein Zellkulturtestverfahren eingesetzt (EHLING-SCHULZ et al., 2004; SCHULZ, 2004).

Ziel der Arbeit war es, anhand einer repräsentativen Studie an 203 Nahrungsmittelproben, den ersten differenzierten Statusreport zur Belastung von Lebensmitteln mit toxinbildenden *B. cereus* für Bayern zu erheben. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf das Vorkommen von *B. cereus* in Reis, Nudeln, Babynahrung und Convenience Food gelegt.

Diese Arbeit wurde gefördert durch das Bayerische Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz im Rahmen des Forschungsvorhabens „Studie zur Belastung von Lebensmitteln mit toxinbildenden *Bacillus cereus*“ (47-G8830-2005).

2 Schrifttum

2.1 Allgemeines

B. cereus, ein Keim, der schon 1906 von LUBENAU als möglicher Erreger einer Darmerkrankung erwähnt wurde und dessen Enteropathogenität 1955 von HAUGE im Selbstversuch bewiesen wurde, gehört zur morphologischen Gruppe 1A der Gattung *Bacillus*. Außer *B. cereus* gehören noch *B. anthracis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. thuringiensis* und *B. weihenstephanensis* zu dieser Gruppe. Die Speziesdifferenzierung erfolgt anhand verschiedener Kriterien (Tab. 1).

Tabelle 1: Kriterien für eine Speziesdifferenzierung innerhalb der *Cereus*-Gruppe (GRANUM, 2001)

| Spezies | Kolonie- morphologie | Hämolyse | Beweglichkeit | Penicillin- empfindlichkeit | Parasporale Kristalle |
|------------------------------|--|----------|---------------|--------------------------------|--------------------------|
| <i>B. cereus</i> | weiß | + | + | - | - |
| <i>B. anthracis</i> | weiß | - | - | + | - |
| <i>B. thuringiensis</i> | weiß/grau | + | + | - | + |
| <i>B. mycooides</i> | rhizoid | (+) | - | - | - |
| <i>B. weihenstephanensis</i> | Abgrenzung von <i>B. cereus</i> : Wachstum bei < 7 °C, nicht bei 43 °C; Identifizierung mittels PCR (rRNA, Kälteschock-Protein-A-Gen- <i>cspA</i>) (LECHNER et al., 1998) | | | | |
| <i>B. pseudomycooides</i> | Durch morphologische und physiologische Kriterien nicht abgrenzbar von <i>B. mycooides</i> ; Identifizierung anhand des Fettsäuremusters und der 16S rRNA-Sequenz | | | | |

B. cereus spielt als Erreger von Lebensmittelintoxikationen und –infektionen sowie als Verderbserreger in der Lebensmittelhygiene eine große Rolle (KOTIRANTA et al., 2000), zudem können von *B. cereus* auch nicht gastrointestinale Krankheiten hervorgerufen werden. Hierzu zählen vor allem die systemischen Erkrankungen wie Septikämien, Infektionen des Zentralnervensystems und Atemwegserkrankungen (DROBNIEWSKI, 1993), aber auch lokale Infektionen bei Wunden und vor allem posttraumatische Endophtalmitiden

(CALLEGAN et al., 1999). Bei Rindern kann *B. cereus* schwere Mastitiden verursachen, wie es schon 1957 von BROWN & SCHERER beschrieben wurde.

Ursache für die beim Menschen ausgelösten gastrointestinalen Erkrankungen sind von *B. cereus* gebildete Toxine, wobei in Tierversuchen auch bei Hunden und Katzen eine Erkrankung provoziert werden konnte (NIKODÉMUSZ, 1965 und 1967).

2.2 Enterotoxine

Die gastrointestinalen Erkrankungen können in zwei unterschiedliche Verläufe unterteilt werden. Zum einen die Diarrhoe-Form, die durch verschiedene Enterotoxine ausgelöst wird, zum anderen die emetische Form, deren Ursache ein hitzestabiles Toxin (Cereulid) darstellt.

Die Enterotoxine der Diarrhoe-Form bestehen aus mehreren hitzelabilen (GLATZ et al., 1974) und trypsinempfindlichen (GOEPFERT et al., 1973) Exoproteinen bzw. deren Komplexen. Dazu zählen das Hämolyysin BL (HBL) und das Non-Hemolytic Enterotoxin (Nhe) sowie Zytotoxin K (CytK), Enterotoxin T (BceT) und Enterotoxin FM (EntFM), wobei für die beiden letztgenannten eine Beteiligung an Lebensmittelvergiftungen noch nie nachgewiesen werden konnte. Nach neueren Studien haben sie keine Bedeutung als Ursache von Lebensmittelvergiftungen (CHOMA & GRANUM, 2002).

2.2.1 Hämolyysin BL (HBL)

Der hämolytisch wirkende Enterotoxinkomplex Hämolyysin BL (HBL) besteht aus drei verschieden großen Proteinen, der Komponente B (38,0 kDa), der L₁-Komponente (39,5 kDa) und der L₂-Komponente (44,8 kDa; BEECHER & WONG, 2000a), die lediglich in Kombination ihre maximale biologische Aktivität ausbilden, wie von BEECHER & WONG, 1994 und BEECHER et al., 1995 im VPR- (vascular permeability reaction) und RIL-Test (rabbit ileal loop) gezeigt wurde. Das HBL-Operon besteht aus den Genen *hblD* (Codierung der L₁-Komponente), *hblC* (Codierung der L₂-Komponente), *hblA* (Codierung der Komponente B) sowie aus einem weiteren Gen *hblB*, dessen Funktion noch nicht geklärt werden konnte (HEINRICHS et al., 1993; RYAN et al., 1997). Die Regulierung durch PlcR konnte durch die Identifikation einer PlcR-Bindungsstelle auf dem HBL-Operon bewiesen

werden. Dieser Regulator ist für die Kontrolle vieler Exoproteine von *B. cereus* zuständig (AGAISSE et al., 1999).

Eine Besonderheit, die bei HBL-positiven Stämmen beobachtet werden kann, ist eine diskontinuierliche Hämolyse auf Schafblutagarplatten (BEECHER & MACMILLAN, 1990). Allerdings ist dieses phänotypische Merkmal kein gesichertes Identifizierungsmerkmal, da es HBL-positive Stämme gibt, die mittels ELISA oder PCR (IN'T VELD et al., 2001) identifiziert werden konnten, aber dieses Phänomen nicht zeigten. Grundsätzlich scheint aber das Hämolyseverhalten des HBL-Komplexes von Sphingomyelinase und Phospholipase C abzuhängen, zwei Enzymen, die ebenfalls von *B. cereus* gebildet werden (BEECHER & WONG, 2000b).

Die Wirkungsweise von HBL auf zellulärer Ebene ist noch nicht vollständig geklärt. So wurden einige Hypothesen zum Wirkungsmechanismus (BEECHER & WONG, 1994; BEECHER & MACMILLAN, 1991) erstellt. Beim aktuellsten Modell binden sich die einzelnen Komponenten des HBL-Komplexes unabhängig voneinander an die Zielzellen und formieren sich zu einem „membrane attack complex“ (BEECHER & WONG, 1997), der in der Zellmembran Porenbildung hervorruft. Der Austritt von Zellflüssigkeit und Zellmaterial führt schließlich zum Zelltod.

2.2.2 Non-Hemolytic Enterotoxin (Nhe)

Ein weiteres Enterotoxin ist das Non-Hemolytic Enterotoxin (Nhe), welches von LUND & GRANUM (1996) beschrieben wurde und aus einem HBL-negativen *B. cereus*-Stamm (NVH 0075/ 95) isoliert werden konnte. Er stammte aus einer Lebensmittelvergiftung bei einer Großveranstaltung in Norwegen, bei der 152 Menschen mit dem Leitsymptom Diarrhoe erkrankten. Untersuchungen von IN'T VELD et al. (2001) und HANSEN & HENDRIKSEN (2001) ergaben, dass bei 90 % und mehr der *B. cereus*-Stämme der Nhe-Komplex nachweisbar war.

Nhe besteht wie HBL aus drei Proteinuntereinheiten und kann die maximale biologische Aktivität ebenfalls nur als Komplex ausbilden. Für die einzelnen Komponenten konnte im Zytotoxizitätstest auch in hohen Konzentrationen nur geringe bis keine Zytotoxizität nachgewiesen werden (LUND & GRANUM, 1997). Ein Unterschied zu HBL besteht in der Größe der Proteineinheiten mit Molekulargewichten von 39,8 kDa (Nhe B), 41,0 kDa (Nhe A) und 36,5 kDa (Nhe C; GRANUM et al., 1999), jedoch ähneln sich die

Aminosäuresequenzen der Proteine beider Komplexe vor allem am N-terminalen Ende. Die größten Homologien bestehen zwischen dem Nhe A Protein und der L₂-Komponente des HBL-Komplexes, dem Nhe B-Protein und der L₁-Komponente des HBL-Komplexes und zwischen dem Nhe C und der B-Komponente des HBL-Komplexes (GRANUM et al., 1999). Wie auch bei HBL befinden sich alle drei Gene der drei Proteineinheiten von Nhe auf einem Operon (GRANUM et al., 1999) und die Kontrolle der Expression erfolgt ebenfalls durch den Regulator PlcR (AGAISSE et al., 1999).

2.2.3 Cytotoxin K (Cyt K)

LUND et al. isolierten im Jahr 2000 ein bis dahin unbekanntes Toxin aus einem *B. cereus*-Stamm, der in Zusammenhang mit einer tödlichen Lebensmittelvergiftung in einem Altenheim in Frankreich isoliert worden war. Bei diesem Toxin handelte es sich um Cytotoxin K (Cyt K), ein einzelnes Exoprotein mit einem Molekulargewicht von 33,8 kDa, das mit Toxinen anderer Mikroorganismen eine starke Homologie aufweist. So hat Cyt K die gleiche Größe wie das α -Hämolyisin von *Staphylococcus aureus* und eine Aminosäuresequenzähnlichkeit von 30 %. Außerdem sind beim Wirkungsmechanismus von Cyt K große Parallelen zum β -Hämolyisin von *Clostridium perfringens* und zu Leukozidin zu finden. Alle bilden Ionen-durchlässige Kanäle (MENESTRINA et al., 2001), die im Fall von Cyt K innerhalb von 1 - 20 Minuten einen Durchmesser von 0,7 nm erlangen, wie HARDY et al. (2001) bei Versuchen mit künstlichen Doppellipidschichten nachwies. Auch wurde eine Sequenzhomologie von 37 % zu Hämolyisin II entdeckt, einem Exoprotein, welches von *B. cereus* gebildet wird und das 1999 von BAIDA et al. beschrieben wurde. Allen Toxinen gemeinsam ist die Gruppenzugehörigkeit zu den so genannten β -barrel Proteinen. Cyt K weist hämolytische sowie nekrotisierende Eigenschaften auf, wie LUND et al. (2000) im Tierversuch zeigen konnten.

2.2.4 *Bacillus cereus* Enterotoxin T (BcET)

BceT, ein Enterotoxin, welches bisher noch nicht ursächlich mit einer Lebensmittelvergiftung in Verbindung gebracht werden konnte (CHOMA & GRANUM, 2002), ist ein Toxin, das von AGATA et al. (1995a) aus *B. cereus* B-4ac (DSM 4384) kloniert wurde. Das rekombinante

Protein (bc-D-ENT), das in *Escherichia coli* exprimiert werden konnte, besteht aus 336 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 41,0 kDa. Allein die Tatsache, dass bc-D-ENT im Zytotoxizitätstest mit Verozellen sowie im Darmschlingenligations-, Gefäßpermeabilitäts- und Mausletalitätstest positiv reagierte, ließ AGATA et al. (1995a) darauf schließen, dass auch BcET möglicherweise pathogen wirken könnte. Allerdings zeigten die Testreihen von AGATA et al. (1995a) weiter, dass bc-D-ENT wesentlich schwächere biologische Aktivitäten aufwies als der Kulturüberstand des ursprünglichen *B. cereus*-Stammes (B-4ac).

Von HANSEN et al. konnte 2003 gezeigt werden, dass BceT nicht von einem einzelnen Gen aus *B. cereus* codiert wird, sondern von mehreren Fragmenten, die durch die bei AGATA et al. (1995a) verwendeten Restriktionsenzyme entstehen und die sich zufällig kombinieren. HANSEN et al. (2003) führten die enterotoxische Aktivität von dem von AGATA et al. (1995a) gefundenen BcET auf die Tatsache zurück, dass eines dieser Fragmente zu 93 % mit dem open reading frame (ORF 101) des Virulenzplasmids pXO1 von *Bacillus anthracis* homolog war.

CHOMA & GRANUM (2002) fanden weder bei dem *B. cereus*-Stamm NVH 38 noch bei dem *B. cereus*-Stamm B-4ac eine biologische Aktivität in Kulturüberständen oder Zellextrakten, obwohl die gleichen Verfahren wie bei AGATA et al. (1995a) angewendet wurden. Des Weiteren fanden sie heraus, dass die typische Startersequenz, die bei Exoproteinen zum Ausschleusen aus dem Bakterium notwendig ist, auf dem *bceT*-Gen fehlt, ebenso wie die Fähigkeit des Proteins Adenylatcyclase zu stimulieren um ATP in cAMP umzuwandeln, wie es bei einigen gram-negativen Bakterien, die Diarrhoe auslösen, beobachtet werden kann. Folglich ist die Wahrscheinlichkeit, dass BcET eine Erkrankung auslösen kann, nach derzeitigem Wissensstand sehr gering.

2.2.5 Enterotoxin FM (EntFM)

EntFM wurde das erste Mal von SHINAGAWA 1990 isoliert. ASANO et al. (1997) klonierten und sequenzierten aus dem *B. cereus*-Stamm FM 1 das *EntFM*-Gen. Das Genprodukt besaß ein Molekulargewicht von 45,0 kDa und wies eine Reihe von Betastrukturen auf. Eine Signalsequenz bestehend aus 19 Aminosäuren am N-terminalen Ende wurde ebenfalls beschrieben. Das Gen wurde auf dem Chromosom des *B. cereus*-Stammes lokalisiert. Gensequenzen mit einer Homologie von 97 % wurden in dieser Studie

auch bei *B. thuringiensis*-Stämmen gefunden. Allerdings konnte dieses postulierte Toxin noch nie in Kulturüberständen von *Bacillus cereus* nachgewiesen werden.

2.2.6 Cereulid

Die emetische Form der Erkrankung wird durch ein hitzestabiles Toxin (Cereulid) verursacht. Das Erkrankungsbild gleicht einer Lebensmittelintoxikation mit *Staphylococcus aureus* und tritt häufig im Zusammenhang mit dem Verzehr von stärkehaltigen Lebensmitteln (v. a. Reis und Nudeln) auf. Die Leitsymptome Vomitus und Nausea stellen sich bereits nach einer kurzen Inkubationszeit von 1 - 5 Stunden ein und im Normalfall ist die meist selbstlimitierende Erkrankung bereits nach 6 - 24 Stunden ausgestanden (KRAMER & GILBERT, 1989). Allerdings sind auch Intoxikationen beschrieben worden, die tödlich verliefen oder zu schweren gesundheitlichen Schäden führten. So berichteten MAHLER et al. (1997) von einem 17-jährigen Jungen, der an einer „Leberinsuffizienz“ gestorben war, die auf den Verzehr von mit Cereulid kontaminierten, aufgewärmten Nudeln zurückgeführt werden konnte. Ein weiterer Fall wurde in Belgien bekannt, bei dem ein 7-jähriges Mädchen im August 2003 nach dem Verspeisen von Nudelsalatresten, die nach einem Sommerpicknick weitere drei Tage im Kühlschrank gelagert worden waren, an Leberversagen und metabolischer Azidose starb. Neben dem Mädchen erkrankten auch die vier älteren Geschwister, wobei der 9-jährige Bruder ebenfalls in Lebensgefahr schwebte (DIERICK et al., 2005).

Cereulid ist ein zyklisches Dodekadeptide, welches wie das strukturverwandte Antibiotikum Valinomycin aus drei identischen Tetrapeptid-Fragmenten besteht und ein Molekulargewicht von 1191 Da aufweist (AGATA et al., 1994; Abb. 1).

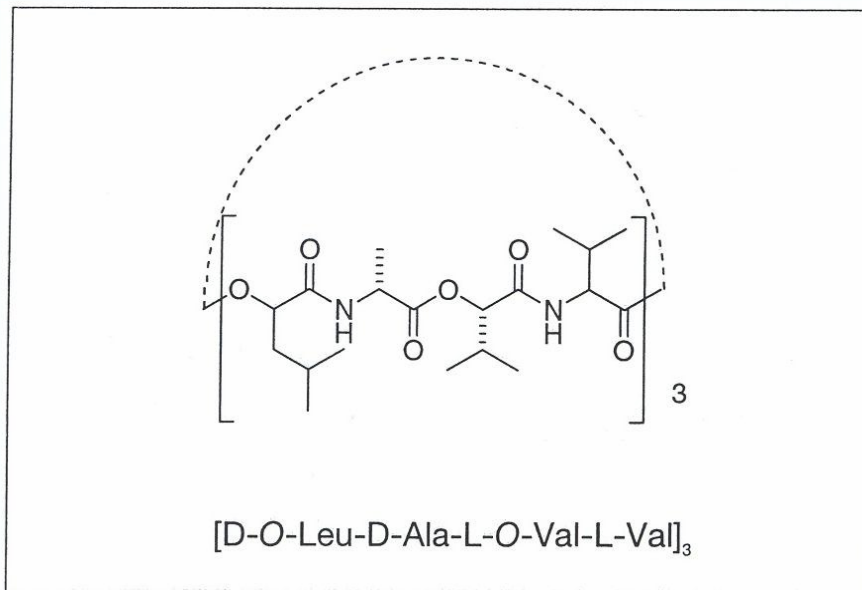


Abbildung 1: Chemische Struktur des emetischen Toxins (Cereulid) von *B. cereus* (AGATA et al., 1994)

Depsipeptide, wie das Cereulid, enthalten nicht-proteinogene Bausteine, wie D-Aminosäuren oder Hydroxysäuren, und werden deswegen auch als heteromere Peptide bezeichnet. Die Aminosäuren D-Leucin, D-Alanin und L-Valin sind über alternierende Ester- und Peptidverbindungen verbunden und verleihen dem Toxin eine stark hydrophobe Wirkung (AGATA et al., 1994).

Cereulid wird von SUWAN et al. (1995) als hexagonales zylindrisches Gerüst beschrieben, das der Armbandstruktur von Valinomycin gleicht. Im Zentrum des Moleküls ist ein K^+ -Ion durch die drei Sauerstoffatome der Carbonyl-Gruppen von L-Valin in der oberen Ebene sowie der Carbonyl-Gruppe des D-Alanin in der unteren Ebene gebunden. Aufgrund der ähnlichen Strukturen von Cereulid mit dem Antibiotikum Valinomycin wurden auch gleiche biologische Aktivitäten erwartet. So konnten AGATA et al. (1995b) bei Spitzmäusen zeigen, dass Cereulid ebenso wie Valinomycin *in vivo* als Emetikum wirken kann und *in vitro* beide Dodekadepsipeptide Zellvakuolenbildung in HEp-2 Zellen auslösen. Die höheren Konzentrationen (ca. 100fach) von Valinomycin, die benötigt werden, um Erbrechen auszulösen, sind wahrscheinlich auf die wenigen Strukturunterschiede der beiden Peptide sowie auf die daraus resultierende veränderte Affinität zu den Zelloberflächenrezeptoren zurückzuführen. Des Weiteren konnte AGATA et al. (1995b) zeigen, dass nach einer

Vagotomie oder nach Injektion von 5-HT₃ Rezeptor-Antagonisten der emetische Effekt vollständig verhindert werden konnte.

Deutliche pathologische Veränderungen konnten YOKOYAMA et al. (1999) nur an der Leber feststellen. Das Team führte Versuche an BALB/c Mäusen durch und untersuchte die klinisch-pathologischen Auswirkungen von intraperitoneal appliziertem Cereulid. Die Dauer sowie das Ausmaß der Gewebsschäden an der Leber waren abhängig von der Dosis des injizierten Cereulids, wobei die stärksten pathologischen Veränderungen ein bis zwei Tage nach der Injektion festzustellen waren. So konnten histopathologisch Kongestionen zirkulär um die Zentralvenen, kleine konfluierende Nekroseherde und angeschwollene Hepatozyten beschrieben werden, aber auch Mikrosteatosen. Die Leberenzyme (AST, ALT, LDH) veränderten sich ebenfalls mit dem Schweregrad der histologischen Veränderungen der Leber. Allerdings konnte auch nachgewiesen werden, dass vier Wochen nach der Gabe von Cereulid die Leber ebenso wie die Leberenzyme sich nahezu vollständig regeneriert hatten, so dass man vermuten kann, dass eine intensive Leberschutztherapie während der akuten Phase sich positiv auf die Genesung des Patienten auswirkt. Bei 25 µg synthetischen Cereulids pro Maus konnte der Tod des Tieres innerhalb weniger Stunden festgestellt werden, wahrscheinlich aufgrund eines akuten Leberversagens.

SHINAGAWA et al. (1995) konnten bei Rhesusaffen zeigen, dass ca. 10 µg/kg Körpergewicht Cereulid notwendig sind, um Emesis auszulösen. JÄÄSKELÄINEN et al. (2003) vermuten, dass beim Menschen ähnliche Toxinkonzentrationen nötig sind, um Erbrechen hervorzurufen. So berechneten sie anhand eines *B. cereus*-Stammes, der aus einem selbst zubereiteten Nudelgericht isoliert wurde und der bei zwei Erwachsenen innerhalb einer Stunde Vomitus und Nausea auslöste, eine effektive Dosis von ≤ 8 µg Toxin pro kg Körpergewicht.

2.3 Vorkommen von *B. cereus* in Lebensmitteln

2.3.1 Untersuchungen über das allgemeine Vorkommen von *B. cereus*

In Deutschland wurde 1984 von BECKER et al. eine Untersuchung von Babynahrung durchgeführt. Dabei wurden 206 Säuglings- und Kleinkindernahrungen auf ihren Gehalt an *B. cereus* analysiert. Aus 64 Proben (31 %) konnte *B. cereus* in Keimzahlen von 3 bis 460

KbE/g Probe isoliert werden, allerdings hatten nur zwei Proben einen *B. cereus*-Gehalt über 100 KbE/g Probe.

Eine erneute Statistik über den Gehalt von *B. cereus* in Säuglings- und Kleinkindernahrung stellten BECKER et al. 1994 auf. Hierbei wurden 261 Proben aus 17 Ländern auf *B. cereus* getestet. Ein Prozentsatz von 54 % der untersuchten Proben war *B. cereus* positiv, wobei sich die Werte zwischen 0,3 bis 600 KbE/g bewegten. Lediglich vier der 261 Säuglings- und Kleinkindernahrungsproben lagen über 100 Keime/g, der höchste Wert lag bei 600 KbE/g. Bei 27 °C wurden nach 7 - 9 Stunden Keimzahlen von 10^5 erreicht. Des Weiteren wurden in dieser Studie die untersuchten Babynahrungsproben in unterschiedliche Gruppen eingeteilt und mit den Ergebnissen der Untersuchungen von 1984 verglichen (BECKER et al., 1984). So konnten sie feststellen, dass bei Säuglingsnahrung die Kontamination von 31 % auf 70 % stieg und bei der Folgemilch die Werte von 28 % auf 55 % anstiegen. Der stärkste Anstieg von 40 % auf 100 % wurde bei diätetischer Nahrung nachgewiesen.

In Holland sammelten VAN NETTEN et al. (1990) aus dem Einzelhandel 1700 verschiedene Proben aus unterschiedlichen Lebensmittelgruppen. Die höchste Kontaminationsrate mit *B. cereus* hatten Gewürze (42 %), gefolgt von pasteurisiertem Eigelbpulver (29 %) und pasteurisiertem Flüssigeigelb (24 %). Nur bei 6 % der 551 untersuchten Reisgerichte konnte *B. cereus* nachgewiesen werden und eine Kontaminationsrate von 3 % lag bei 35 untersuchten Lasagne-Gerichten vor. Bei den Convenience Food-Gerichten war sogar nur 1 % der 72 untersuchten Proben *B. cereus* positiv.

CHOMA et al. (2000) fanden bei einer Untersuchung von gekochtem und danach gekühltem Gemüse *Bacillus cereus*-Gehalte unter 10 KbE/g. Im Immunassay konnte festgestellt werden, dass bei 97,5 % der Stämme Enterotoxinbildung stattfindet.

Eine Untersuchung über das Vorkommen von *B. cereus* in gekühlten Gnocchi (italienische Kartoffelklöße) von DEL TORRE et al. (2001) ergab, dass 33 % der Proben kontaminiert waren. Dabei wurden nur Konzentrationen von unter 10^2 KbE/g gefunden.

Von LITTLE et al. (2003) wurden 1946 „ready-to-eat foods“ untersucht, die sie aus unterschiedlichsten Lokalitäten wie Cafés, Bäckereien, Sandwich Bars, Delikatessgeschäften, Restaurants, aber auch direkt vom Hersteller von Sandwichs gezogen haben. Die Untersuchung ergab, dass 66 % der analysierten Proben eine akzeptable mikrobiologische Qualität besaßen. Von nicht mehr akzeptabler Qualität waren 2 % der „ready-to-eat foods“, die vor allem *Bacillus* spp. und *Bacillus cereus* mit Keimgehalten von $\geq 10^5$ KbE/g enthielten. Des Weiteren wurden hohe *B. cereus*-Konzentrationen ($\geq 10^4$ KbE/g) in Gewürzen

und Gewürzmischungen festgestellt, die später in den daraus hergestellten „ready-to-eat foods“ in gleichen Konzentrationen wieder zu finden waren. Lokale mit gutem Hygienemanagement schlossen deutlich besser ab als kleine Geschäfte ohne HACCP-Konzept.

FONTANAROSA et al. (2004) untersuchten den Hygienestatus in einer Fabrikantine in der Stadt Bari (Italien). In den untersuchten Gerichten waren zwar *B. cereus*-Stämme enthalten, die eine Lebensmittelvergiftung hätten auslösen können, allerdings waren die Konzentrationen so gering, dass sie nicht als gesundheitsgefährdend eingestuft wurden.

Eine weitere Studie wurde von OGUNTOYINBO et al. (2004) in Nigeria durchgeführt. Sie untersuchten das Auftreten von *B. cereus* bei der Produktion von bakteriell fermentierten Lebensmitteln. So wurden zwei fermentierte Gemüseproteine (Ogiri und Iru), die als Gewürze benutzt werden, auf das Vorhandensein von *B. cereus* überprüft. In allen 50 Proben wurde *B. cereus* in einer Konzentration zwischen $2,0 \times 10^6$ und $2,0 \times 10^8$ KbE/g nachgewiesen. Sie stellten des Weiteren fest, dass die Isolate kaum Zucker verstoffwechselten, doch Propionat und Citrat als Kohlenstoffquellen nutzten. Die isolierten Stämme produzierten allesamt Diarrhoetoxin und wiesen hämolytische Aktivität auf, allerdings zeigten die Isolate nur ein geringes Hydrolyseverhalten.

Eine Analyse über „ready-to-eat foods“ in Großbritannien führten MELDRUM et al. (2005) durch. In der 9-jährigen Langzeitstudie, bei der 15228 „ready-to-eat foods“ untersucht wurden, konnten nicht mehr akzeptable Kontaminationen mit pathogenen Keimen wie *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* und *B. cereus* bei 0,5 % der Proben festgestellt werden.

ROSENQUIST et al. (2005) gaben nach Untersuchungen von 48 901 Proben „ready-to-eat foods“, die aus dem dänischen Einzelhandel gezogen wurden, bekannt, dass bei 0,5 % der Gerichte eine Konzentration von mehr als 10^4 KbE/g an *B. cereus* vorlag, wobei die meisten erhöhten Werte in stärkehaltigen, gekochten Lebensmitteln zu finden waren, aber auch in Gurken und Tomaten. Des Weiteren stellten ROSENQUIST et al. fest, dass bei 40 zufällig ausgewählten *B. cereus*-Stämmen mindestens ein Gen oder eine Komponente der Diarrhoetoxine nachzuweisen war, das emetische Toxin allerdings nur bei einem einzigen Stamm zu finden war.

MURINDAMOMBE et al. (2005) zog in Gabarone (Botswana) zwischen Juni 2001 und Mai 2002 Lebensmittelproben aus dem Straßenverkauf und untersuchte diese auf *B. cereus*. Hiervon waren 65 % mit *B. cereus* kontaminiert, wobei die höchste Konzentration bei $1,3 \times 10^9$ KbE/g lag. Die meisten Proben hatten allerdings eine Konzentration von weniger als 10^4

KbE/g und waren somit von akzeptabler mikrobieller Qualität. Diarrhoetoxin (HBL) wurde durch das RPLA-Kit (Oxoid) ermittelt und konnte bei 59,6 % der Isolate aus verschiedenen Speisen nachgewiesen werden.

In einer Studie über gekochten Reis konnten YAMAKURA et al. (2005) feststellen, dass ein Einweichen vor dem Kochen bei hohen Temperaturen (55 °C) oder auch eine Behandlung mit Hochdruck zu einer Reduzierung der Keimbelastung mit *B. cereus* führten. Die Hochdruckbehandlung ist laut dieser Studie eine gute Methode, gekochten Reis länger haltbar zu machen.

Eine Prävalenz von 40 % wies die *B. cereus*-Gruppe (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides*) bei Untersuchungen von 136 Reisproben auf, die von JANG et al. (2006) durchgeführt wurden. Davon machten *B. cereus*-Isolate 82 % der *B. cereus*-Gruppe aus. Der Nachweis erfolgte über die Koloniemorphologie und die Polymerasekettenreaktion (PCR). Dabei wurden die Gene von HBL, Nhe, BceT, EntFM und CytK bestimmt. Das Vorkommen von *Bacillus* spp. und die Möglichkeit der Toxinbildung durch *B. cereus* und *B. thuringiensis* sollten ihrer Meinung nach in Reis und Reisprodukten kontrolliert werden.

Eine andere Studie, die von IURLINA et al. (2006) in Argentinien durchgeführt wurde, beschäftigte sich mit der Verteilung von *Bacillus* spp. in 279 Proben, die aus den Lebensmittelgruppen Honig, Mehl, Käse, Gewürzen und frischen Sardellen gezogen wurden. In Mehl und Gewürzen wurden in allen untersuchten Proben *Bacillus* spp. gefunden, wobei in Roggenmehl eine größere Vielfalt der unterschiedlichen *Bacillus* spp. isoliert werden konnte. In Käse und Honig waren nur in etwa einem Drittel *Bacillus* spp. zu finden, aus frischen Sardellen konnten gar keine *Bacillus* spp. isoliert werden. In der speziellen Käsesorte „Port Salut Argentino - Käse“ konnte in über 50 % der Proben *B. cereus* nachgewiesen werden.

GÜVEN et al. (2006) untersuchten in der Türkei unter Verwendung von MYP (Mannitol egg yolk polymyxin)-Agar 100 Fleischproben und Fleischprodukte. In 22,4 % wurde *B. cereus* isoliert mit Keimgehalten von 5,0 bis $6,3 \times 10^4$ KbE/g, aber häufig waren hohe Keimgehalte von anderen Bakterien auf den Platten anzutreffen. Einzige Ausnahme waren zwei Proben von Soudjouck (eine türkische Wurstspezialität), die besonders hohe Werte ($1,4 \times 10^5$ KbE/g) von *B. cereus* aufwiesen und so nach Meinung der Autoren gesundheitsgefährdend wirken könnten.

Die Veränderung des Keimgehalts während der Produktion von Kartoffelbrei beschrieben RAJKOVIC et al. (2006). Innerhalb der ersten Produktionsschritte konnten *B. cereus*-Kontaminationen von $2,0 \times 10^2$ bis 10^4 KbE/g festgestellt werden. Nach dem Pasteurisierungsverfahren wurden nur noch ≤ 10 KbE/g gefunden, wobei ein Großteil der

Stämme nicht mehr in der Lage war, bei Temperaturen von 7 – 10 °C zu wachsen, hingegen die gefundenen *B. cereus*-Stämme vor der Pasteurisierung alle bei diesen Temperaturen wachsen konnten. Insgesamt konnte bei 30,4 % der Isolate Enterotoxinbildung nachgewiesen werden.

2.3.2 Vorkommen von emetischen *B. cereus*-Stämmen

TAYLOR & GILBERT isolierten 1975 aus 63 ungekochten Proben verschiedener Sorten von Langkornreis 66 *B. cereus*-Isolate, von denen fünf Emesis auslösten. Der Prozentsatz der Cereulid-bildenden Isolate lag somit bei 7,5 %. In neueren Untersuchungen (SCHULZ, 2004) traten prozentuale Anteile von 2 - 3 % auf.

Eine Lebensmittelvergiftung mit Nausea und Bauchkrämpfen, die nach dem Verzehr von Makkaroni mit Käse auftrat, wurde von HOLMES et al. (1981) beschrieben. In dem Gericht konnten große Mengen von *B. cereus* gefunden werden. Zuvor war die emetische Form nur im Zusammenhang mit kontaminiertem gekochtem Reis aufgetreten.

SHAHEEN et al. (2006) haben Kleinkindernahrung auf das Vorhandensein von Cereulid untersucht. Sie fanden heraus, dass, wenn mehr als 10^5 KBE/g Cereulid-produzierende *B. cereus* in Säuglingsnahrung vorlagen, die Konzentration von Cereulid in 100 ml Nahrung von 2 auf 200 µg innerhalb von 24 Stunden bei Zimmertemperatur anstieg. Die Ergebnisse konnten sowohl mit Flüssigkeitschromatographie und anschließender Massenspektrometrie (LC-MS) als auch im Spermienmotilitätstest bestätigt werden. Bei Kindernahrung, die Getreide- und Molkereiprodukte enthielten, war die Cereulid-Produktion am höchsten. Somit ist die Akkumulation von Cereulid zum einen von der Zusammensetzung des Produktes, zum anderen aber auch von der Behandlung des Lebensmittels abhängig. Eine weitere Beobachtung ergab nämlich, dass eine Verdünnung der Nahrung mit Wasser die Toxinproduktion erhöhen konnte (Angabe der Toxinmenge in µg/ Volumen) ebenso wie gleichmäßiges Schütteln die Bildung von Cereulid förderte. Die Temperatur spielte bei der vermehrten Produktion von Cereulid ebenfalls eine Rolle. Die Untersuchung zeigte, dass eine richtige Behandlung von Babynahrung, gerade bei Kontamination mit emetischen *B. cereus*-Stämmen, essentiell ist.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

100 bp-Leiter 0,1 - 1 kbp äquimolar (peqGold)
alkalische Phosphatase (Chemicon, AP 308A)
Ammoniumsulfat (Riedel de Häen, 31119)
Casein (Sigma-Aldrich GmbH, C-8654)
Caseinhydrolysat (Oxoid, L41)
Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, 11 644 807 001)
D(+)-Glukose Monohydrat (Riedel de Häen, 16301)
Dikaliumhydrogenphosphat (Riedel de Häen, 04248)
dNTP Set (Hochkonz.) 100 µmol/dNTP (ABgene[®], AB-0315)
EDTA (Sigma-Aldrich GmbH, E 1644)
Ethanol, absolut (Riedel de Häen, 32205)
Ethanol, vergällt (Merck, 1.00974)
Ethidiumbromidlösung 1 % (Serva, 21251)
Fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom KG, S 0115)
Gel Loading Solution (Sigma, G2526-5ML)
H₂SO₄ (Fluka, 84720)
Hefeextrakt (Oxoid, L21)
Humanes Serumalbumin HSA (Sigma-Aldrich GmbH, A-1653)
Kaliumhydrogenphosphat (Riedel de Häen, 30407)
L-Glutamin (Sigma-Aldrich GmbH, G 5763)
Lugols Lösung (Merck, 9261)
Magnesiumsulfat (Fluka, 63138)
MEM-EARLE Zellkulturmedium (Biochrom AG, FG 0325)
Methanol (Fluka, 65541)
Midi ABgarose (ABgene[®], AG-0300/B)
Natriumchlorid (Riedel de Häen, 31434)
Natriumpyruvat-Lösung, 100 mmol/l (Biochrom AG, L 0473)
NBT/BCIP-Tabletten (Roche, 1697471)

Penicillin/Streptomycin, 10 000 U/ml (Biochrom AG, A 2212)
Polymyxin B sulfate (Sigma-Aldrich, P-1004)
PrepMan™ Ultra (P/N 4318930)
Primer1 (EM1F) in Auftragssynthese hergestellt von der MWG-Biotech AG, Ebersberg
Primer2 (EM1R) in Auftragssynthese hergestellt von der MWG-Biotech AG, Ebersberg
Ringerlösung-Tabletten (Oxoid, BR 0052 G)
Standard-II Nähragar (Merck, 7883)
Stärke, löslich reinst (Merk, 1252)
Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich, T 2885-5G)
Thermoprime Plus DNA Polymerase mit 10x Puffer und MgCl₂ (ABgene®, AB-0301/B)
tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck 1.06448)
TRIZMA® (Sigma-Aldrich GmbH, T 1503)
Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich GmbH, T 3924)
Tween 20 (Riedel de Häen, 63158)
Valinomycin (Sigma-Aldrich GmbH, V-0627)

3.1.2 Mikroorganismen und Zellkultur

3.1.2.1 Bakterien Stämme bzw. Isolate

Referenzstämme aus Stammsammlungen

- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig:
 - DSM 4312 (emetischer Referenzstamm)
 - DSM 4384 (HBL Referenzstamm)
- GRANUM et al. (1996):
 - NHV 0075/95 (Nhe Referenzstamm)
- Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch, München:
 - MHI 165 (emetischer Referenzstamm)

Bacillus cereus Isolate

- Lebensmittelisolate, die im Rahmen dieser Studie aus Reis, Nudeln, Babynahrung und Convenience Food gewonnen wurden (n = 201)

3.1.2.2 Zelllinien

HEp-2 Zellen: Humane Larynxkarzinomzellen (Bio Whittaker, Katalognr. 71-136B)

3.1.3 Nährmedien

Flüssige Anreicherungsmedien für *B. cereus*

- Caseinhydrolysat-Bouillon mit 1 % Glukosezusatz (CGY)
modifiziert nach BEECHER & WONG (1994):
2 % Caseinhydrolysat
0,6 % Hefeextrakt
0,2 % Ammoniumsulfat
1,4 % Dikaliumhydrogenphosphat
0,6 % Kaliumhydrogenphosphat
0,1 % Natriumcitrat
0,2 % Magnesiumsulfat
sowie 1 % Glukose nach dem Autoklavieren; alle Angaben in g/v
- Trypton-Soja-Polymyxin-Bouillon (TSPB):
17 % Caseinpepton, tryptisch verdaut (Trypton)
3 % Sojapepton
5 % Natriumchlorid
2,5 % Glukose
2,5 % Dikaliumhydrogenphosphat
sowie 0,05 % Polymyxin-B-Sulfat nach dem Autoklavieren; alle Angaben in g/v
- Magermilch gepulvert (SMM) (Oxoid, L 31)
- Hirn-Herz-Bouillon (BHI) (Merck, 10493)

Feste Nährmedien für *B. cereus*

- Columbia Agar mit Schafblut (Oxoid, PB 5039 A)
- PEMBA: *Bacillus cereus* Agar base (Oxoid, CM 617) mit Supplement (Oxoid, SR 099 E) und Eigelb (Oxoid SR 047 C)
- PEMBA-Agar (Oxoid, PO 5048A)
- Standard II Nähragar mit Zusatz von 1 % (g/v) Stärke

3.1.4 Puffer und Lösungen

Lösungen für die Zellkultur

- Glutamin-Lösung: 0,2 mol/l
- Mercaptoethanol-Lösung: 0,005 mol/l
- HT-Supplement-Lösung: Hypoxanthin 0,001 mol/l
Thymidin 0,0016 mol/l

Enzymimmuntests

- Bicarbonatpuffer (0,05 mol/l, pH 9,6)
- Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):
0,01 mol/l Phosphatpuffer (pH 7,3) mit Zusatz von 0,12 mol/l NaCl
- 3 % ige Casein/ PBS-Lösung (g/v)
- 3 % ige HSA/ PBS-Lösung (g/v)
- Waschlösung: 0,15 mol/l NaCl-Lösung mit Zusatz von 0,025 % Tween 20
- Citratpuffer (0,21 mol/l, pH 3,95) mit Zusatz von 3,15 mmol/l
Wasserstoffperoxid
- Tetramethylbenzidinlösung :
1 mmol/l 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin in 45 ml Methanol und 5 ml Aceton
- Substrat/Chromogenlösung nach GALLATI & PRACHT (1985):
20 Teile Citratpuffer und 1 Teil Tetramethylbenzidinlösung

PCR/ Gelelektrophorese

- Tris-Acetat-Puffer 0,04 mol/l, pH 8,2 mit Zusatz von 1 mmol/l EDTA

Immunoblot

- Tris-buffered saline (TBS):
0,05 mol/l Tris/ HCl (pH 7,5) mit Zusatz von 0,15 mol/l NaCl
- TBS-Caseinat (10 g/l)

3.1.5 Immunreagenzien

Anti-Maus-IgG-alkalische Phosphatase (Chemicon, AP308A)

Kaninchen-Anti-Maus-Ig-HRP (Dako, P 0161)

Zum Nachweis der *B. cereus* Enterotoxin-Komponenten standen folgende monoklonale Antikörper (Tab. 2) zur Verfügung, die alle im Lauf der letzten Jahre am Lehrstuhl hergestellt worden waren (DIETRICH et al., 1999, 2005):

Tabelle 2: Monoklonale Antikörper (mAk; DIETRICH et al., 1999, 2005)

| Toxinkomplex | Exoprotein bzw. Antigen | monoklonaler Antikörper |
|--------------|----------------------------|-------------------------|
| HBL | L ₂ -Komponente | 1A12 bzw. 8B12 |
| Nhe | Nhe A-Komponente | 1A8 |
| | Nhe B-Komponente | 1E11 |

3.1.6 Sonstige Materialien

Verbrauchsmaterialien

Cryo-Tubes, 1,8 ml (Nunc GmbH, 363401)

Sterilfilter Millex GV, 0,22 µm (Millipore, SLGV 025 LS)

Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf, 3810)

Mikrotiterplatten, 96 Loch, Flachboden (Nunc GmbH, 167008)
Zellkulturflaschen aus Kunststoff, 80 cm² (Nunc GmbH, 156502)
Zählkammer nach Neubauer
Protran[®] Nitrocellulose - BA83 (Schleicher & Schuell, 401391)
Filterbeutel BagPage[®] (Bagsystem[®])
Safe-Lock Tubes 1,5 ml (Eppendorf AG, 0030 120.086)
Safe Guard Filterspitzen 0,5 - 10 µl Eppendorf (PEQLAB, 81-1011)
Safe Guard Filterspitzen 1 - 100 µl Universal (PEQLAB, 81-1030)
Safe Guard Filterspitzen 100 - 1000 µl Universal (PEQLAB, 81-1050)
Thermo-Tubes 0,2 ml (ABgene[®], AB-0337)
Thermo-Tubes 0,2 ml (ABgene[®], AB-0266)
Greiner Probenröhrchen 50 ml (Greiner, 227261)
Kunststoff-Petrischalen mit Nocken, steril (Waldeck)
Pasteur-Pipetten, Glas 150 mm
Pasteur-Pipetten, Glas 230 mm
Glasspatel
Pipettenspitzen 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl

3.1.7 Geräte

Akku-Pipettierhilfe (Hirschmann Laborgeräte)
Autoklav (Webeco GmbH)
Brutschrank, aerob (Mettler)
Brutschrank, CO₂-Atmosphäre, 37 °C (Heraeus)
Dispenser mit 0,7 ml Spitzen (LKB Instrument GmbH, Bromma)
Dispenser mit 1,5 ml-Spitzen (LKB Instrument GmbH, Bromma)
Elektrophoresekammern (Biometra)
Eppendorf Varipette 4810: 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 50 - 250 µl
Geldokumentation Video 8-Entry (Biostep)
Heizblock (Thermomixer Eppendorf)
Homogenisator (Stomacher[®])
Kühlzentrifuge Minifuge GL (Heraeus)
Kühlzentrifuge Suprafuge 22 (Heraeus)

Kühlzentrifuge, Minifuge RF (Heraeus)
Laminar-Flow Gelaire BSB 4A (Flow Laboratories)
Mikrotiterplattenlesegerät, SLT-ATC (SLT-Labinstruments)
pH-Messgerät, pH 537 (Indolab WTW GmbH)
Schüttelwasserbad, GFL 1083 (Ges. für Labortechnik)
Spannungsgeber (Pharmacia Biotech)
Taumelgerät (Heidolph GmbH)
Thermocycler PCR Express (Hybaid)
Titertek Plus (12-Kanal-Pipette) 50 - 200 µl
Variable Achtkanalpipette 50 - 250 µl (Eppendorf)
Variable Pipetten 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl (Eppendorf)
Variable Zwölfkanalpipette 30 - 300 µl (Eppendorf)
Variable Zwölfkanalpipette 50 - 250 µl (Titerek)
Varioklav, Dampfsterilisator (H+P Labortechnik GmbH)
Vortex (Snijders, press-to-mix, 34524)
Waage (Sartorius Excellence)
Wasserstrahlpumpe
Zentrifuge (Biofuge pico)

3.2 Allgemeine Methodik

Die zu untersuchenden Proben wurden in handelsüblichen Verpackungen im Einzelhandel erworben und über die folgenden Verfahren auf deren *B. cereus* Kontamination überprüft.

3.2.1 Keimzahlbestimmung der Proben mit Oberflächenverfahren (Spatelverfahren)

Nach Öffnen der Verpackung wurden 10 g des Probenmaterials unter aseptischen Kautelen in einem Filterbeutel eingewogen. Eine Zugabe von 90 ml steriler Ringerlösung zur Verdünnung der Probe folgte dem Einwiegen. Um eine bessere Homogenisierung im Stomacher[®] zu erreichen, wurden Trockenprodukte (Nudeln, Reis) vor der Zerkleinerung 20 Minuten in der Ringerlösung eingeweicht. Ein ml dieser Anschüttelung wurde mit Hilfe einer sterilen Pipette

aus dem Filterbeutel auf zwei Schafblutagarplatten verteilt und anschließend mit einem sterilen Glasspatel ausgespatelt. Anschließend wurden 0,1 ml aus der Anschüttelung in der angegebenen Weise auf einer Blutplatte ausgespatelt. Ein Ansatz weiterer Verdünnungsstufen war aufgrund der geringen Keimbelastung nicht nötig. Nach 24 Stunden bei 30 °C Bebrütung der Platten im Brutschrank wurden zunächst alle Kolonien ausgezählt und anschließend charakteristische *B. cereus*-Kolonien getrennt erfasst.

3.2.2 Anreicherung von *B. cereus* in TSPB nach ISO 21871:2006 (Detection method)

Um auch Kontaminationen unter 10 *B. cereus*/g erfassen zu können, wurde die Lebensmittelprobe in TSPB (Tryptone Soya polymyxin broth) angereichert. Nach einer Einwaage von 10 g Probenmaterial mit 90 ml TSB (Tryptone Soya Broth) und 9000 IE Polymyxin B in einem Erlenmeyerkolben wurde diese 48 h bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

Von dem bebrüteten Medium wurden 2 ml für die Untersuchung im PCR-Verfahren unter aseptischen Kautelen in Cryoröhrchen abgefüllt und bei – 18 °C eingefroren, außerdem wurde das Medium im 3-Ösenausstrich auf Schafblutagar und PEMBA-Agar (Polymyxin pyruvate egg yolk mannitol bromothymol blue agar) ausgestrichen. Eine Bebrütung der ausgestrichenen Nährbodenplatten im Brutschrank bei 30 °C für weitere 24 Stunden folgte.

In abschließender Beurteilung der Blutplatten wurde das Hämolyse-Verhalten der *B. cereus*-Kolonien beschrieben. Hierbei konnte zwischen einer diskontinuierlichen Hämolyse, die nach bisherigen Untersuchungen nur bei HBL-Produzenten vorkommt, und einer vollständigen Hämolyse, bei der über die Art der Toxinproduktion keine Aussage gemacht werden kann, unterschieden werden.

Die PEMBA-Platten wurden nach ihrem Farbumschlag beurteilt. So sind eine Verfärbung von gelb nach blau sowie die Bildung eines Eigelbhofes um die Kolonie charakteristische Merkmale für *B. cereus*.

Konnten aufgrund von Mischkulturen keine exakten Angaben gemacht werden, wurden die *B. cereus*-Isolate mehrmals auf Schafblutagar überimpft, um eine Reinkultur zu erhalten.

3.2.3 Stärkehydrolyse-Test

Die erhaltenen *B. cereus*-Lebensmittelisolate wurden mit Hilfe des Stärkehydrolyse-Tests einer ersten Charakterisierung unterzogen, da sich in den bisherigen Untersuchungen zeigte, dass nur Stärke-negative Isolate in der Lage sind emetisches Toxin zu produzieren (SHINAGAWA et al., 1985; NISHIKAWA, 1996; AGATA et al., 1996 und PIRTTIJÄRVI et al., 1999). Zur Testdurchführung wurden die *B. cereus*-Stämme auf Standard II Nähragar (mit Zusatz von 1 % Stärke) ausgestrichen und 24 h bei 30 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde mit einer Pipette eine 1:5 verdünnte Lugol'sche Lösung auf die Einzelkolonien getropft. Wenn die Kolonien nicht in der Lage waren Stärke abzubauen, also Stärke-negativ waren, verfärbte sich der Nährboden direkt um die Kolonie herum tief blau. Bei einer Stärke-positiven Reaktion konnte ein deutlicher Hof um die Einzelkolonie sichtbar gemacht werden und eine blaue Verfärbung des Nährbodens fand nicht statt.

3.2.4 Anzucht von *B. cereus* in CGY-Bouillon

Zur Produktion der Enterotoxine wurden die Kolonien der *B. cereus*-Isolate, die aus den mit TSBP angereicherten Proben gewonnen wurden, standardmäßig in CGY-Bouillon angereichert. Eine Voranreicherung mit 20 ml Medium wurde hierzu hergestellt und mit *B. cereus*-Keimmaterial in Form einer Kolonie beimpft, um dann für 17 Stunden bei 32 °C im Schüttelwasserbad (84 Zyklen/ min) zu inkubieren. Daraufhin wurden Erlenmeyerkolben (200 ml), in denen 20 ml CGY-Bouillon vorgelegt waren, im Verhältnis 1:100 mit der Voranreicherung beimpft und erneut für 6 Stunden bei 32 °C im Schüttelwasserbad bebrütet. Eine Sterilfiltration des Kulturüberstandes folgte dem Abzentrifugieren des Keimmaterials. Dem filtrierten Kulturüberstand wurde EDTA (1 mmol/l) zugesetzt, anschließend portioniert und bei – 20 °C eingefroren.

3.2.5 Enzymimmunoassay (EIA)

Es wurden zwei unterschiedliche Varianten gewählt, der indirekte EIA sowie der Sandwich-EIA, um *B. cereus* Enterotoxin-Komponenten in Kulturüberständen oder sonstigen Präparationen detektieren zu können.

3.2.5.1 Indirekter Enzymimmunassay

Der indirekte EIA diente zum Nachweis der Einzelkomponente Nhe B des Nhe-Enterotoxinkomplexes (DIETRICH et al., 2005). Dazu wurden Mikrotiterplatten mit *B. cereus*-Kulturüberständen mit 1:2 Verdünnungsreihen in Bicarbonatpuffer beschichtet (100 µl/ Kavität) und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) in einer feuchten Kammer gelagert. Freie Bindungsstellen wurden nach dem Ausschlagen der Platten mit 3 % Casein/ PBS (150 µl/ Kavität) 45 Minuten bei RT blockiert. Nach einem Waschschrift wurde der spezifische monoklonale Antikörper (mAk) 1E11 (DIETRICH et al., 2005) in einer Konzentration von 1 µg/ml PBS (100 µl/ Kavität) zugegeben und für eine Stunde inkubiert. Abermals wurden die Platten gewaschen bevor das Kaninchen-Anti-Maus-Ig-Peroxidase-Konjugat (1:3000 in 1 % Casein/ PBS) auf die Platte gegeben (100 µl/ Kavität) und erneut eine Stunde bei RT inkubiert wurde. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Substrat (10 ml H₂O₂ und 0,5 ml TMB) zugegeben (100 µl/ Kavität), welches nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten mit 1 molarer Schwefelsäure (100 µl/ Kavität) gestoppt wurde. Die Bestimmung der Extinktion erfolgte photometrisch bei 450 nm mittels Mikrotiterplatten-Lesegerät.

3.2.5.2 Sandwich-Enzymimmunassay

Den Nachweis der L₂-Komponente des HBL konnte mit Hilfe des Sandwich-EIA erbracht werden (FELLA, 1999). Hierbei wurden Mikrotiterplatten mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper (1A12) in Bicarbonatpuffer (100 µl/ Kavität) über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet. Der mAK 1A12 liegt in Bicarbonat bei einer Konzentration von 10 µg/ml vor. Nach dem Ausschlagen der Platte wurden die noch freien Bindungsstellen mit 3 % iger Casein/ PBS-Lösung (150 µl/ Kavität) 45 Minuten lang bei Raumtemperatur abgesättigt. Dem anschließenden Waschvorgang folgte das Auftragen der Proben (100 µl/ Kavität) in 1:2 Verdünnungsreihen in PBS (mit einem Zusatz von 0,5 % Tween 20). Nach Inkubation von einer Stunde wurden die Proben mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Platte viermal gewaschen. Das entsprechende Antikörper-Enzymkonjugat (1:1000 in 1 % Casein/ PBS), ein durch Perjodat-Methode peroxidase markierter mAK (8B12), wird als Nachweisantikörper zugegeben (100 µl/ Kavität). Nach einstündiger Inkubation und erneutem Waschschrift erfolgte die Zugabe der Substratlösung (100 µl/ Kavität), welche auch aus 10 ml H₂O₂ und 0,5 ml TMB hergestellt wurde. Ein Abbruch der Farbreaktion nach 20 Minuten

erfolgte mit 1 molarer Schwefelsäure (100 µl/ Kavität), bevor die Extinktion photometrisch bei 450 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät ermittelt wurde.

3.2.6 PCR

Zum Nachweis des emetischen Toxins wurden alle Stärke-negativen *B. cereus*-Isolate in die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt. Der PCR-Nachweis emetischer *Bacillus cereus*-Stämme erfolgte unter Verwendung einer Methode von EHLING-SCHULZ et al. (2004). Diese Methode weist das Strukturgen für eine nichtribosomale Peptidsynthase nach, die an der Synthese des Cereulids beteiligt ist und spezifisch für emetische *B. cereus*-Stämme ist.

3.2.6.1 DNA-Extraktion

Zur Lyse der Bakterienzellwände und Entfernung störender und inhibierender Proteinbestandteile wurde vor der PCR eine DNA-Extraktion mit dem Prep Man™ Ultra-Reagenz durchgeführt. Hierbei wurden die eingefrorenen TSBP Anreicherungen aufgetaut, 1 ml der Probe in 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt und drei Minuten bei 13 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig, ohne das Pellet zu zerstören abpipettiert und 200 µl Prep Man™ Ultra-Reagenz zu jeder Probe hinzugefügt. Die Eppendorf Gefäße wurden nun gevortext, bis das Pellet sich vollständig gelöst hatte, und anschließend 10 Minuten im Heizblock bei 99 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur und erneutem dreiminütigem Abzentrifugieren bei 13 000 x g wurden 50 µl des Überstandes in neue 2 ml Gefäße pipettiert und der Rest verworfen. Die Überstände, die die DNA-Extrakte enthielten, wurden für die PCR-Untersuchungen verwendet.

3.2.6.2 Durchführung der PCR

Die PCR-Untersuchungen wurden mit einem Gesamtvolumen von 50 µl pro Ansatz durchgeführt, in denen 2 µl DNA-Extrakte enthalten waren.

Der Mastermix setzte sich pro Ansatz aus folgenden Reagenzien zusammen:

5 µl 10 x-PCR-Puffer,
3 µl MgCl₂ (25 mM),
1 µl dNTP (200 nM),
2,5 µl Primer EM1F (10 µM),
2,5 µl Primer EM1R (10 µM),
0,25 µl Polymerase (5 U/µl) und
33,75 µl steriles A. dest.

Nach Durchmischen der Reagenzien wurden aus dem fertigen Mastermix nun jeweils 48 µl auf sterile PCR-Gefäße verteilt und anschließend 2 µl der DNA-Extrakte dazupipettiert. Bei allen Untersuchungen wurde eine negative Kontrolle (A. dest.) und eine positive Kontrolle (DNA-Extrakt des Referenzstammes MHI 165) mitgeführt.

Die thermozyklische Reaktion erfolgte nach folgendem Protokoll:

Die initiale Denaturierung fand bei 94 °C für 5 min statt.

Es folgten 30 Zyklen mit jeweils

1. Denaturierung bei 94 °C für 30 sec
2. Annealing bei 60 °C für 30 sec
3. Elongation bei 72 °C für 60 sec

Abschließend wurde eine finale Extension für 5 min bei 72 °C durchgeführt.

3.2.6.3 Gelelektrophorese

Nach Ablauf der PCR wurden die Amplifikationsprodukte mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt.

Dazu erfolgte als erstes die Herstellung eines 2% igen Agarosegels. Die Agarose in Pulverform (0,8 g) wurde mit TAE-Puffer (40 ml) kurz aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst und die Flüssigkeit klar war. Nach 10-minütiger Abkühlung konnte die geschmolzene Agarose in die Gelkammer gegossen werden und ein Kamm (der Probenanzahl entsprechend) wurde ca. 1 cm vom Rand entfernt in das Gel gesteckt, um Taschen für die flüssigen PCR-Ansätze zu erhalten. Nach dem Erstarren des Gels konnte die Gelkammer in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Kamm entfernt werden.

Die Proben wurden nun mit 5 µl/ Tube Gelladungspuffer versetzt.

Es folgte die Bestückung der ersten Tasche des Gels mit 5 µl DNA-Längenstandard. In die anderen Taschen wurden jeweils 7 µl der PCR-Ansätze pipettiert und anschließend konnten die Amplifikationsprodukte bei Spannungen von 125 Volt und 400 mA für 45 min aufgetrennt werden.

Das fertige Gel wurde danach in Ethidiumbromidlösung 15 Minuten angefärbt und anschließend 10 Minuten in ein Wasserbad gelegt. Die aufgetrennten PCR-Banden im Gel konnten dadurch im Transilluminator unter UV-Licht sichtbar gemacht und ausgewertet werden.

3.2.7 Zytotoxizitätstest für emetisches Toxin

Die *B. cereus*-Isolate, deren PCR-Ergebnis positiv ausgefallen war und somit in der Lage waren emetisches Toxin zu produzieren, wurden in einen auf HEp-2 Zellen basierenden Zytotoxizitätstest eingesetzt, der am Lehrstuhl speziell für emetische Toxinbildner entwickelt worden war (SCHULZ, 2004).

3.2.7.1 Anzucht in Magermilch (SMM)

Die *B. cereus*-Isolate wurden vor dem Einsetzen in die Zellkultur zur Toxinproduktion in Magermilch angereichert. Dazu wurden 2 g Magermilchpulver in einem sterilen Erlenmeyerkolben abgewogen und mit 20 ml sterilem destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde die Magermilch mit einer Öse Isolat beimpft. Die Ansätze wurden 18 Stunden über Nacht bei 32 °C im Schüttelwasserbad inkubiert und am nächsten Morgen autoklaviert.

3.2.7.2 Durchführung des Zytotoxizitätstest

Es wurden als erstes die HEp-2 Zellen in 40 ml MEM-Medium unter Zusatz von 1 % (v/v) fetalem Kälberserum, 2 % (v/v) L-Glutamin-Lösung (200 mmol/l), 1 % (v/v) Natriumpyruvat (100 mmol/l) und 0,2 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml) in Zellkulturflaschen mit 80 cm² Fläche kultiviert. Die Zellen wurden 1:2 geteilt und bei 37 °C und 7 % CO₂ -Atmosphäre für zwei Tage inkubiert, bis sich ein dichter Zellrasen ausgebildet

hatte. Die Zellen wurden mit 40 ml PBS gewaschen, nachdem das MEM-Medium verworfen worden war, und mit 5 ml Trypsin-EDTA für 5 min inkubiert, um die Zellen vollständig vom Boden der Flasche abzulösen. Die so gewonnene Zellsuspension wurde mit weiteren 10 ml MEM-Medium verdünnt und bei 135 x g für 7 Minuten zentrifugiert, um anschließend zur Bestimmung der Zellzahl in 5 ml MEM-Medium aufgenommen zu werden.

Nun wurde in einer 96-Loch-Zellkulturplatte eine log-2 Verdünnungsreihe mit autoklavierten SMM-Material der *B. cereus*-Isolate und MEM-EARLE-Medium unter Zusatz von 2 % Ethanol erstellt. Dazu wurde die Mikrotiterplatte mit 50 µl Medium/ Kavität beschickt, nur in die erste Kavität wurden 90 µl pipettiert, um anschließend mit 10 µl der Probe eine 1:10 Verdünnung zu erlangen. Die äußeren Reihen A und H wurden frei gelassen, um Randeffekte zu vermeiden. Von der ersten Kavität ausgehend, und so auch von einer 1:10 Vorverdünnung, wurde nun mit einer 8-Kanalpipette eine log-2 Verdünnungsreihe (bis Reihe 10) hergestellt. Die Reihen 11 und 12 enthielten keine Probe und wurden als Zellkontrolle verwendet. Alle Proben wurden im Doppelansatz getestet. Anschließend wurden zu den Ansätzen 150 µl Zellsuspension (10^5 HEp-2 Zellen/ Kavität) zugegeben und die Mikrotiterplatte bei 37 °C in 7 % CO₂ für 48 Stunden inkubiert.

Da das Antibiotikum Valinomycin bekanntermaßen (AGATA et al., 1994) ähnliche Veränderungen an HEp-2 Zellen hervorruft, konnte diese Substanz als Standard und als positive Kontrolle genutzt werden oder es wurde der positive Stamm MHI 165 verwendet.

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurden aus jeder Kavität 100 µl Medium entnommen, WST-Reagenz (10 µl/ Kavität) zugegeben und erneut für 30 Minuten bei 37 °C in 7 % CO₂ inkubiert. Da das WST-Reagenz von noch stoffwechselaktiven Zellen in den Farbstoff Formazan umgesetzt wird, konnte abschließend die Farbintensität photometrisch im ELISA-Autoreader bei 450 nm gemessen werden. Als Zytotoxizitätstiter wurde diejenige Verdünnungsstufe der Kulturüberstände definiert, die im Vergleich zur Zellkontrolle zu einer 50 % igen Reduktion der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität in den Zellen führte. Zytotoxische Einheiten (CTU) entsprechen dem reziproken Wert des Zytotoxizitätstiters.

3.3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 203 Lebensmittelprodukte untersucht, die in Stichproben aus dem Einzelhandel in handelsüblichen Verpackungen erworben wurden. Hierbei wurde das Hauptaugenmerk auf Nudeln, Reis, Babynahrung und Convenience Food gelegt. Die Proben wurden zunächst ungekocht untersucht.

3.3.1 Keimzahlbestimmung auf Schafblutagar

3.3.1.1 Anzahl aller auf Schafblutagar gewachsenen Kolonien

Die Keimzahlbestimmung auf Schafblutagar ergab einen ersten Überblick über die Belastung der untersuchten Lebensmittel (Abb. 2). Die Auszählung aller Kolonien ergab, dass 58 % (n = 118) der untersuchten Proben eine Keimzahl von unter 100 KbE/g Lebensmittel aufwiesen und 29 % (n = 59) sogar eine Keimbelastung unter 10 KbE/g Lebensmittel hatten. Lediglich 8 % (n = 16) hatten einen Keimgehalt über 10^5 KbE/g.

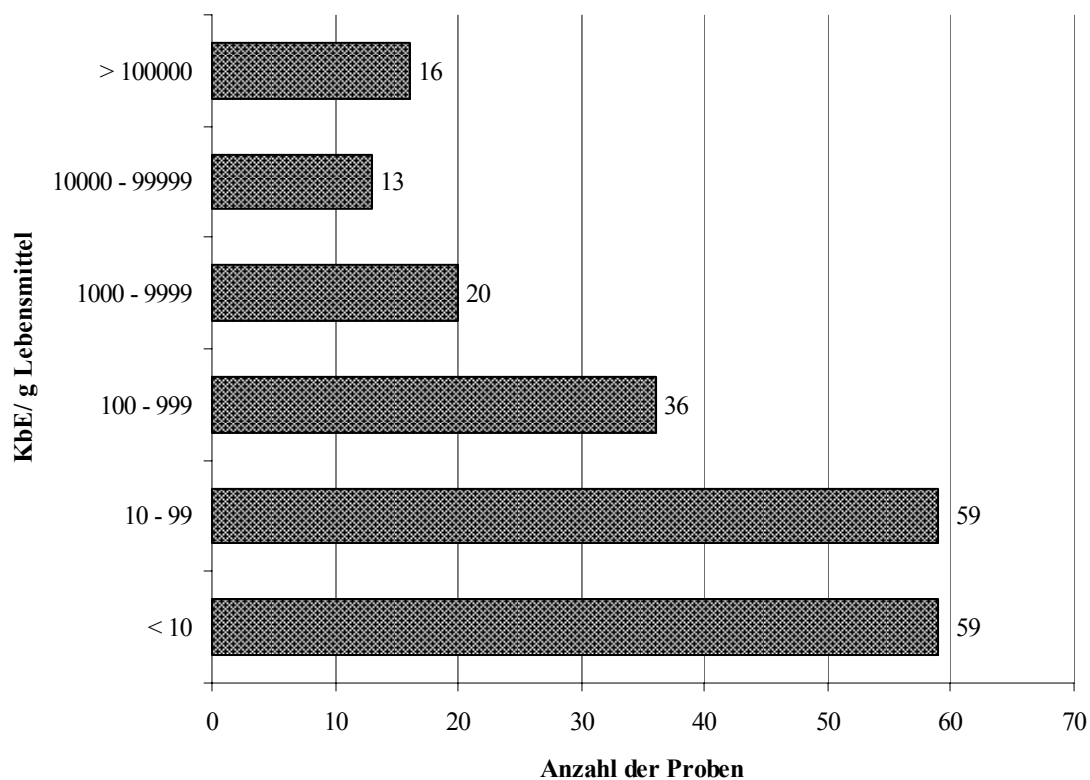


Abbildung 2: Keimzahl der untersuchten Proben (Direktausstrich auf Schafblutagar)

Eine Aufschlüsselung der Produktgruppen aus denen sich die unterschiedlichen Keimzahlmengen zusammensetzten, ist in Abbildung 3 beschrieben. Die Aufsplitterung macht deutlich, dass die Höhe der Keimzahl stark abhängig von den Produktgruppen war. So konnten bei 49 % (n = 40) der Reisproben Keimzahlen von $> 10^3$ nachgewiesen werden. Aus den anderen Produktgruppen waren nur vereinzelt Proben zu finden, die eine höhere Keimbelastung als 10^3 aufwiesen. Im Gegensatz dazu hatten 59 % (n = 32) der Proben aus der Produktgruppe „Babynahrung“ einen Wert unter 10 KbE/g. Bei Nudeln war eine Keimzahl zwischen 10 und 99 am häufigsten (41 %, n = 20) anzutreffen. In der Produktgruppe „Convenience Food“ waren keine deutlichen Tendenzen zu erkennen, hier verteilten sich die Produkte relativ gleichmäßig (ca. 30 %) auf die verschiedenen Keimzahlbereiche bis 10^3 .

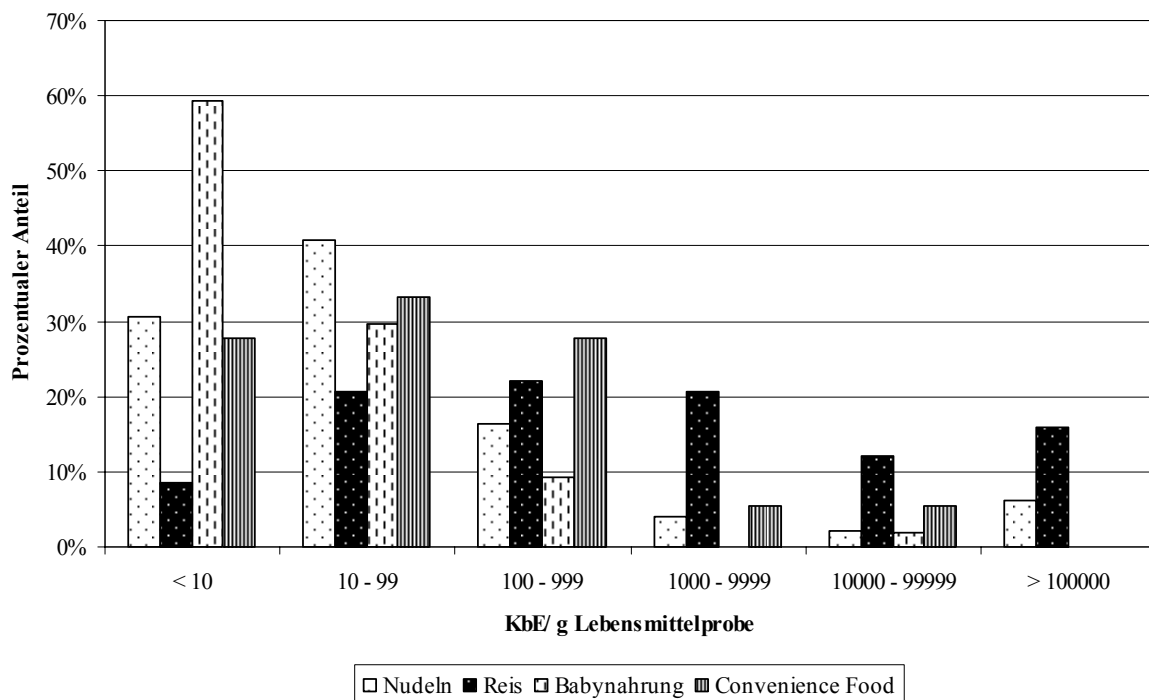


Abbildung 3: Differenzierte Darstellung der Keimzahlen der untersuchten Proben (Direktausstrich auf Schafblutagar)

3.3.1.2 Anzahl der *B. cereus*-Kolonien nach Keimzahlbestimmung auf Schafblutagar

Die Häufigkeit von *B. cereus*-Kolonien, die im Rahmen der Keimzahlbestimmung auf Schafblutagar identifiziert werden konnten, ist in folgender Tabelle 3 dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass die *B. cereus*-Mengen sehr gering waren. Nur acht Proben (4 %) hatten eine

Konzentration ≥ 100 KbE/g, wovon fünf einen genauen Wert von 100 aufwiesen und der höchste Wert bei 300 *B. cereus* pro Gramm Lebensmittel lag. In 33 Fällen (16 %) traten Konzentrationen zwischen 10 – 99 KbE/g auf und bei 80 % (n = 162) der 203 untersuchten Proben befand sich die Keimzahl unter 10 KbE/g. Aufgrund dieser geringen Keimzahlen konnte eine Detektion mit *B. cereus* häufig erst nach TSBP-Anreicherung nachgewiesen werden (Abb. 5).

Tabelle 3: Anzahl der Proben in den verschiedenen *B. cereus*-Konzentrationsbereichen ohne TSBP-Anreicherung

| Lebensmittel | < 10 | 10 – 99 | ≥ 100 |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | <i>B. cereus</i> /g | <i>B. cereus</i> /g | <i>B. cereus</i> /g |
| Nudeln | 40 | 8 | 1 |
| Reis | 57 | 18 | 7 |
| Babynahrung | 52 | 2 | 0 |
| Convenience Food | 13 | 5 | 0 |
| Gesamtanzahl | 162 | 33 | 8 |

Die acht Proben mit jeweils ≥ 100 *B. cereus* KbE/g setzten sich aus sieben Reissorten (9 % der gesamten Reisproben) und einer Nudelsorte (Mendake-Nudeln mit Spinat) zusammen, wobei die Mendake-Nudeln mit 100 KbE/g an der unteren Grenze lagen. In den Produktgruppen „Babynahrung“ und „Convenience Food“ erreichte der *B. cereus*-Gehalt in keinem Fall die Keimmenge von 100 KbE/g oder mehr (Abb. 4). Auch konnten in nur 4 % (n = 2) der Babynahrungsprodukte *B. cereus* in Konzentrationen zwischen 10 bis 99 KbE/g identifiziert werden. Die restlichen 96 % wiesen einen Keimgehalt unter 10 auf. Anders war es beim Reis, bei dem 70 % (n = 57) einen *B. cereus*-Gehalt von < 10 aufzeigten. Convenience Food hatte mit 72 % (n = 13) einen ähnlichen Prozentsatz wie Reis, doch die restlichen 28 % (n = 5) verteilten sich auf *B. cereus*-Gehalte zwischen 10 und 99 KbE/g. In der Gruppe „Nudeln“ konnten 82 % (n = 40) der Proben eine Konzentration < 10 KbE/g aufweisen und lagen somit im Mittelfeld der untersuchten Produktgruppen, 16 % der Nudelproben hatten einen *B. cereus*-Gehalt zwischen 10 und 99 KbE/g.

Die prozentuale Verteilung der Produktgruppen innerhalb der verschiedenen *B. cereus*-Konzentrationen wird in Abbildung 4 dargestellt.

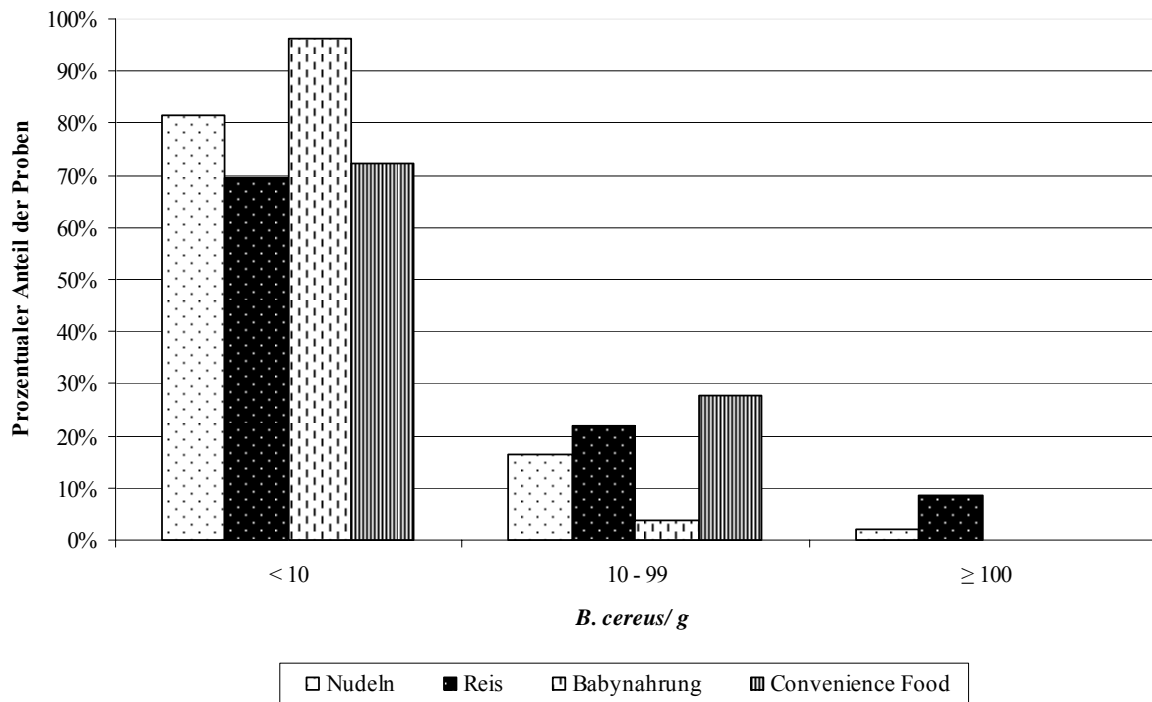


Abbildung 4: Vergleichende Darstellung der prozentualen Anteile von *B. cereus*-Mengen, die in den verschiedenen Lebensmittelproben ohne TSBP-Anreicherung gefunden wurden

3.3.2 *B. cereus* Detektion nach TSBP-Anreicherung

Um auch geringere *B. cereus*-Kontaminationen als 10 KBE/g nachweisen zu können, wurden alle Proben noch einmal nach ISO 21871:2006 angereichert. Ein Vorkommen von *B. cereus* konnte danach in 155 Proben (76 %) nachgewiesen werden, aus denen insgesamt 201 verschiedene *B. cereus*-Isolate gewonnen wurden. Aus 24 % (n = 48) der angereicherten Proben war ein Nachweis von *B. cereus* nicht möglich (Tab. 4). Die Häufigkeit, mit der *B. cereus* in den Produktgruppen Nudeln (92 %, n = 45) und Reis (88 %, n = 72) nach Anreicherung angetroffen wurde, liegt bei ca. 90 %. Bei den Produktgruppen Babynahrung (52 %, n = 28) und Convenience Food (56 %, n = 10) konnte eine Kontaminationsrate mit *Bacillus cereus* von ca. 50 % festgestellt werden (Abb. 5).

Tabelle 4: Anzahl der Proben, die nach TSBP-Anreicherung *B. cereus* positiv bzw. negativ waren

| Lebensmittel | <i>B. cereus</i> positiv | <i>B. cereus</i> negativ |
|---------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Nudeln | 45 | 4 |
| Reis | 72 | 10 |
| Babynahrung | 28 | 26 |
| Convenience Food | 10 | 8 |
| Gesamtanzahl | 155 | 48 |

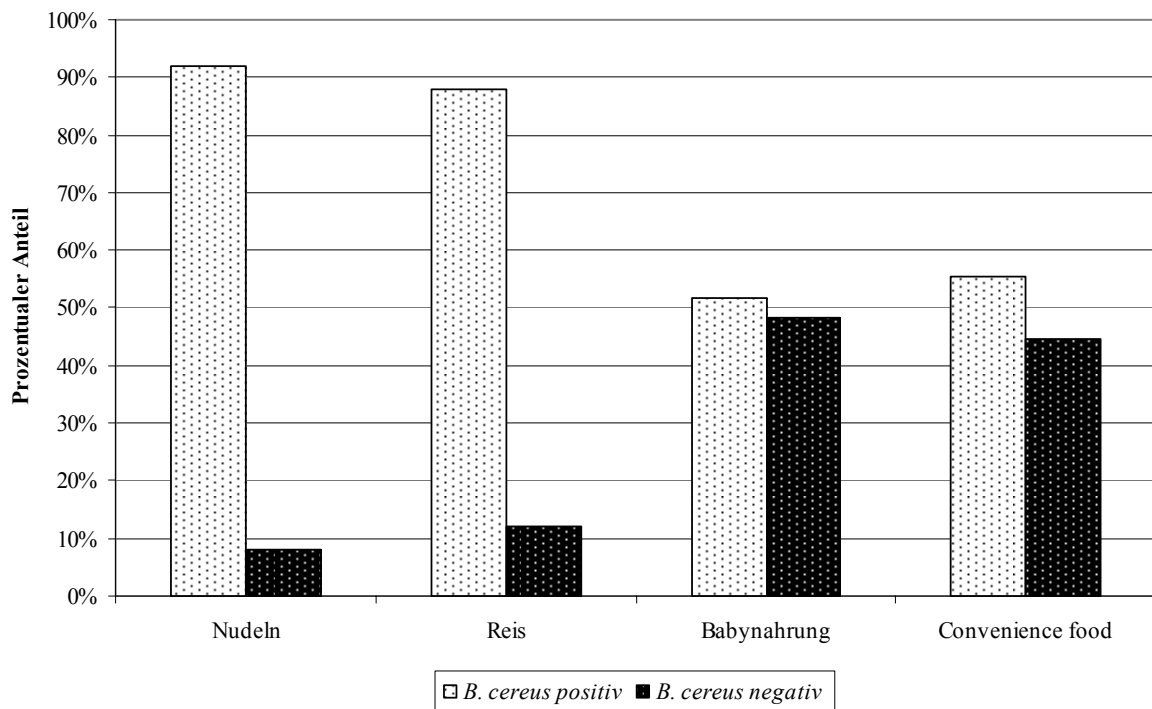


Abbildung 5: Prozentuale Anteile der *B. cereus*-Kontamination nach TSBP-Anreicherung in den untersuchten Produktgruppen vergleichend dargestellt

3.3.3 Vorkommen von *B. cereus* in den einzelnen Produktgruppen

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der einzelnen Gruppen beschrieben und anschließend die identifizierten Isolate vergleichend beleuchtet.

3.3.3.1 Nudeln

Bei der Auswahl der 49 Nudelprodukte wurde darauf geachtet, dass unterschiedliche Sorten mit verschiedenen Inhaltsstoffen gewählt wurden. So konnte eine Unterteilung der verschiedenen Produkte in frische Nudeln aus dem Kühlregal mit schneller Verderblichkeit und in getrocknete Nudelsorten aus Hartweizen oder auch Eierteig, die sich durch eine lange Haltbarkeit auszeichnen, gemacht werden. Eine weitere Gruppe beinhaltete die Bioprodukte. Nudelsorten, die in keine dieser Gruppe einsortiert werden konnten, wie Buchweizennudeln, Glasnudeln oder auch aus Reisnudeln wurden in der Gruppe „Andere“ zusammengefasst.

Die *B. cereus*-Keimzahlbestimmung mit Hilfe des Oberflächenverfahrens ergab, dass 18 % (n = 9) der Nudelproben einen *Bacillus cereus*-Gehalt von ≥ 10 KbE/g hatten, wobei der höchste Wert bei 100 KbE/g lag. Diese Keimzahl konnte in asiatischen Mendake-Nudeln mit Spinat bestimmt werden, die in Thailand produziert wurden. Eine Konzentration von 60 KbE/g wiesen asiatische Buchweizennudeln auf. Die frischen Nudelsorten hatten alle einen Wert < 10 *B. cereus*/g Nudeln. In der Gruppe „Eierteigwaren“ konnte bei 13 % (n = 2) der Proben eine Kontaminationsrate ≥ 10 *B. cereus*/g festgestellt werden, bei den Hartweizengrießprodukten waren 25 % (n = 3) bzw. bei den Bio-Hartweizengrießprodukte 33 % (n = 2) mit ≥ 10 *B. cereus*/g kontaminiert (Abb. 6).

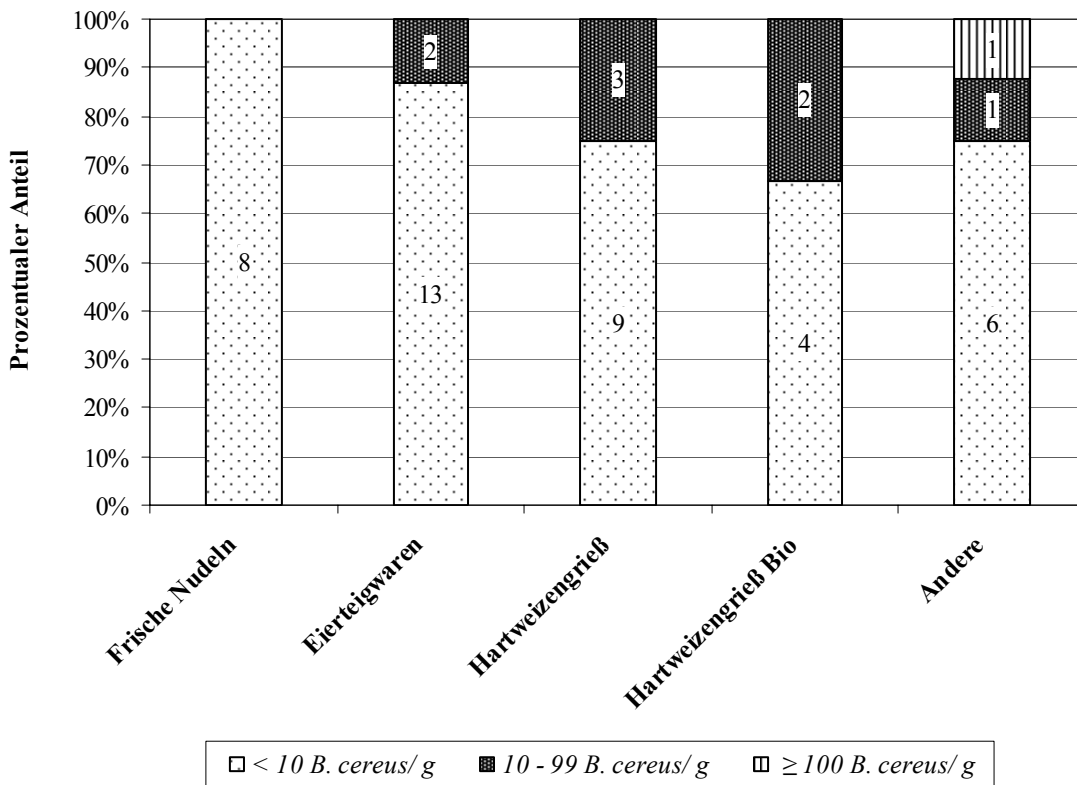


Abbildung 6: *B. cereus*-Belastung von Nudeln mit verschiedenen Inhaltstoffen
(Die Werte in den Säulen geben die Anzahl der Proben an)

Nach der TSBP-Anreicherung (ISO 21871: 2006) zur weiteren Detektion von *B. cereus*-Isolaten konnte aus 45 Nudelproben (92 %) *B. cereus* isoliert werden (Abb. 5). Die vier Proben (8 %), aus denen kein Isolat gewonnen werden konnte, waren zum einen Spätzle und Fettuccine aus Eierteigwaren, zum anderen Spätzle und Tortelloni aus dem Kühlregal.

Aus den 45 kontaminierten Proben konnten 48 *B. cereus*-Stämme identifiziert werden. Eine weitere Charakterisierung auf Stärkeplatten ergab, dass 22 Isolate Stärke-positiv reagierten und 26 *B. cereus*-Isolate Stärke-negative Eigenschaften zeigten. Des Weiteren erbrachte die Überprüfung des Toxinbildungsvermögens, dass 25 Isolate reine Nhe-Produzenten darstellten, von denen nur drei Stärke-positiv waren, und 22 Isolate die Fähigkeit hatten Nhe und HBL zu produzieren. Bei der prozentualen Verteilung, die in Abbildung 7 dargestellt ist, ergab sich ein nahezu gleiches Verhältnis zwischen den reinen Nhe-Produzenten (n = 25) und den HBL- und Nhe-Produzenten (n = 22).

Das zusätzliche Einsetzen der Stärke-negativen Isolate in die PCR ergab, dass ein *B. cereus*-Stamm, der Nhe bilden konnte, auch noch in der Lage war emetisches Toxin zu produzieren. Dieser Stamm konnte aus asiatischen Buchweizennudeln isoliert werden, die in Korea produziert worden waren und in einem asiatischen Supermarkt erworben wurden. Die Verifizierung des Isolats erfolgte im Zytotoxizitätstest nach dem positiven PCR-Ergebnis.

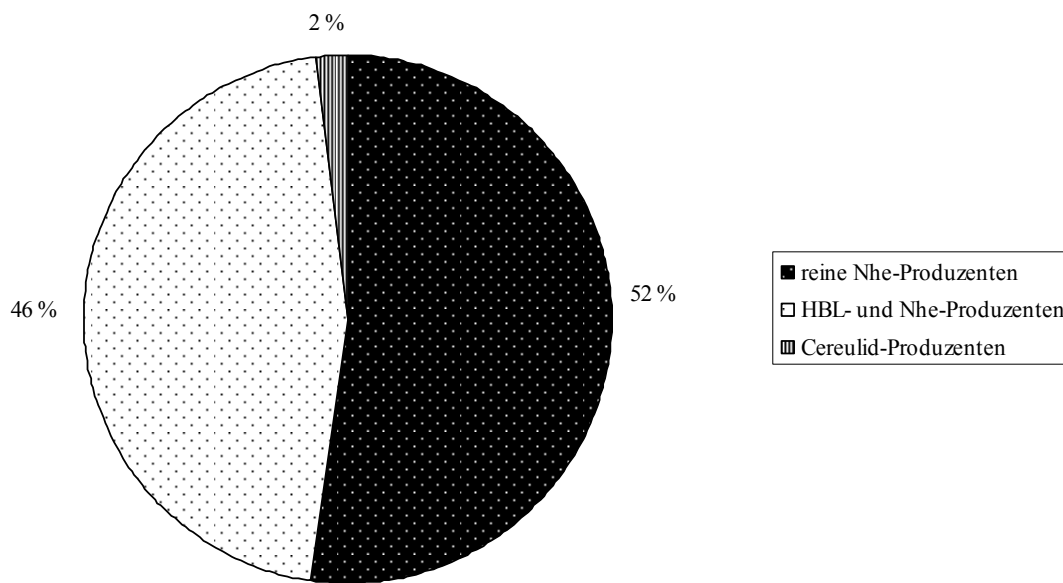


Abbildung 7: Relatives Toxinbildungsvermögen von *B. cereus*-Isolaten aus den untersuchten Nudelproben

3.3.3.2 Reis

Reis ist ein Lebensmittel, das in vielen Ländern dieser Welt zu den Grundnahrungsmitteln gehört. In Asien wird eine große Menge Reis produziert und von dort aus in andere Länder exportiert. Er gehört zu den bekanntermaßen häufig mit *B. cereus* belasteten Lebensmitteln. Vor allem die asiatischen Reissorten gehören zu denen, die eine starke Kontamination aufweisen und ein Infektionsrisiko darstellen (KRAMER & GILBERT, 1989).

Außer den Produkten, die im Supermarkt erhältlich sind und in Deutschland abgepackt werden, ist es möglich, in speziellen asiatischen Läden Reisprodukte zu erwerben, die bereits

in Asien abgepackt und direkt importiert werden. Diese wurden im Rahmen der Arbeit ebenfalls in die Untersuchungen mit aufgenommen.

Die 82 verschiedenen Reisproben aus dieser Studie sind Reissorten wie Basmati Reis, Milchreis, Jasminreis, Klebereis, Langkornreis und Vollkornreis, die in unterschiedlichen Einzelhandelsmärkten erworben wurden.

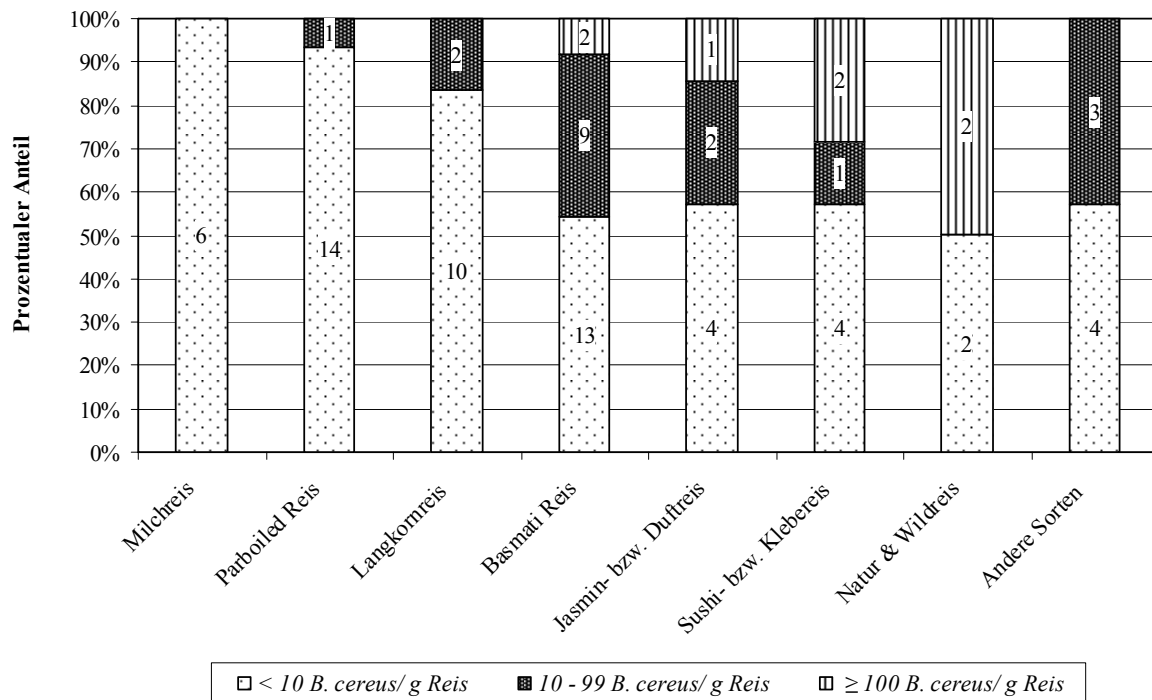


Abbildung 8: Kontaminationsrate von *B. cereus* in unterschiedlichen Reissorten ohne TSBP-Anreicherung (Die Werte in den Säulen geben die Anzahl der Proben an)

Die Keimzahlbestimmung auf Schafblutagar ergab, dass bei 69,5 % (57 Proben) der 82 untersuchten Reisproben ein Keimgehalt unter 10 *B. cereus*/g Reis, bei 18 Reissorten (22 %) ein Wert zwischen 10 und 99 Keimen und bei sieben Reissorten (8,5 %) ein Wert ≥ 100 *B. cereus* KBE/g Reis festgestellt werden konnte (Abb. 4). Der höchste Wert lag bei 300 KBE/g und wurde in einem Jasminreis (China-Restaurant Reis) aus einem deutschen Supermarkt gefunden. In Abbildung 8 kann man erkennen, dass die Belastung mit *B. cereus* bei den verschiedenen Sorten unterschiedlich hoch ist. So konnten in Milchreis vor TSBP-Anreicherung keine *B. cereus*-Isolate identifiziert werden und auch in Parboiled Reis ebenso wie in Langkornreis waren nur eine bzw. zwei Proben mit 10 KBE/g kontaminiert. Bei den

anderen Sorten wiesen über 40 % der Proben eine Kontamination von mehr als 10 KbE/g auf (Abb. 8).

Ein weiterer Unterschied in der Höhe des Vorkommens von *B. cereus* konnte aufgrund der verschiedenen Geschäfte, aus denen die Proben gezogen wurden, festgestellt werden. So hatten die Proben aus dem asiatischen Supermarkt höhere *B. cereus*-Konzentrationen als die Reisprodukte aus den deutschen Supermärkten (Abb. 9 und Abb. 10).

In 79 % der Proben (n = 51), die in deutschen Supermärkten gezogen wurden, konnten weniger als 10 KbE/g isoliert werden und 3 % der Produkte wiesen einen Keimgehalt ≥ 100 KbE/g auf, während bei den Reissorten aus dem asiatischen Supermarkt nur 36 % (n = 6) der Proben unter einem Keimgehalt von 10 KbE/g lagen, dafür bei 29 % ein Keimgehalt von ≥ 100 KbE/g festgestellt wurde.

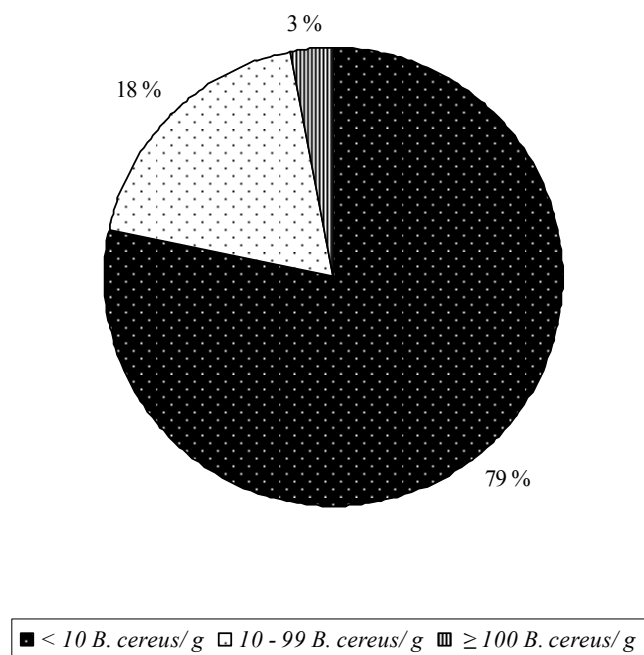


Abbildung 9: Vergleichende *B. cereus*-Belastung von Reisproben aus deutschen Supermärkten

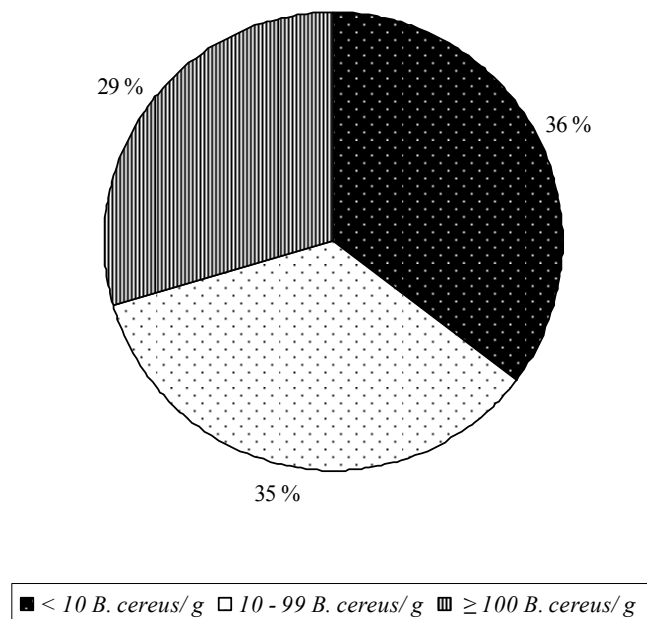


Abbildung 10: Vergleichende *B. cereus*-Belastung von Reisproben aus einem asiatischen Supermarkt

Aufgrund der zum größten Teil niedrigen *B. cereus*-Belastung wurde, wie auch bei den Nudeln, erst nach einer Anreicherung in TSBP das gesamte Ausmaß der Kontamination mit 72 *B. cereus* positiven Proben (88 %) ersichtlich (Abb. 5). Es konnten keine Stämme aus drei Parboiled Reis-Proben, zwei Langkornreis-Proben, einer Milchreis-Probe, zwei Basmatireis-Proben und aus zwei anderen Sorten (Risotto, 7 Korn Equilina) isoliert werden (12 %, n = 10).

Aus den 72 Proben wurden 101 verschiedene Isolate gewonnen. Von diesen reagierten im Stärketest 71 Isolate Stärke-positiv und 30 Isolate waren Stärke-negativ. Die Verteilung der Toxinarten sieht man in Abbildung 11. Hierbei ist festzustellen, dass 51 der *B. cereus*-Isolate reine Nhe-Produzenten waren und 48 Stämme HBL und Nhe produzieren konnten. Ein kulturell nachgewiesenes Isolat konnte kein Toxin produzieren. Nach dem Einsetzen der 30 Stärke-negativen Isolate in die PCR konnte ein Cereulid-Produzent identifiziert werden, der anschließend im Zytotoxizitätstest verifiziert wurde. Dieser *B. cereus*-Stamm (138 C) wurde aus einem Klebereis aus Vietnam isoliert.

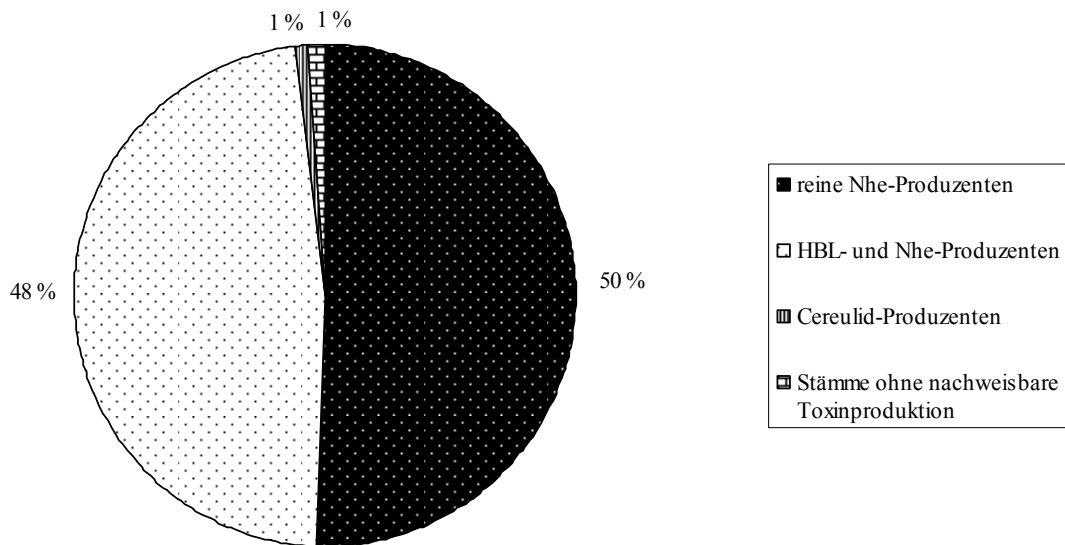


Abbildung 11: Relatives Toxinbildungsvermögen von *B. cereus*-Isolaten aus den untersuchten Reisproben

3.3.3.3 Babynahrung

Innerhalb dieser Studie wurde auch eine Statuserhebung über die Kontamination von unterschiedlichen Babynahrungsprodukten durchgeführt. Hierzu wurden 54 Nahrungsmittel für Kleinkinder von unterschiedlichen Herstellern untersucht. Diese verteilten sich auf 14 Babygläschen (u. a. auch Nudel- und Reisgerichte), neun Trockenmilchprodukte (Folgemilch, Anfangsmilch), eine trinkfertige Folgemilch, 23 verschiedene Milchbreisorten und sieben andere Produkte, zu denen fünf verschiedene Getreidebreisorten, ein Kartoffelbrei und eine Packung Reisflocken zählten.

Die Kontaminationshöhe war bei den Kleinkinderprodukten sehr niedrig. So hatten 96 % (n = 52) einen *B. cereus*-Gehalt unter 10 Keimen pro Gramm Probe. Nur bei zwei Proben (4 %) konnte ein Wert zwischen 10 und 99 *B. cereus*/g nachgewiesen werden (Abb. 4). Dabei handelte es sich zum einen um einen Bio-Milchbrei mit einem Wert von 20 *B. cereus*/g zum anderen um eine Folgemilch (40 *B. cereus*/g).

Nach Anreicherung konnte eine Belastung mit *B. cereus* bei 28 Proben (52 %) festgestellt werden (Abb. 5).

Die Kontamination war in den verschiedenen Produktgruppen unterschiedlich hoch. So konnte in Breigläsern in keinem Fall ein *B. cereus*-Isolat identifiziert werden. Dafür wurden aus 78 % (n = 18) der Milchbreiproben *B. cereus*-Stämme isoliert. Bei der Gruppe „Andere Produkte“, die zum großen Teil Getreidebreiproben enthielt, konnte sogar aus 86 % (n = 6) der Proben *B. cereus*-Isolate gewonnen werden. Anfangs- und Folgemilch wiesen ein Verhältnis von 60 % negativen Proben (n = 6) zu 40 % positiven Proben (n = 4) auf (Abb. 12).

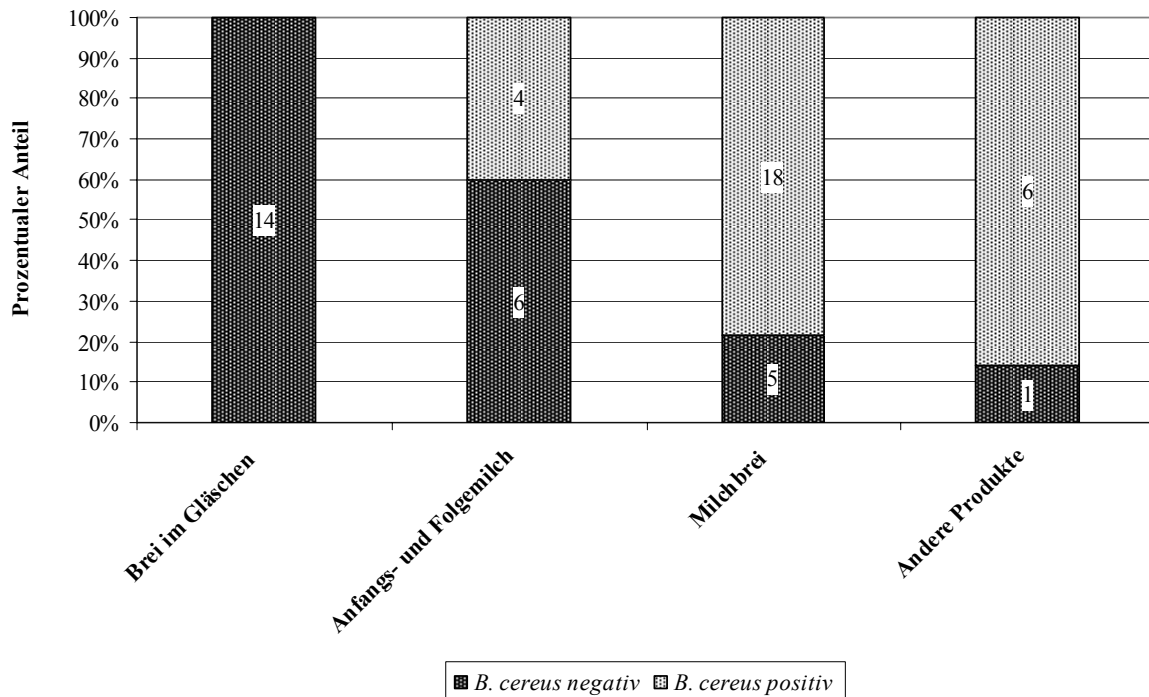


Abbildung 12: Anteil *B. cereus* positiver Proben bei verschiedenen Babynahrungsprodukten (Die Werte in den Säulen geben die Anzahl der Proben an)

Aus den 28 positiven Proben konnten 32 *B. cereus*-Stämme isoliert werden. Hiervon waren 19 Isolate Stärke-negativ und 13 reagierten positiv auf den Stärkeplatten. Den größten Anteil der Toxinbildner mit 25 Stämmen (72 %) bildete die Gruppe der reinen Nhe-Produzenten. Bei einem Stärke-negativen Isolat konnte unter den gewählten Anzuchtbedingungen keine

Toxinproduktion nachgewiesen werden. Mittels PCR konnte bei den 19 Stärke-negativen Isolaten ein emetischer Toxinbildner identifiziert werden. Dieses Isolat, das neben dem emetischen Toxin auch in der Lage war Nhe zu produzieren, stammte aus einem Milchbrei mit Cornflakes. Das Verhältnis von reinen Nhe-Produzenten zu HBL- und Nhe-Produzenten aus den Babynahrungsprodukten lag bei 72 : 22 (Abb. 13).

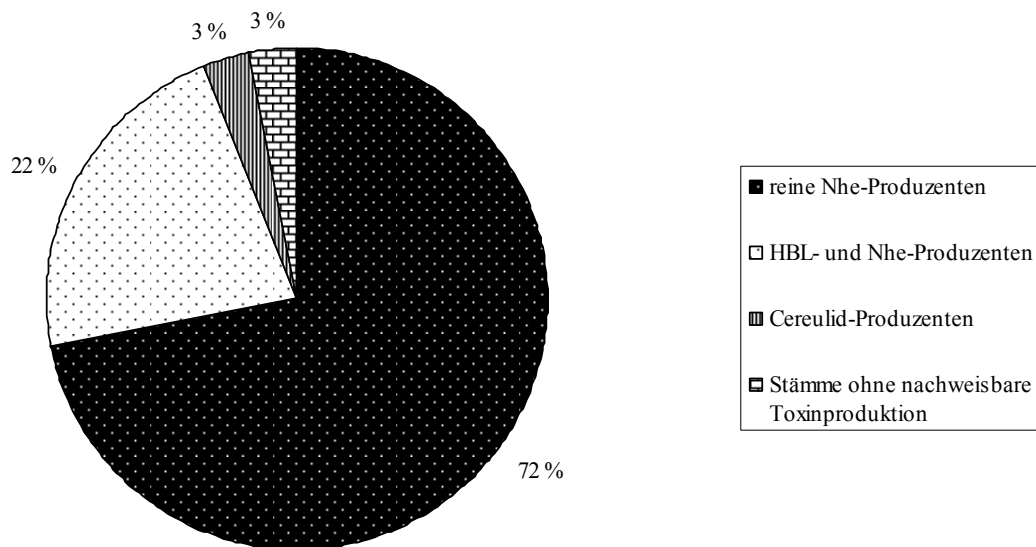


Abbildung 13: Relatives Toxinbildungsvermögen von *B. cereus*-Isolaten aus den untersuchten Babynahrungsproben

3.3.3.4 Convenience Food

In den letzten Jahren kamen immer mehr Fertigprodukte auf den deutschen Markt. Die Zahl der Alleinlebenden steigt (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2006) und „der wachsende Zeitdruck bei der Arbeit, oft auch in den Familien lassen alle Spielarten von Convenience Food weiter wachsen“ (SPIEKERMANN, 2004). Diesen Umständen verdanken wir Gerichte, die schnell und einfach zubereitet werden können. Eine Auswahl der Convenience Food Gerichte, die Nudeln oder Reis enthalten, wurde in dieser Arbeit, zunächst im nicht erwärmten oder im ungekochten Zustand, untersucht.

Es wurden 18 Proben aus u. a. fertigen Milchreisprodukten, Reiswaffeln, Reis- und Nudelgerichten gezogen. Hierbei unterschieden sich die Produkte bei der Zubereitung. So gab es Fertiggerichte, zu denen heißes Wasser dazu gegeben werden musste, oder auch Gerichte, die nur in der Mikrowelle erwärmt wurden, bei denen alle Zutaten bereits enthalten waren. Außerdem gab es Gerichte, bei denen Reis oder Nudeln extra gekocht und die Soßen erst später beigefügt wurden.

Die *B. cereus*-Belastung war ähnlich gering wie bei der Babynahrung. Nach der ersten Untersuchung der ausgestrichenen Proben konnte festgestellt werden, dass 13 (72 %) der 18 Convenience Food Lebensmittel unter 10 *B. cereus*-Keime aufwiesen. Die restlichen fünf Proben (28 %) hatten einen Keimgehalt zwischen 10 und 99 *B. cereus* pro Gramm Gericht, wovon bei zwei dieser fünf Proben 10 KbE/g festgestellt wurden, bei zweien 20 KbE/g gezählt werden konnten und bei einer Probe 80 KbE/g nachgewiesen wurde (Abb. 4).

Die Anreicherung in TSBP ergab, dass aus 10 Produkten (56 %) *B. cereus* isoliert werden konnte (Abb. 5).

Aus zwei Gerichten wurden mehrere Isolate gewonnen. So konnten aus einem indonesischen Reisgericht (Nasi Goreng) fünf *B. cereus*-Stämme isoliert werden und aus einer fertigen Reiskugel mit Gemüsestückchen aus dem Kochbeutel wurden vier Isolate identifiziert. Insgesamt konnten 20 *B. cereus*-Isolate aus den 10 Gerichten gewonnen werden, von denen 10 Stärke-positiv reagierten und 10 Isolate eine negative Reaktion zeigten. Die Abbildung 14 zeigt die Verteilung der gebildeten Toxine. Bei der Überprüfung der Stärke-negativen Isolate mittels PCR konnten keine Cereulid-Produzenten identifiziert werden.

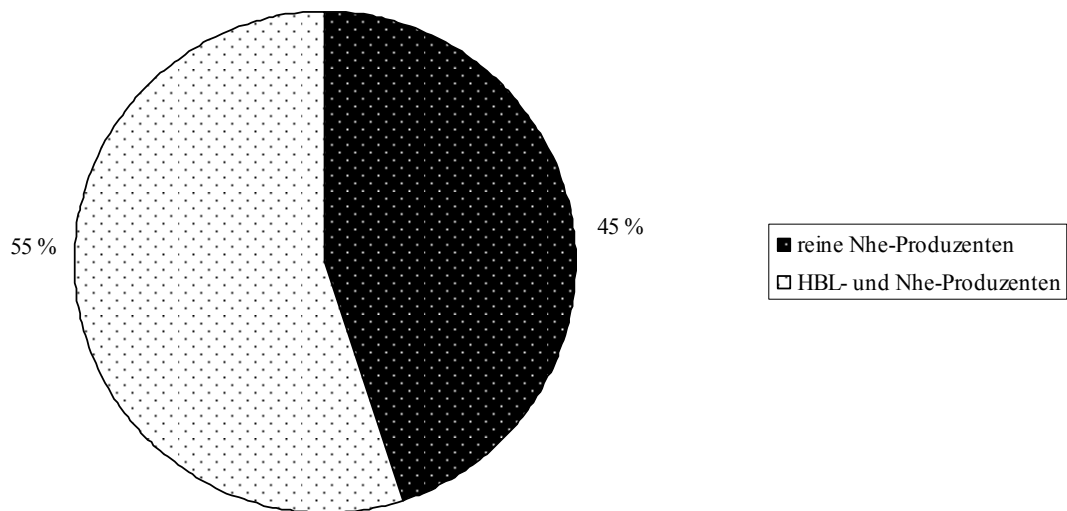


Abbildung 14: Relatives Toxinbildungsvermögen von *B. cereus*-Isolaten aus den untersuchten Convenience Food-Proben

3.3.3.5 Vergleichende Charakterisierung der Isolate

Von 201 *B. cereus*-Isolaten konnten 116 Isolate (58 %) Stärke hydrolysieren. Die Gruppe der Stärke-negativen Isolate umfasste 85 Isolate; dies entspricht einem Anteil von 42 % der gesamten Isolate (Tab. 5).

Tabelle 5: Stärkeverhalten der identifizierten 201 *B. cereus*-Isolate aus den verschiedenen Produktgruppen

| Lebensmittel | Stärke-positiv | Stärke-negativ |
|---------------------|----------------|----------------|
| Nudeln | 22 | 26 |
| Reis | 71 | 30 |
| Babynahrung | 13 | 19 |
| Convenience food | 10 | 10 |
| Gesamtanzahl | 116 | 85 |

Eine vergleichende Darstellung des Stärkeabbauverhaltens ist in Abbildung 15 zu sehen, die deutlich macht, dass bei Nudeln, Babynahrung und Convenience Food-Produkten nahezu ein Verhältnis von 50 : 50 zwischen den Stärke-positiven und Stärke-negativen Isolaten besteht und sich in dieser Hinsicht die Produktgruppen kaum voneinander unterscheiden. Allerdings gab es bei den Isolaten, die in den Reisprodukten gefunden wurden, einen höheren Anteil (70 %) von Stärke-positiven Stämmen (n = 71) im Verhältnis zu den Stärke-negativen Stämmen (n = 30) mit einem Anteil von 30 %.

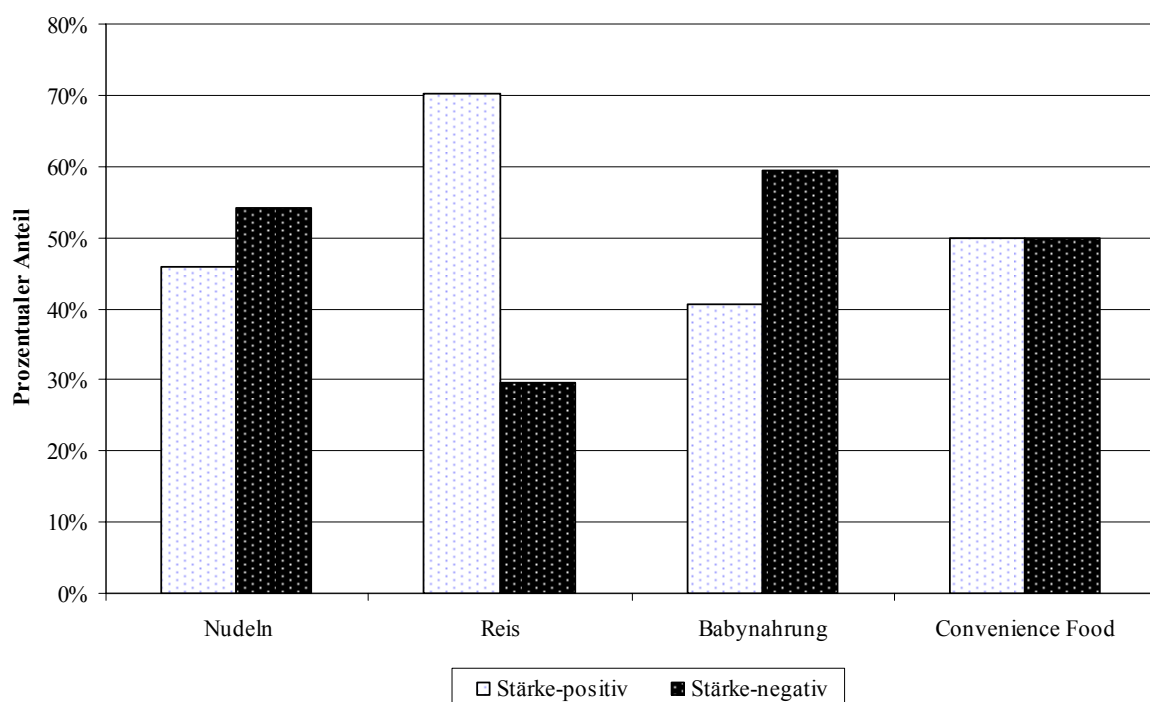


Abbildung 15: Prozentuale Anteile des Stärkeabbauverhaltens der isolierten *B. cereus*-Stämme aus den verschiedenen Produktgruppen

Beim Vergleich der Toxinprofile der Isolate konnte festgestellt werden, dass in fast allen Lebensmittel-Gruppen ein nahezu gleiches Verhältnis zwischen Nhe- und HBL-Produzenten zu finden war. Eine Abweichung davon konnte nur bei den Babynahrungsisolaten beschrieben werden. Der prozentuale Anteil der reinen Nhe-Produzenten lag in dieser Gruppe bei 72 % (n = 23).

Nur in zwei aller detektierten Isolate konnte kein Nhe nachgewiesen werden, so dass in Convenience Food und Nudeln 100 % (n = 20 bzw. n = 48) der untersuchten *B. cereus*-

Stämme in der Lage waren, zumindest ein Enterotoxin (Nhe) zu bilden. Bei Reis konnten 99 % Nhe bilden und in Babynahrungsprodukten hatten 97 % (n = 31) die Fähigkeit der Nhe-Produktion. Ähnlichkeiten unter den Lebensmittelgruppen gab es auch bei den Anteilen der Cereulid-Bildner nach der Untersuchung aller Stärke-negativen Isolate in der PCR. Isolate, die emetisches Toxin produzieren konnten, gab es maximal eines pro Produktgruppe (ca. 1 – 3 %), aus Convenience Food konnte keines isoliert werden (Abb. 16). Alle Cereulid-Produzenten konnten im Zytotoxizitätstest verifiziert werden.

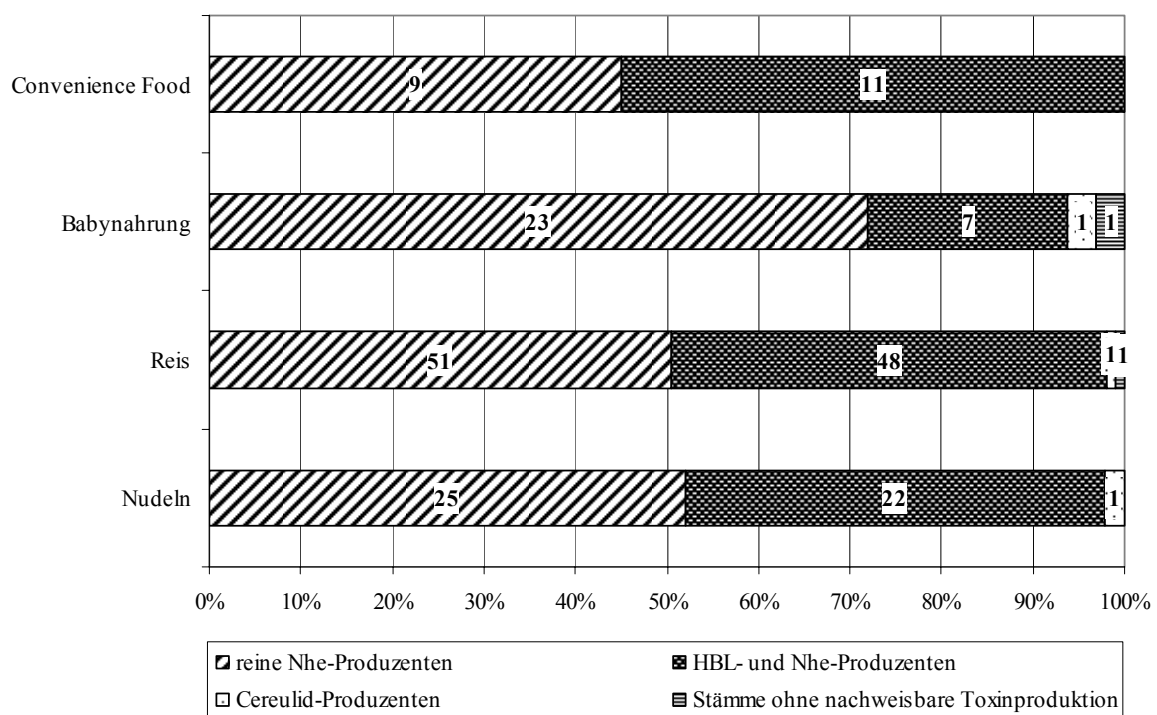


Abbildung 16: Vergleichende Darstellung der *B. cereus*-Toxine in den unterschiedlichen Lebensmittelgruppen

Die Gesamtbetrachtung der Toxinprofile aller identifizierten Isolate gab eine ähnliche Verteilung wieder, wie es auch bei den einzelnen Produktgruppen zu finden war. So waren 54 % (n = 108) aller *B. cereus*-Isolate reine Nhe-Produzenten und 44 % (n = 88) hatten die Fähigkeit HBL und Nhe zu bilden. Ein Prozent (n = 3) zählte zu den Cereulid-Produzenten und bei den restlichen ein Prozent (n = 2) konnte keine Toxinbildung nachgewiesen werden (Abb. 17).

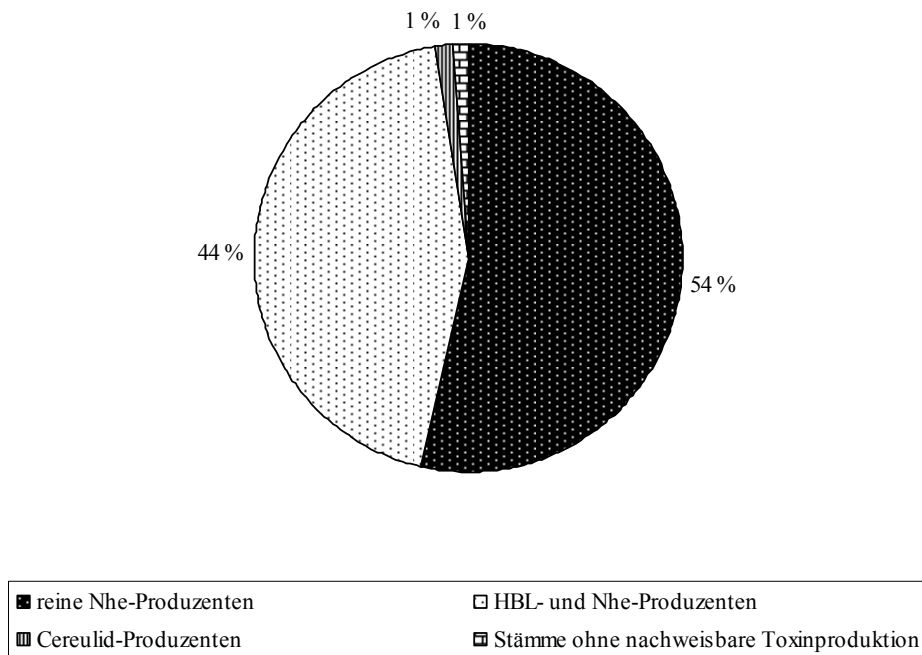


Abbildung 17: Prozentuale Anteile der Toxinarten aus allen Isolaten

3.3.4 Zubereitete Proben

Um einen Überblick zu bekommen, inwieweit die Nahrungsmittelzubereitung auf das Vorkommen von *B. cereus* in der Nahrung Einfluss nimmt, wurden Proben aus allen Gruppen stichprobenartig ausgewählt und nach Herstellerangaben zubereitet.

Aus den 72 Reisproben, die nachweislich *B. cereus* enthielten, wurden 43 Proben ausgesucht und nach Anleitung gekocht. Anschließend wurden sie in der gleichen Art wie die ungekochten Proben in TSBP angereichert, bevor die *B. cereus*-Stämme isoliert und charakterisiert wurden. In 18 Reisproben konnte nach dem Kochen kein *B. cereus* mehr nachgewiesen werden, aus den restlichen Proben wurden 25 *B. cereus*-Isolate gewonnen. Nach weiteren Untersuchungen konnten 14 Isolate als Stärke-negativ und 11 Isolate Stärke-positiv beschrieben werden. Im Vergleich dazu war im ungekochten Zustand aus den 25 Reisproben eine Isolierung von 17 Stärke-positiven und 8 Stärke-negativen Isolaten möglich. Von den 18 Reisproben, aus denen im gekochten Zustand kein *B. cereus* mehr gewonnen

werden konnte, waren zuvor im ungekochten Zustand 13 Stärke-positive und fünf Stärke-negative Isolate isoliert worden.

Die Abbildung 18 vergleicht die Verteilung der *B. cereus*-Isolate aus den 43 ausgewählten Proben im ungekochten und gekochten Zustand, die nach der spezifischen Anreicherung aus den Reisproben isoliert werden konnten. Hierbei sieht man deutlich, dass der Anteil der Stärke-positiven Isolate nach dem Kochvorgang reduziert wurde.

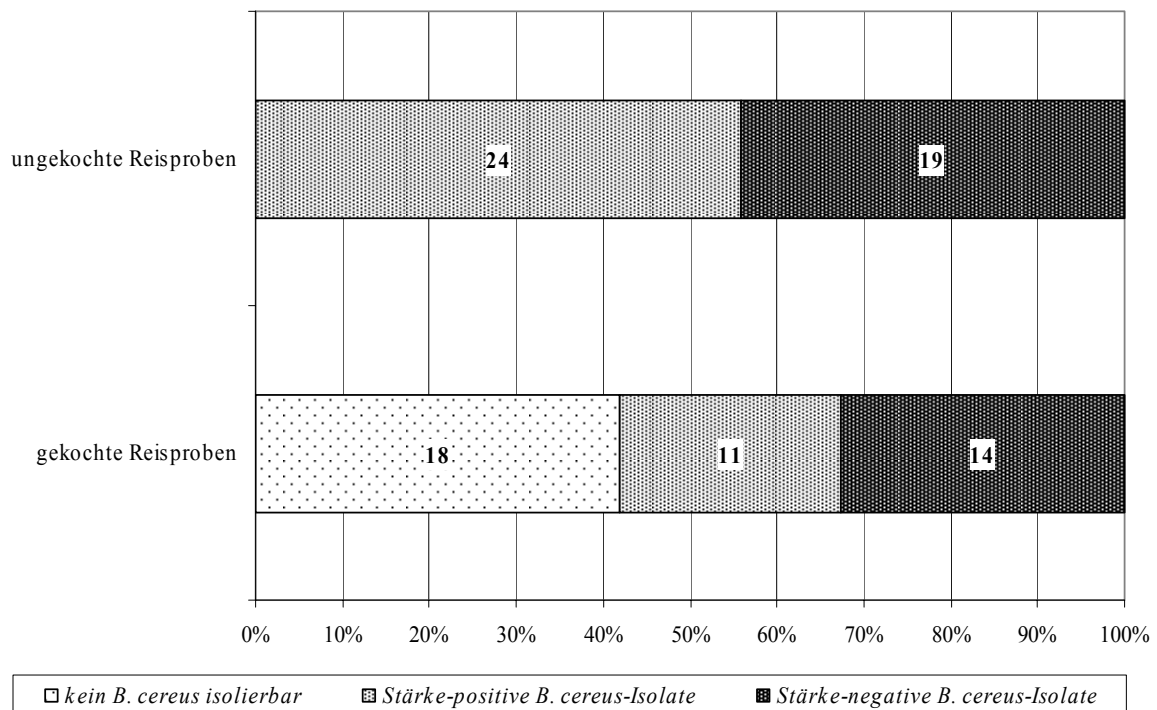


Abbildung 18: Vergleichende Darstellung der *B. cereus*-Belastung von 43 Reisproben vor bzw. nach dem Kochvorgang

Die Ergebnisse der anderen Nahrungsmittelgruppen zeigten im zubereiteten Zustand kaum Abweichungen zu den ungekochten Proben und werden aus diesem Grund hier nicht näher erläutert.

4 Diskussion

B. cereus kann relativ häufig (NYGREN, 1962), meist in geringen Keimzahlen, in Lebensmitteln nachgewiesen werden. Bei erhitzten Produkten ist er auf Grund seines Sporenbildungsvermögens häufig der einzige potentiell pathogene Keim und kann sich insbesondere bei falscher Behandlung (z. B. Lagerung bei Zimmertemperatur) gut vermehren. Ein besonderes Problem stellen dabei neben stärkehaltigen Lebensmitteln (Reis, Nudeln), die an den vielen durch *B. cereus* ausgelösten Lebensmittelvergiftungen beteiligt waren, auch Babynahrung und Convenience Food dar. Vor allem in Nahrungsprodukten für Kleinkinder mit einem Trockenmilchanteil (z.B. Milchbrei) konnte eine Kontamination mit *B. cereus*, wenn auch nur in geringen Keimzahlen, häufig festgestellt werden, was ein potentielles Gesundheitsrisiko gerade bei Säuglingen und Kleinkindern darstellen kann (BECKER et al., 1994). Das Hauptproblem bei Convenience Food stellt die zur Zubereitung nicht mehr notwendige oder nur geringe Erhitzung dar, die für eine effektive Keimreduzierung nicht ausreicht (EHLING-SCHULZ et al., 2004).

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen konnte aus dem untersuchten Probenmaterial ohne vorherige Anreicherung (Nachweis von *B. cereus* auf Schafblutagar) lediglich in 20 % der Proben *B. cereus*-Keimzahlen von 10 KbE/g und mehr gefunden werden. Um auch geringere *B. cereus*-Belastungen (< 10 KbE/g) detektieren zu können wurden die Anzuchtbedingungen nach ISO 21871: 2006 (Detection method) modifiziert. Damit ließen sich in 155 von insgesamt 203 Lebensmittelproben *B. cereus* nachweisen; dies entspricht einer Belastung von 76 %.

Im Hinblick auf die tolerierbare Belastung von Lebensmitteln mit *B. cereus* wurde von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) für verschiedene Lebensmittelgruppen Richt- und Warnwerte vorgeschlagen.

Bei den untersuchten Lebensmitteln wurden in keiner Gruppe diese Richtwerte erreicht. Die Maximalwerte lagen für Nudeln bei 10^2 KbE/g (Richtwert 10^4 KbE/g) und für Säuglingsnahrung bei 20 KbE/g (Richtwert 10^2 KbE/g). In der Regel war bei den meisten Produkten nur eine geringfügige Belastung feststellbar.

Die Maximalwerte von *B. cereus*, aus den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben, lagen zwischen 10^2 und 10^3 *B. cereus*/g, und konnten bis auf eine Ausnahme (Mendake-Nudeln) nur in Reissorten gefunden werden, die aus asiatischen Anbaugebieten kamen.

Die erhöhte Kontamination durch *B. cereus* in Reis könnte also an unterschiedlichen Anbauverfahren bzw. der Weiterverarbeitung liegen.

So werden 80 % der Weltreisernte in Nassreisanbau vor allem im China und anderen asiatischen Ländern erzeugt. Eine erhöhte Keimbelastung durch dieses Anbauverfahren kann dadurch entstehen, dass Reisfelder mit Wasser minderer Qualität überflutet werden. In vielen ländlichen asiatischen Regionen wird ein direktes Ableiten der Abwässer ohne Klärung in Seen oder auch ins Grundwasser nach wie vor praktiziert (FISCHER, 2005; SUPPER, 2003). In den USA und den südeuropäischen Reisanbaugebieten hat hingegen die maschinelle Anbautechnik die Hauptbedeutung, bei der die Ernte auf abgetrockneten Feldern mit Mähdreschern eingeholt wird. Die untersuchten Reissorten, Langkornreis bzw. Parboiled Reis, die fast ausschließlich aus diesen Anbaugebieten stammten, wiesen geringere Kontaminationsraten (maximal 10^2 KbE/g) auf. Die differierende Belastung der unterschiedlichen Sorten könnte somit durch die verschiedenen Anbauverfahren bedingt sein. Eine andere Ursache der geringeren Belastung kann das angewandte Spezialverfahren („Parboiling“) in der Herstellung sein, welches in Asien nicht eingesetzt wird. Bei diesem Verfahren wird vor der Entfernung des Silberhäutchens der Reis in warmem Wasser eingeweicht und anschließend mit Wasserdampf und Überdruck behandelt. Dabei wandern wasserlösliche Vitamine und Mineralstoffe aus dem Silberhäutchen in das Korninnere (Endosperm). Durch Trocknung kommt es dann zu einem Einschluss in den Körnern. Erst danach erfolgt das Schleifen und Polieren (MASCHKOWSKI, 2001). Eine Reduzierung der Keimbelastung könnte so durch die kombinierte Dampf- und Druckbehandlung bzw. durch das Schleifen und Polieren gegeben sein.

Bei der Untersuchung der Nudel-Produktgruppe konnten nur geringe Keimzahlen ($< 10^2$ KbE/g) detektiert werden. Die Vermutung, dass frische Nudeln aus der Kühltheke auf Grund der fehlenden Wärmebehandlung stärker mit *B. cereus* kontaminiert sind als Trockenprodukte, konnte nicht bestätigt werden. So war der Höchstwert (10^2 KbE/g) bei getrockneten Nudeln (Mendake-Nudeln) anzutreffen, hingegen lag der *B. cereus*-Gehalt von frischen Nudelsorten immer unter 10 Keimen/g.

Eine mögliche Erklärung für den reduzierten Keimgehalt können die guten hygienischen Maßnahmen in den Herstellungsbetrieben sein, die ein HACCP-Konzept implementiert haben. So trägt gerade das HACCP-Konzept, welches seit Februar 1998 in deutsches Recht eingegangen ist, zu einer Verbesserung des Hygienestatus bei. Das System besagt, dass die Gefahrenpunkte in einer Produktionslinie benannt, eliminiert und, wo eine Elimination nicht

möglich ist, durch besondere Überwachungskautelen unter Kontrolle gehalten werden. Kritische Punkte können chemisch, mikrobiologisch oder physikalisch überwacht werden. Untersuchungen von LITTLE et al. (2003) bestätigten die positiven Auswirkungen des HACCP-Konzepts, da Betriebe mit gutem Hygienemanagement auf der Grundlage von HACCP eine bessere mikrobiologische Qualität bei Lebensmitteln aufweisen konnten.

Die *B. cereus*-Belastung der untersuchten Babynahrungsprodukte war wie erwartet niedrig. So konnte lediglich in 4 % der untersuchten Proben eine Keimzahl von mehr als 10 *B. cereus*/g gefunden werden. Nach Anreicherung der Proben ließ sich *B. cereus* in 52 % der Produkte nachweisen, dies deckt sich mit den bislang publizierten Ergebnissen. So konnten BECKER et al. in Studien von 1984 und 1994 eine Kontamination mit *B. cereus* von 39 % - 54 % feststellen, wobei die Keimzahlen (max. 10² KbE/g), wie auch in der vorliegenden Arbeit, sehr niedrig waren.

Des Weiteren beschrieben BECKER et al. (1994) bei Folgemilch einen Anstieg der Kontamination mit *B. cereus* von 28 % auf 55 % zwischen den Jahren 1984 und 1994. Die in den jetzigen Untersuchungen festgestellte Belastungsfrequenz von 40 % bei Anfangs- und Folgemilchprodukten deutet auf eine Verbesserung des Hygienestatus innerhalb der Produktion hin. Die Breigläschen (Babynahrung) waren wie vermutet frei von *B. cereus*. Nach dem Vorsorge-Prinzip greift hier auch die strengere Kontrolle entsprechend der Diätverordnung, welche weltweit zu den strengsten Regelungen für Lebensmittel zählt.

Convenience Food-Produkte werden wie oben beschrieben als Risiko für *B. cereus* Infektionen angesehen (EHLING-SCHULZ et al., 2004). Die Untersuchungen zeigten allerdings, dass auch bei dieser Gruppe der größte Anteil (72 %) Keimzahlen von unter 10 KbE/g aufwies. Die restlichen 28 % der Proben waren mit 10 bis 100 KbE/g belastet. Ähnlich geringe Keimgehalte wurden auch von ROSENQUIST et al. (2005) beschrieben. In dieser Langzeitstudie über „ready-to-eat foods“ waren 98,7 % der Proben mit Keimzahlen kleiner 10³ KbE/g und nur 0,5 % über 10⁴ KbE/g belastet. Leider wurde der Probenanteil, der Kontaminationen von unter 10² KbE/g aufwies, in dem Artikel nicht weiter differenziert, so dass ein genauerer Vergleich nicht möglich ist.

Zur weiteren Differenzierung der Isolate wurde der Stärkehydrolyse-Test durchgeführt. Mehrere Autoren stellten in Ihren Untersuchungen fest, dass lediglich Stärke-negative Stämme emetisches Toxin produzieren können (SHINAGAWA et al., 1985; NISHIKAWA,

1996; AGATA et al., 1996 und PIRTTIJÄRVI et al., 1999). Bei den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde ein prozentualer Anteil an Stärke-negativen Isolate von 58 % bei den ungekochten Proben festgestellt. Außerdem fiel auf, dass die Anzahl der Stärke-positiven Isolate sich bei den gekochten Reisproben verringerte, während die Belastung mit Stärke-negativen nahezu unverändert blieb.

Eine mögliche Ursache für die Reduktion der Stärke-positiven Isolate nach dem Kochprozess könnte die geringere Hitzeresistenz der Isolate sein. Nach SHINAGAWA et al. (1979, 1990) sind Stärke-positive Isolate weniger resistent gegen Hitze (100 °C für 30 Minuten oder 105 °C für 5 Minuten) als die Stärke-negativen Stämme, die aus gekochtem Reis isoliert wurden.

Die weitere Charakterisierung der Isolate mittels Enzymimmunoassays ergab, dass in den untersuchten Reis-, Nudeln- und Convenience Food-Proben der Anteil der HBL- und Nhe-Bildner bei 50 % - 60 % lag, während der Anteil reiner Nhe-Produzenten 40 % – 50 % betrug. Dies korreliert mit den Angaben aus mehreren Studien (PRÜSS et al., 1999; HANSEN & HENDRIKSEN, 2001 und IN'T VELD et al., 2001). Auch Literaturangaben (HANSEN & HENDRIKSEN, 2001 und GUINEBRETIÈRE et al., 2002) bezüglich des Nhe-Bildungsvermögens von *B. cereus*-Isolaten von 90 % und mehr konnte bestätigt werden. Insgesamt 99 % der untersuchten Isolate waren in der Lage, Nhe zu bilden. Bei Säuglingsnahrung war der Anteil an HBL-Produzenten mit lediglich 22 % auffällig niedrig.

Die Fähigkeit emetisches Toxin zu bilden, konnte nur bei drei Stämmen (1,5 %) in der PCR nachgewiesen werden. Sie waren aus unterschiedlichen Produkten isoliert worden nämlich aus japanischen Buchweizen-Nudeln, Jasminreis aus Vietnam und einem Getreidemilchbrei. Diese niedrige Vorkommenshäufigkeit (1,5 %) deckt sich mit den Angaben (ca. 2 %) von SCHULZ (2004). Allerdings wurde in früheren Untersuchungen von TAYLOR & GILBERT (1975) für emetische Stämme eine Prävalenz von 7,5 % angegeben. Dieser Wert dürfte jedoch zu hoch angesetzt sein. In einer weiteren aktuellen Studie (KREUZBERGER, 2007) konnte auch nur bei 4 % der untersuchten Stämme Cereulid-Bildung nachgewiesen werden. AGATA et al. (1996) beschrieben demgegenüber in Japan eine wesentlich höhere Häufigkeit (30,9 %) von Cereulid-produzierenden Isolaten. Nach KRAMER & GILBERT (1989) ist das Vorkommen der Cereulid-Bildner in Japan generell um das 10-fache höher als in europäischen Ländern. Auch in den eigenen Untersuchungen konnten zwei von drei emetischen Stämmen aus asiatischen Nudeln und Reisprodukten isoliert werden, die in asiatischen Supermärkten als Direktimporte erworben wurden.

Die potentielle Gefahr einer Kontamination mit emetischen *B. cereus* liegt in der Vermehrung der Toxinbildner und einer damit verbundenen Akkumulation des Cereulids (SHAHEEN et al., 2006) im Lebensmittel. Ein Abbau des einmal gebildeten Toxins ist durch die hohe Stabilität sehr unwahrscheinlich. Gerade Kinder oder alte und kranke Menschen sind dabei gefährdet, da bei ihnen geringere Mengen zum Ausbilden von Krankheitssymptomen ausreichen (DIERICK et al., 2005; MAHLER et al., 1997).

So muss das Vorkommen von einem Cereulid-Produzenten in einem Getreidemilchbrei in den eigenen Untersuchungen als sehr bedenklich eingestuft werden, insbesondere da eine Intoxikation mit Cereulid nach Aufnahme von Getreidemilchbrei durch Kleinkinder auch von LE DUC et al. (2005) beschrieben wurde. SHAHEEN et al. (2006) stellten zudem fest, dass bei Kindernahrung, die Getreide- und Molkereiprodukte enthielten, die Cereulid-Produktion am stärksten war. Somit ist die Produktion von Cereulid nicht nur von der Behandlung des Lebensmittels sondern auch von der Zusammensetzung der Produkte abhängig. BECKER et al. (1994) wies auch auf die Problematik einer raschen Vermehrung von *B. cereus* in Babynahrung hin. Bei einem Ausgangswert von 100 Kbe/g wurde schon nach 7 bis 9 Stunden (bei 27 °C) eine Keimzahl von 10^5 erreicht. Neuere Untersuchungen (SHAHEEN et al., 2006) zeigten, dass bei Vorliegen von Cereulid-produzierenden *B. cereus* (10^5 Kbe/g) in Säuglingsnahrung, die Konzentration von Cereulid in 100 ml Nahrung von 2 auf 200 µg bei Raumtemperatur innerhalb von 24 Stunden anstieg. Nach JÄÄSKELÄINEN et al. (2003) kann eine Aufnahme von 8 µg Cereulid pro kg KG schon Vomitus und Nausea hervorrufen. Dieses Szenario führte dazu, dass derzeit innerhalb der EU über die Einführung von Grenzwerten für *B. cereus* in Säuglings- und Kleinkindernahrung diskutiert wird. Ein schnelles Erkennen von Cereulid-Bildnern wäre aus diesem Grund wünschenswert. Weitere Entwicklungen von so genannten Schnelltests mit denen die Belastung verschiedener Chargen schnell und zuverlässig kontrolliert werden könnte, wäre eine Möglichkeit zur Sicherung von Lebensmitteln vor allem bei Babynahrung.

Insgesamt ist das Risiko für den Verbraucher durch die untersuchten Lebensmittel als gering einzustufen. Zwar konnten häufig (76 %) *B. cereus*-Isolate in den Proben gefunden werden, allerdings in Keimzahlen, die nach derzeitigem Stand der Wissenschaft keine Lebensmittelvergiftung auslösen können. Derzeit wird davon ausgegangen, dass in der Regel mehr als 10^5 Sporen der Enterotoxinbildner pro g Lebensmittel vom Konsumenten aufgenommen werden müssen um das entsprechende Krankheitsbild – nach Vermehrung im Darm – auszulösen.

Allerdings sollte das Gesundheitsrisiko, welches von den Cereulid-Bildnern ausgeht, nicht unterschätzt werden, da schon die Aufnahme von geringen Mengen (8 µg/kg KG) Vomitus und Nausea hervorrufen kann (JÄÄSKELÄINEN et al., 2003). Die Hitze- und Säurestabilität sowie die Akkumulation von Cereulid erhöht die Gefahr bei unsachgemäßer Behandlung der Lebensmittel durch den Verbraucher.

Auf den richtigen Umgang mit der Nahrung muss also zur Verringerung der *B. cereus*-Belastung geachtet werden. Vor allem bei der Aufbewahrung von Essensresten sollte auf eine Kühlung nicht verzichtet werden, da die Keimvermehrung bereits bei Raumtemperatur stattfindet. Innerhalb weniger Stunden können Keimzahlen entstehen, die geeignet sind, Lebensmittelvergiftungen auszulösen (BECKER et al., 1994). Eine weitere Vorsorgemaßnahme, vor allem bei Risikogruppen (Kinder, alte Menschen), ist der zeitnahe Verzehr von gekochten Lebensmitteln sowie der Verzicht auf die Aufnahme von aufgewärmten Produkten.

5 Zusammenfassung

B. cereus, ein sporenbildendes, gram-positives Stäbchen, stellt aufgrund der Hitzeresistenz, der Kältetoleranz und dem Toxinbildungsvermögen ein Problem in der Lebensmitteltechnologie und -hygiene dar. Er wird häufig in geringen Keimzahlen nachgewiesen und ist bei erhitzten Produkten meist der einzige pathogene Keim, der sich insbesondere bei falschem Umgang mit dem Lebensmittel gut vermehren kann. *B. cereus* ist in der Lage zwei verschiedene Formen von Lebensmittelvergiftungen auszulösen. Die emetische Form wird durch ein ringförmiges Dodekadepsipeptid (Cereulid) verursacht, welches präformiert im Lebensmittel vorliegt. Das zweite Krankheitsbild mit dem Leitsymptom Durchfall wird durch Enterotoxinkomplexe (HBL, Nhe) ausgelöst.

Die Arbeit beschäftigt sich mit dem Vorkommen von *B. cereus* in stärkehaltigen Produkten wie Reis und Nudeln, die oft an durch *B. cereus* verursachten Lebensmittelvergiftungen beteiligt waren. Des Weiteren wurden Produkte aus der Lebensmittelgruppe „Babynahrung“ sowie Convenience Food-Produkte untersucht.

Nach Untersuchung von 203 Lebensmittelproben aus dem Einzelhandel konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Produkte häufig mit *B. cereus* kontaminiert waren. Insbesondere bei Reis (n = 82) und Nudeln (n = 49) konnten sehr hohe Kontaminationsfrequenzen von 88 % bzw. 92 % festgestellt werden. Allerdings erwiesen sich die meisten Produkte nur als sehr geringgradig kontaminiert. So wurden lediglich in 33 Fällen Keimzahlen zwischen 10 und 100 Keimen/g detektiert und nur in acht Fällen waren über 100 Keime/g in den Lebensmittelproben enthalten. Der Maximalwert lag bei 300 Keimen/g.

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist für die untersuchten Produkte bei unmittelbarem Verzehr das Verbraucherrisiko als gering einzustufen. So wurde zwar in bis zu 92 % der Proben (Nudeln) *B. cereus* gefunden, allerdings in Mengen, die üblicherweise keine Erkrankung hervorrufen. Lediglich in drei Proben wurden Stämme mit emetischen Toxinbildungsvermögen nachgewiesen. Generell ist auf den richtigen Umgang mit den Lebensmitteln zu achten, da eine Keimvermehrung, die letztendlich zu einer Lebensmittelvergiftung führen kann, bereits bei Raumtemperatur stattfindet.

Summary

Occurrence and characterisation of toxin producing *Bacillus cereus*-isolates in selected food

B. cereus, an ubiquitous, spore-forming, gram-positive rod, represents a problem in the food technology and hygiene due to its heat resistance, its cooling tolerance and its ability to produce toxins. It is detected frequently in small germ counts and is usually the only pathogenic bacterium in heated products that can grow very fast with wrong food treatment. *B. cereus* is able to cause two different forms of food poisonings. The causative agent of emetic form is a circular dodecadepsipeptide (cereulide), which is present preformed in food. The second form with the guiding symptom diarrhoea is caused by enterotoxin-complexes (HBL, Nhe).

The work deals with the occurrence of *B. cereus* in starchy products such as rice and noodles, which were often involved in food poisonings connected with *B. cereus*. Furthermore products of the food-groups “baby food” and “convenience food” were tested.

After analyses of 203 food samples from the retail it could be shown that the tested products were contaminated frequently with *B. cereus*. In particular in rice (n = 82) and noodles (n = 49) high contamination rates of 88 % and 92 % could be detected. But most products proved only as very low-grade contaminated. In 33 cases bacterial counts between 10 and 100 germs/g could be detected and only eight food samples contained over 10² of germs/g. The maximum value was 300 germs/g.

According to the results the consumer risk has to be classified as small for the tested products with direct consumption. In up to 92 % of the samples (noodles) *B. cereus* was found, however in quantities, which usually cause no illness. Only in three samples strains with the ability to produce emetic toxin were detected. Generally, attention has to be paid to correct handling of food, since a bacterial growth which can lead to food poisoning already takes place at room temperatures.

6 Literaturverzeichnis

AGAISSE, H., M. GOMINET, O. A. ØKSTAD, A. – B. KOLSTØ & D. LERECLUS (1999):
PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*
Mol. Microbiol. 32, 1043-1053

AGATA, N., M. MORI, M. OHTA, S. SUWAN & I. OHTANI (1994):
A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole
formation in Hep-2 cells
FEMS Microbiol. Lett. 121, 31-34

AGATA, N., M. OHTA, Y. ARAKAWA & M. MORI (1995a):
The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein
Microbiol. 141, 983-988

AGATA, N., M. OHTA, M. MORI & M. ISOBE (1995b):
A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*
FEMS Microbiol. Lett. 129, 17-20

AGATA, N., M. OHTA & M. MORI (1996):
Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*
Curr. Microbiol. 33, 67-69

ASANO, S. - I., Y. NUKUMIZU, H. BANDO, T. IIZUKA & T. YAMAMOTO (1997):
Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*
Appl. Environ. Microbiol. 63, 1054-1057

BAIDA, G., Z. I. BUDARINA, N. P. KUZMIN & A. S. SOLONIN (1999):
Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from
Bacillus cereus
FEMS Microbiol. Lett. 180, 7-14

- BECKER, H., T. A. EL-BASSIONY & G. TERPLAN (1984):
Vorkommen von *Bacillus cereus* und unterschiedlicher pathogener Mikroorganismen in
Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder
Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg B. 179, 198-216
- BECKER, H., G. SCHALLER, W. VON WIESE & G. TERPLAN (1994):
Bacillus cereus in infant foods and dried milk products
Int. Food Microbiol. 23, 1-15
- BEECHER, D. J. & J. D. MACMILLAN (1990):
A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*
Infect. Immun. 58, 2220-2227
- BEECHER, D. J. & J. D. MACMILLAN (1991):
Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*
Infect. Immun. 59, 1778-1784
- BEECHER, D. J. & A. C. L. WONG (1994):
Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic
vascular permeability factor from *B. cereus*
Infect. Immun. 62, 980-986
- BEECHER, D. J. & A. C. L. WONG (1997):
Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*
J. Biol. Chem. 272, 233-239
- BEECHER, D. J. & A. C. L. WONG (2000 a):
Tripartite haemolysin BL: isolation and characterization of two distinct homologous sets of
components from a single *Bacillus cereus* isolate
Microbiol. 146, 1371-1380

BEECHER, D. J. & A. C. L. WONG (2000 b):

Cooperative, synergistic and antagonistic haemolytic interactions between haemolysin BL, phosphatidylcholine phospholipase C and sphingomyelinase from *Bacillus cereus*
Microbiol. 146, 3033-3039

BEECHER, D. J., J. L. SCHOENI & A. C. L. WONG (1995):

Enterotoxic activity of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*
Infect. Immun. 63, 4423-4428

BROWN, R. W. & R. K. SCHERER (1957):

A report on two cases of acute mastitis caused by *Bacillus cereus*
Cornell Vet. 47, 226-240

CALLEGAN, M. C., B. D. JETT, L. E. HANCOCK & M. S. GILMORE (1999):

Role of hemolysin BL in the pathogenesis of extraintestinal *Bacillus cereus* infection assessed in an endophthalmitis model
Infect. Immun. 67, 3357-3366

CHOMA, C. & P. E. GRANUM (2002):

The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning
FEMS Microbiol. Lett. 217, 115-119

CHOMA, C., M. H. GUINEBRETIERE, F. CARLIN, P. SCHMITT, P. VELGE, P. E. GRANUM & C. NGUYEN-THE (2000):

Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables
J. Appl. Microbiol. 88, 617-625

DEL TORRE, M., M. DELLA CORTE & M. L. STECCHINI (2001):

Prevalence and behaviour of *Bacillus cereus* in a REPFED of Italian origin
Int. J. Food Microbiol. 63, 199-207

DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE (DGHM)

Fachgruppe

Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene: Mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln (Stand: Juni 2004);

<http://www.lm-mibi.uni-bonn.de/dghm.html>

DIERICK, K., E. VAN COILLIE, I. SWIECICKA, G. MEYFROIDT, H. DEVLIEGER, A. MEULEMANS, G. HOEDEMAEKERS, L. FOURIE, M. HEYNDRICKX & J. MAHILLON (2005):

Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-Associated Food poisoning

J. Clin. Microbiol. 43, 4277-4279

DIETRICH, R., C. FELLA, S. STRICH & E. MÄRTLBAUER (1999):

Production and characterisation of monoclonal antibodies against the hemolysin BL enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*

Appl. Environ. Microbiol. 65, 4470-4474

DIETRICH, R., M. MORAVEK, C. BÜRK, P. E. GRANUM & E. MÄRTLBAUER (2005):

Production and characterization of antibodies against each of the three subunits of the *B. cereus* Nonhemolytic Enterotoxin Complex

Appl. Environ. Microbiol. 71, 8214-8220

DROBNIEWSKI, F. A. (1993):

Bacillus cereus and related species

Clin. Microbiol. Rev. 6, 324-338

EHLING-SCHULZ, M., M. FRICKER & S. SCHERER (2004):

Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay

FEMS Microbiol. Lett. 232, 189-195

FELLA, C. (1999):

Nachweis von *Bacillus cereus* Enterotoxinen mittels monoklonaler Antikörper

Diss. vet. med., München

FISCHER, S. (2005):

Formen der Wassernutzung und Wasserverbrauch im globalen Vergleich
Hausarbeit, Universität Augsburg, Lehrstuhl physische Geographie

FONTANAROSA, M., L. NOVELLO, C. CONVERSANO, M. MUSTI & M. G. TANTILLO
(2004):

Detection of *Bacillus species* in selected meals from an Apulian catering service
Microbiologica 27, 411-413

GALLATI, H. & I. PRACHT (1985):

Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-
Aktivitätsbestimmung mit den Substanzen H₂O₂ und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23, 453-460

GLATZ, B. A., W. M. SPIRA & J. M. GOEPFERT (1974):

Alteration of vascular permeability in rabbits by culture filtrates of *Bacillus cereus* and related
species
Infect. Immun. 10, 229-303

GOEPFERT, J. M., W. M. SPIRA, B. A. GLATZ & H. U. KIM (1973):

Pathogenicity of *Bacillus cereus*. The Microbiological Safety of Food, Proc. 8th Int. Symp.
Food Microb., England, Sept. 1972,
Academic Press, London – New York

GRANUM, P. E., A. ANDERSSON, C. GAYTHER, M. TE GIFFEL, H. LARSEN, T. LUND
& K. O'SULLIVAN (1996):

Evidence for a further enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*
FEMS Microbiol. Lett. 141, 145-149

GRANUM, P. E., K. O'SULLIVAN & T. LUND (1999):

The sequence of the non-hemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*
FEMS Microbiol. Lett. 177, 225-229

GRANUM, P. E. (2001):

Bacillus cereus

In: DOYLE, M. P., L. R. BEUCHAT & T. J. MONTVILLE (ed.): Food microbiology
Fundamentals and frontiers. 2nd ed., 373-381

GUINEBRETIERE, M. H., V. BROUSSOLLE & C. NGUYEN-THE (2002):

Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains
J. Clin. Microbiol. 40, 3053-3056

GÜVEN, K., M. B. MUTLU & Ö. AVCI (2006):

Incidence and characterization of *Bacillus cereus* in meat and meat products consumed in
turkey

J. Food Safety 26, 30-40

HANSEN, B. M. & N. B. HENDRIKSEN (2001):

Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis
Appl. Environ. Microbiol. 67, 185-189

HANSEN, B. M., P. E. HOIBY, G. B. JENSEN & N. B. HENDRIKSEN (2003):

The *Bacillus cereus* bceT enterotoxin sequence reappraised
FEMS Microbiol. Lett. 223, 21-24

HARDY, S. P., T. LUND & P. E. GRANUM (2001):

Cyt K toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to
intestinal epithelia

FEMS Microbiol. Lett. 197, 47-51

HAUGE, S. (1955):

Food poisoning caused by aerobic spore-forming Bacilli
J. Appl. Bacteriol. 18, 591-595

HEINRICH, J. H., D. J. BEECHER, J. D. MACMILLAN & B. A. ZILINSKAS (1993):
Molecular cloning and characterization of the *hblA* gene encoding the B component of
hemolysin BL from *Bacillus cereus*
J. Bact. 175, 6760-6766

HOLMES, J. R., T. PLUNKET, P. PATE, W. L. ROPER & W. J. ALEXANDER (1981):
Emetic food poisoning caused by *Bacillus cereus*
Arch. Intern. Med. 141, 766-767

IN'T VELD, P. H., W. S. RITMEESTER, E. H. M. DELFGOU-VAN ASCH, J. B.
DUFRENNE, K. WERNARS, E. SMIT & 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
Int. J. Food Microbiol. 64, 63-70

IURLINA, M. O., A. I. SAIZ, S. R. FUSELLI & R. FRITZ (2006):
Prevalence of *Bacillus spp.* in different food products in Argentina
Food Sci. & Tech. 39, 105-110

JÄÄSKELÄINEN, E. L., V. TEPLOVA, M. A. ANDERSSON, L. C. ANDERSSON, P.
TAMMELA, M. C. ANDERSSON, T. I. PIRHONEN, N. - E. L. SARIS, P. VUORELA & M.
S. SALKINOJA-SALONEN (2003):
In vitro assay for human toxicity of cereulide, the emetic mitochondrial toxin produced by
food poisoning *Bacillus cereus*
Toxicol. in Vitro 17, 737-744

JANG, J. H., N. A. LEE, G. J. WOO, J. H. PARK (2006):
Prevalence of *Bacillus cereus* group in rice and distribution of enterotoxin genes
Food Sci. & Biotechnol. 15, 232-237

KOTIRANTA, A., K. LOUNATMAA & M. HAAPASALO (2000):
Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections
Microb. Infect. 2, 189-198

KRAMER, J. M & R. J. GILBERT (1989):

Bacillus cereus and other *Bacillus* species

in DOYLE M. P. (Hrsg.): Foodborne bacterial pathogens, p. 21-70

Dekker, New York

KREUZBERGER, C. (2007):

Charakterisierung der Toxizität von *Bacillus cereus*-Isolaten aus Verpflegungseinrichtungen der Bundeswehr

Dissertation in Vorbereitung, München

LECHNER, S. R., R. MAYR, K. P. FRANCIS, B. M. PRUESS, T. KAPLAN, E.

WIESSNER-GUNKEL, G. S. STEWART & S. SCHERER (1998):

Bacillus weihenstephanensis sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group

Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 1373-1382

LE DUC, L. H., T. C. DONG, N. A. LOGAN, A. D. SUTHERLAND, J. TAYLOR & S. M. CUTTING (2005):

Cases of emesis associated with bacterial contamination of an infant breakfast cereal product

Int. J. Food Microbiol. 102, 245-251

LITTLE, C. L., R. OMOTOYE & R. T. MITCHELL (2003):

The microbiological quality of ready-to-eat foods with added spices

Int. J. Environ. Health Res. 13, 31-42

LUBENAU (1906):

Bacillus peptonificans als Erreger einer Gastroenteritis-Epidemie

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 40, 433-437

LUND, T. & P. E. GRANUM (1996):

Characterisation of a non-hemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak

FEMS Microbiol. Lett. 141, 151-156

LUND, T. & P. E. GRANUM (1997):

Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*

Microbiol. 143, 3329-3336

LUND, T., M. - L. DE BUYSER & P. E. GRANUM (2000):

A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis

Mol. Microbiol. 38, 254-261

MAHLER, H., A. PASI, J. - M. KRAMER, P. SCHULTE, A. C. SCOGING, W. BAR & S. KRAHENBUEHL (1997):

Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*

N. Engl. J. Med. 336, 1142-1148

MASCHKOWSKI, G. (2001):

Kennwort Lebensmittel – ein digitales Nachschlagewerk auf CD-Rom

aid ISBN 3-8308-0125-4

MELDRUM, R. J., C. D. RIBEIRO, R. M. M. SMITH; A. M. WALKER, M. SIMMONS, D. WORTHINGTON & C. EDWARDS (2005):

Microbiological quality of ready-to-eat foods: Results from a longterm surveillance program (1995 through 2003)

J. Food Prot. 68, 1654-1658

MENESTRINA, G., M. D. SERRA & G. PREVOST (2001):

Mode of action of β -barrel pore-forming toxins of the staphylococcal α -hemolysin family

Toxicon 39, 1661-1672

MORAVEK, M., M. WEGSCHEIDER, A. SCHULZ, R. DIETRICH, C. BÜRK & E. MÄRTLBAUER (2004):

Colony immunoblot assay for the detection of hemolysin BL enterotoxin producing *Bacillus cereus*

FEMS Microbiol. Lett. 238, 107-113

MURINDAMOMBE, G. Y, E. K. COLLISON, S. F. MPUCHANE & B. A. GASHE (2005):
Presence of *Bacillus cereus* in street foods in Gaborone, Botswana
J. Food Prot. 68, 342-346

NIKODÉMUSZ, I. (1965):
Die Reproduzierbarkeit der von *Bacillus cereus* verursachten Lebensmittelvergiftungen bei
Katzen
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 196, 81-87

NIKODÉMUSZ, I. (1967):
Die enteropathogene Wirkung von *Bacillus cereus* bei Hunden
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 202, 533-538

NISHIKAWA , Y., J. M. KRAMER, M. HANAOKA & Y. YASUKAWA (1996):
Evaluation of serotyping, biotyping plasmid banding pattern analysis and Hep-2 vacuolation
factory assay in the epidemiological investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food
poisoning
Int. J. Food Microbiol. 31, 149-159

NYGREN, B. (1962):
Phospholipase C-producing bacteria and food poisoning. An experimental study on
Clostridium perfringens and *Bacillus cereus*.
Acta pathol. microbiol. scand., suppl. 160, 5-89

OGUNTOYINBO, F. A. & O. M. ONI (2004):
Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolated from traditional fermented meals in
Nigeria
J. Food Prot. 67, 2805-2808

PIRTTIJÄRVI, T. S. M., M. A. ANDERSSON, A. C. SCOGINO & M. S. SALKINOJA-SALONEN (1999):

Evaluation of methods for recognising strains of the *Bacillus cereus* group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants

Syst. Appl. Microbiol. 22, 133-144

PRÜSS, B., R. DIETRICH, B. NIBLER, E. MÄRTLBAUER & S. SCHERER (1999):

The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group

Appl. Environ. Microbiol. 65, 5436-5442

RAJKOVIC, A., M. UYTENDAELE, T. COURTENS, M. HEYNDRICKX, J. DEBEVERE (2006):

Prevalence and characterisation of *Bacillus cereus* in vacuum packed potato puree

Int. J. Food Microbiol. 41, 878-884

ROSENQUIST, H., L. SMIDT, S. R. ANDERSEN, G. B. JENSEN & A. WILCKS (2005):

Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food

FEMS Microbiol. Lett. 250, 129-136

RYAN, P. A., J. D. MACMILLAN & B. A. ZILINSKAS (1997):

Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L₁ and L₂ components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*

J. Bact. 179, 2551-2556

SCHULZ, A. (2004):

Zum Nachweis des emetischen Toxins von *Bacillus cereus*

Diss. vet. med., München

SHAHEEN, R., A. ANDERSSON, C. APETROAIE, A. SCHULZ, M. EHLING-SCHULZ, V. – M. OLLILAINEN & M. S. SALKINOJA-SALONEN (2006):

Potential of selected infant food formulas for production of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide

Int. J. Food Microbiol. 107, 287-294

- SHINAGAWA, K., N. KUNITA, Y. SASAKI & A. OKAMOTO (1979):
Biochemical characteristics and heat tolerance of strains of *Bacillus cereus* isolated from uncooked and cooked rice after poisoning outbreaks
J. Food Hyg. Soc. Japan 20, 431-436
- SHINAGAWA, K. (1990):
Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus species*
Int. J. Food Microbiol. 10, 125-142
- SHINAGAWA, K., N. MATSUSAKA, H. KONUMA & H. KURATA (1985):
The relation between the diarrheal and other biological activities of *Bacillus cereus* involved in food poisoning outbreaks
Jpn. J. Vet. Sci. 47, 557-565
- SHINAGAWA, K., H. KONUMA, H. SEKITA & S. SUGHI (1995):
Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*
FEMS Microbiol. Lett. 130, 87-90
- SPIEKERMANN, U. (2004):
Convenience Food statt Mehl und Milch – das Essen wird immer bequemer
Interview von WEGENER, B. auf
http://www.vistaverde.de/news/Wissenschaft/0403/23_essen.php
- STATISTISCHES BUNDESAMT (2006):
Haushaltstypen
<http://www.destatis.de/basis/d/bevoe/bevoetab11.php>
- SUPPER, S. (2003):
Verstecktes Wasser
Sustainable Austria – Nachhaltiges Österreich, Nr. 25

SUWAN, S., M. ISOBE, I. OHTANI, N. AGATA, M. MORI & M. OHTA (1995):
Structure of cereulide, a cyclic dodecadepsipeptide toxin from *Bacillus cereus* and studies on
NMR characteristics of its alkali metal complexes including a conformational structure of the
K⁺ complex

J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 7, 765-775

TAYLOR, A. J., R. J. GILBERT (1975):

Bacillus cereus food poisoning: A provisional serotyping scheme

J. Med. Microbiol. 8, 543-550

VAN NETTEN, P., A. VAN DE MOOSDIJK, P. VAN HOENSEL, D. A. A. MOSSEL, I.
PERALES (1990):

Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin

J. Appl. Bacteriol. 69, 73-79

YAMAKURA, M., H. OKADOME, K. SUZUKI, U. T. TRAN, S. HOMMA, A.

SASAGAWA, A. YAMAZAKI, K. OHTSUBO (2005):

Effects of high-pressure treatment and soaking to the cooked rice

J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol. 52, 60-67

YOKOYAMA, K., M. ITO, N. AGATA, M. ISOBE, K. SHIBAYAMA, T. HORII & M.
OHTA (1999):

Pathological effect of synthetic cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, is reversible in
mice.

FEMS Immunol. Med. Microbiol. 24, 115-120

7 Anhang

Anhang I: Im Rahmen der Arbeit gezogene und untersuchte Proben mit ihrem *B. cereus*-Gehalt

| Produkt- nummer | Produktname | Eigenschaften des Produkts | <i>B. cereus</i>/ g |
|----------------------------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | Basmati Reis | | 10 |
| 2 | Fussilli | Hartweizengrieß | < 10 |
| 3 | Tortiglioni | Hartweizengrieß | < 10 |
| 4 | Parboiled Reis | | < 10 |
| 5 | Jasmin Reis aus Thailand | | 10 |
| 6 | Spaghetti | Hartweizengrieß | 10 |
| 7 | Spaghetti | Eierteigwaren | < 10 |
| 8 | Frischeier-Fadennestchen | Eierteigwaren | < 10 |
| 9 | Spaghetti | Hartweizengrieß | < 10 |
| 10 | Eierspätzle | Eierteigwaren | 40 |
| 11 | Fussilli | Hartweizengrieß | < 10 |
| 12 | Langkornreis | | < 10 |
| 13 | Basmati Reis | | < 10 |
| 14 | Parboiled Reis | | < 10 |
| 15 | Strozzapreti | FrISChe Nudeln aus Hartweizengrieß | < 10 |
| 16 | Bandnudeln | Eierteigwaren | < 10 |
| 17 | Racchette aus Italien | Hartweizengrieß | < 10 |
| 18 | Lasagne aus Italien | Eierteigwaren | < 10 |
| 19 | Tagliatelle aus Italien | Eierteigwaren | < 10 |
| 20 | Fettuccine aus Italien | Eierteigwaren | < 10 |
| 21 | Spaghetti Tricolor aus Italien | Hartweizengrieß | 10 |
| 22 | Trivella aus Italien | Hartweizengrieß | < 10 |
| 23 | Milchreis | | < 10 |
| 24 | Risotto | | < 10 |
| 25 | Natur & Wildreis | Natur | 100 |
| 26 | Parboiled Reis | Vollkorn-Naturreis | < 10 |
| 27 | Langkornreis | | < 10 |
| 28 | Basmati Reis & Wildreis | | < 10 |
| 29 | Langkornreis | | < 10 |
| 30 | Parboiled Reis | | < 10 |
| 31 | Eierspätzle | Eierteigwaren | < 10 |
| 32 | Gabelspaghetti | Eierteigwaren | < 10 |
| 33 | Suppenmuscheln | Eierteigwaren | < 10 |
| 34 | Fadennudeln | Eierteigwaren | 20 |
| 35 | Parboiled Reis | | < 10 |
| 36 | Jasmin Reis | | < 10 |
| 37 | Schwäbische Knöpfle | Eierteigwaren | < 10 |
| 38 | Glasnudeln | Kartoffelstärke | < 10 |

| Produkt- nummer | Produktname | Eigenschaften des Produkts | <i>B. cereus</i>/ g |
|----------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| 39 | Spaghetti | Hartweizengrieß | < 10 |
| 40 | Dinkel | | < 10 |
| 41 | Basmati Reis | | 10 |
| 42 | 7 Korn Equilina | | < 10 |
| 43 | Spätzle | Hartweizengrieß | < 10 |
| 44 | Milchreis | | < 10 |
| 45 | Langkornreis indisch | vorgegart gewürzt | < 10 |
| 46 | Basmati Reis vorgegart | vorgegart | < 10 |
| 47 | Farfalle | Hartweizengrieß | < 10 |
| 48 | Jasmin Reis | | 300 |
| 49 | Langkornreis & Wildreis | vorgegart | < 10 |
| 50 | Spaghetti | Hartweizengrieß/ Bio | < 10 |
| 51 | Spiralen | Hartweizengrieß/ Bio Vollkorn | < 10 |
| 52 | Spaghetti | Hartweizengrieß/ Biovollkorn | < 10 |
| 53 | Spaghetti | Eierteigwaren | < 10 |
| 54 | Parboiled Reis | | < 10 |
| 55 | Schwyzer Nüdling | Eierteigwaren | < 10 |
| 56 | Langkornreis | Bio Vollkorn | 10 |
| 57 | Basmati Reis | | 10 |
| 58 | Bandnudeln | Eierteigwaren | < 10 |
| 59 | Langkornreis | Natur | < 10 |
| 60 | Fussilli | Hartweizengrieß | 10 |
| 61 | Asiatische Ente mit Gemüse u. Reis | | < 10 |
| 62 | Eierspätzle | Frische Nudeln Eierteigwaren | < 10 |
| 63 | Gnocchi aus Italien | Frische Kartoffelklößchen | < 10 |
| 64 | Bandnudeln aus Italien | Frische Nudeln Eierteigwaren | < 10 |
| 65 | Tortelloni | Frische Nudeln Eierteigwaren | < 10 |
| 66 | Spaghetti | Hartweizengrieß/ Bio Vollkorn | 10 |
| 67 | Asiatisches Reisgericht mit Pute | | < 10 |
| 68 | Asiatisches Reisgericht mit Huhn | | 10 |
| 69 | Tagliatelle | Frische Nudeln Eierteigwaren | < 10 |
| 70 | Eierspätzle | Frische Nudeln Eierteigwaren | < 10 |
| 71 | Taglierini | Frische Nudeln Eierteigwaren | < 10 |
| 72 | Natur & Wildreis | Bio | < 10 |
| 73 | Basmati Reis | Bio Vollkorn | 40 |
| 74 | Parboiled Reis | Bio | < 10 |
| 75 | Bandnudeln aus Italien | Hartweizengrieß | 30 |
| 76 | Gemüsereis mit Kalb im Gläschen | Bio | < 10 |
| 77 | Apfel-Traube mit Reis im Gläschen | Bio | < 10 |
| 78 | Spaghetti Bolognese im Gläschen | Bio | < 10 |
| 79 | Gemüsereis mit Huhn im Gläschen | Bio | < 10 |
| 80 | Reis mit Schwein im Gläschen | Bio | < 10 |
| 81 | Milchreis Apfel im Gläschen | Bio | < 10 |
| 82 | Reis mit Rindfleisch im Gläschen | Bio | < 10 |

| Produkt- nummer | Produktname | Eigenschaften des Produkts | <i>B. cereus</i>/ g |
|----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| 83 | Gemüsereis im Gläschen | Bio | < 10 |
| 84 | Gemüse-Spaghetti mit Pute im Gläschen | | < 10 |
| 85 | Gemüsereis mit Pute im Gläschen | | < 10 |
| 86 | Gemüsereis im Gläschen | Bio | < 10 |
| 87 | Schinkennudeln im Gläschen | | < 10 |
| 88 | Gemüsereis mit Huhn im Gläschen | | < 10 |
| 89 | Gemüsereis mit Pute im Gläschen | Bio | < 10 |
| 90 | Folgemilch | | 40 |
| 91 | Anfangsmilch | | < 10 |
| 92 | Folgemilch | | < 10 |
| 93 | Folgemilch | | < 10 |
| 94 | Folgemilch | trinkfertig | < 10 |
| 95 | Folgemilch | | < 10 |
| 96 | Folgemilch | | < 10 |
| 97 | Folgemilch | | < 10 |
| 98 | Anfangsmilch | | < 10 |
| 99 | Folgemilch | | < 10 |
| 100 | Milchbrei | Vollkorn | < 10 |
| 101 | Milchbrei | Erdbeer-Joghurt | < 10 |
| 102 | Milchbrei | Banane | < 10 |
| 103 | Milchbrei | Apfel Bio | < 10 |
| 104 | Milchbrei | Stracciatella | < 10 |
| 105 | Milchbrei | Schokolade | < 10 |
| 106 | Milchbrei | Honig & Flakes | < 10 |
| 107 | Milchbrei | Joghurt-Himbeer | < 10 |
| 108 | Milchbrei | Getreide, Apfel & Vanille | < 10 |
| 109 | Milchbrei | Getreide, Birne & Zwieback | < 10 |
| 110 | Milchbrei | Getreide, Milchreis-Kirsch | < 10 |
| 111 | Milchbrei | Frucht | < 10 |
| 112 | Grießbrei | | < 10 |
| 113 | Milchreis | fertig in 10 Minuten | < 10 |
| 114 | Milchreis | fertig in 10 Minuten, Vanille | < 10 |
| 115 | Risotto | | < 10 |
| 116 | Parboiled Reis | | < 10 |
| 117 | Basmati Reis aus Indien | | < 10 |
| 118 | Langkornreis | | < 10 |
| 119 | Milchreis | | < 10 |
| 120 | Dinkelbrei | Bio | < 10 |
| 121 | Naturreisschleim | Bio | < 10 |
| 122 | Hirsebrei | Bio | < 10 |
| 123 | 4-Korn-Brei | Bio | < 10 |
| 124 | Parboiled Reis aus Italien | Bio | < 10 |
| 125 | Basmati Reis aus Indien | Bio, weiß geschält | < 10 |

| Produkt- nummer | Produktname | Eigenschaften des Produkts | <i>B. cereus</i>/ g |
|----------------------------|---|---|--------------------------------|
| 126 | Milchreis aus Italien | Bio geschält und geschliffen | < 10 |
| 127 | Basmati Reis aus Indien | Bio Vollkorn | < 10 |
| 128 | Natur & Wildreis aus Kanada u. Italien | Bio Vollkorn | < 10 |
| 129 | Basmati Reis aus Indien | | < 10 |
| 130 | Milchreis | | < 10 |
| 131 | Parboiled Reis aus USA | | < 10 |
| 132 | Basmati Reis | | < 10 |
| 133 | Parboiled Reis aus USA | | 10 |
| 134 | Parboiled Reis | Vollkorn Vakuum verpackt | < 10 |
| 135 | Milchreis | vakuumverpackt | < 10 |
| 136 | Reisflocken | | < 10 |
| 137 | Klebereis aus Thailand | asiatischer Supermarkt | < 10 |
| 138 | Klebereis aus Vietnam | asiatischer Supermarkt | 100 |
| 139 | Sushireis | asiatischer Supermarkt | < 10 |
| 140 | Basmati Reis | brauner Basmati Reis/ asiat. Supermarkt | 200 |
| 141 | Naturreis aus Thailand | roter Naturreis/ asiat. Supermarkt | 220 |
| 142 | Reisflocken aus Thailand | Reismehl, Wasser/ asiat. Supermarkt | 10 |
| 143 | Duftreis aus Thailand | asiatischer Supermarkt | <10 |
| 144 | Basmati Reis aus Indien | asiatischer Supermarkt | 100 |
| 145 | Basmati Reis aus Indien | asiatischer Supermarkt | <10 |
| 146 | Basmati Reis | asiatischer Supermarkt | 10 |
| 147 | Jasmin Reis aus Thailand | asiatischer Supermarkt | 20 |
| 148 | Buchweizennudeln aus Korea | Buchweizen/ asiatischer Supermarkt | 60 |
| 149 | Reisnudeln aus Korea | Reismehl/ asiatischer Supermarkt | < 10 |
| 150 | Basmati Reis | asiatischer Supermarkt | 40 |
| 151 | Duftreis aus Thailand | asiatischer Supermarkt | < 10 |
| 152 | Klebereis aus Thailand | asiatischer Supermarkt | < 100 |
| 153 | Mendake-Nudeln (Schnellnudeln) aus Thailand | Weizenmehl, Kartoffelstärke/ asiat. Supermarkt | < 10 |
| 154 | Klebereis aus Thailand | asiatischer Supermarkt | 100 |
| 155 | Sushireis | asiatischer Supermarkt | < 10 |
| 156 | Japanischer Reis | asiatischer Supermarkt | < 100 |
| 157 | Glasnudeln aus China | Mungobohnenstärke/ asiat. Supermarkt | < 10 |
| 158 | Mendake-Nudeln aus Thailand | Weizenmehl, Kartoffelstärke/ asiat. Supermarkt | 100 |
| 159 | Reisdrink | Bio | < 10 |
| 160 | Milchbrei | Schoko-Nuss | < 10 |
| 161 | Langkornreis & Wildreis | | < 10 |
| 162 | Basmati Reis aus Indien | | < 10 |
| 163 | Milchbrei | Pfirsich-Banane Bio | 20 |
| 164 | Langkornreis | | < 10 |
| 165 | Parboiled Reis | | < 10 |

| Produkt- nummer | Produktname | Eigenschaften des Produkts | <i>B. cereus</i>/ g |
|----------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| 166 | Basmati Reis aus Italien | | < 10 |
| 167 | Parboiled Reis aus USA | Vollkorn | < 10 |
| 168 | Mie-Nudeln aus China | Weizenmehl | < 10 |
| 169 | Reisnudeln aus China | Reismehl | < 10 |
| 170 | Milchbrei | Apfel-Holunder | < 10 |
| 171 | Milchbrei | Erdbeere Bio | < 10 |
| 172 | Milchbrei | Grieß mit Cornflakes | < 10 |
| 173 | Milchbrei | Grieß Bio | < 10 |
| 174 | Milchbrei | Mehrkorn | < 10 |
| 175 | Milchbrei | Apfel-Karotte | < 10 |
| 176 | Reiswaffeln | Bio | < 10 |
| 177 | Jasmin Reis aus Thailand | | < 10 |
| 178 | Langkornreis | | < 10 |
| 179 | Basmati & Thaireis | | < 10 |
| 180 | Chinarestaurantreis aus Thailand | | 10 |
| 181 | Basmati Reis aus Indien | | 10 |
| 182 | Parboiled Reis aus USA | Minutenreis | < 10 |
| 183 | Klebereis | Sushireis | < 10 |
| 184 | Basmati Reis aus Indien | | < 10 |
| 185 | Reisgericht indonesische Art | Reis extra | 80 |
| 186 | Kartoffelbrei | mit Gemüse | < 10 |
| 187 | Reiswaffeln | Bio | < 10 |
| 188 | Indisches Reisgericht Curry | Reis extra | < 10 |
| 189 | Basmati Reis | Bio Naturreis | 30 |
| 190 | Langkornreis | Bio Naturreis | 10 |
| 191 | Spätzle | Hartweizengrieß/ Bio Vollkorn | < 10 |
| 192 | Langkornreis | | < 10 |
| 193 | Basmati Reis | | 10 |
| 194 | Reiskugel "Curry" | Curry | 20 |
| 195 | Milchbrei | Getreide, Stracciatella | < 10 |
| 196 | Chili Con Carne mit Reis | | < 10 |
| 197 | Reiskugel "Risi-Bisi" | Gemüse | 20 |
| 198 | Chinesisches Reisgericht | Reis extra | 10 |
| 199 | Asiatischer Nudelsnack | Curry | < 10 |
| 200 | Asiatischer Nudelsnack | scharf | < 10 |
| 201 | Asiatischer Nudelsnack | Gemüse | < 10 |
| 202 | Milchbrei | Mehrkorn | < 10 |
| 203 | Milchbrei | Mehrkorn | < 10 |

Anhang II: Im Rahmen der Studie gewonnene *B. cereus*-Isolate und ihre Eigenschaften

| Isolat | Isolat gewonnen aus Probennr.: | Stärke | Nhe | HBL | Cereulid |
|---------------|---|---------------|------------|------------|-----------------|
| 1 | 1 | + | + | + | - |
| 2 | 2 | - | + | - | - |
| 3 | 3 | + | + | + | - |
| 4 | 4 | - | + | - | - |
| 5 | 5 | + | + | - | - |
| 6 | 6 | + | + | + | - |
| 7 | 7 | - | + | - | - |
| 8 | 8 | + | + | + | - |
| 9 | 9 | - | + | - | - |
| 10 | 10 | - | + | - | - |
| 11 | 11 | - | + | - | - |
| 12 | 12 | + | + | + | - |
| 13 | 13 | + | + | + | - |
| 14 | 14 | - | + | - | - |
| 15 | 15 | + | + | + | - |
| 16 | 16 | - | + | + | - |
| 17 | 17 | + | + | + | - |
| 18 | 18 | + | + | + | - |
| 19 | 19 | - | + | - | - |
| 21 | 21 | - | + | + | - |
| 22 | 22 | - | + | - | - |
| 23 | 23 | + | + | - | - |
| 25 | 25 | + | + | - | - |
| 27 | 27 | + | + | - | - |
| 28 | 28 | + | + | + | - |
| 29 | 29 | + | + | - | - |
| 30 | 30 | - | + | - | - |
| 32 | 32 | - | + | - | - |
| 33 | 33 | - | + | - | - |
| 34 A | 34 | + | + | + | - |
| 34 B | 34 | - | + | - | - |
| 36 | 36 | + | + | + | - |
| 37 | 37 | - | + | - | - |
| 38 | 38 | + | + | - | - |
| 39 | 39 | + | + | + | - |
| 40 | 40 | - | + | - | - |
| 41 B | 41 | - | + | + | - |
| 43 B | 43 | + | + | + | - |
| 44 B | 44 | - | + | - | - |
| 44 C | 44 | + | + | + | - |
| 47 | 47 | + | + | + | - |
| 48 | 48 | - | + | - | - |
| 50 | 50 | - | + | + | - |
| 51 | 51 | - | + | - | - |
| 52 | 52 | - | + | - | - |

| Isolat | Isolat gewonnen aus Probennr.: | Stärke | Nhe | HBL | Cereulid |
|---------------|---|---------------|------------|------------|-----------------|
| 53 | 53 | - | + | - | - |
| 54 | 54 | + | + | - | - |
| 55 | 55 | + | + | - | - |
| 56 | 56 | + | + | + | - |
| 57 | 57 | + | + | - | - |
| 58 | 58 | + | + | + | - |
| 59 | 59 | + | + | - | - |
| 60 | 60 | + | + | + | - |
| 62 | 62 | + | + | + | - |
| 64 | 64 | + | + | + | - |
| 66 | 66 | - | + | - | - |
| 68 | 68 | - | + | - | - |
| 69 | 69 | + | + | + | - |
| 71 | 71 | + | + | + | - |
| 72 | 72 | - | + | + | - |
| 73 | 73 | + | + | + | - |
| 74 | 74 | + | + | + | - |
| 75 | 75 | - | + | - | - |
| 90 | 90 | - | + | - | - |
| 91 | 91 | - | + | - | - |
| 92 | 92 | - | + | - | - |
| 95 | 95 | + | + | + | - |
| 101 | 101 | + | + | + | - |
| 103 | 103 | - | - | - | - |
| 104 | 104 | - | + | - | - |
| 105 | 105 | + | + | - | - |
| 106 | 106 | + | + | + | - |
| 107 | 107 | + | + | + | - |
| 108 | 108 | - | + | - | - |
| 110 | 110 | - | + | - | - |
| 111 | 111 | + | + | - | - |
| 112 | 112 | + | + | + | - |
| 113 | 113 | + | + | + | - |
| 114 | 114 | - | + | - | - |
| 115 | 115 | + | + | + | - |
| 116 | 116 | + | + | + | - |
| 117 | 117 | + | + | + | - |
| 118 | 118 | + | + | - | - |
| 120 | 120 | - | + | - | - |
| 121 | 121 | - | + | - | - |
| 122 | 122 | - | + | - | - |
| 123 | 123 | - | + | - | - |
| 125 | 125 | - | + | - | - |
| 126 | 126 | + | + | + | - |
| 127 | 127 | - | + | - | - |
| 128 | 128 | + | + | + | - |
| 129 | 129 | + | + | + | - |
| 130 | 130 | + | + | + | - |
| 131 | 131 | - | + | - | - |

| Isolat | Isolat gewonnen aus Probennr.: | Stärke | Nhe | HBL | Cereulid |
|---------------|---|---------------|------------|------------|-----------------|
| 133 A | 133 | - | + | - | - |
| 133 B | 133 | + | - | - | - |
| 134 | 134 | - | + | - | - |
| 137 | 137 | + | + | + | - |
| 138 A | 138 | - | + | - | - |
| 138 B | 138 | + | + | - | - |
| 138 C | 138 | - | + | - | + |
| 139 | 139 | + | + | + | - |
| 140 A | 140 | - | + | - | - |
| 140 B | 140 | + | + | + | - |
| 140 C | 140 | - | + | - | - |
| 140 D | 140 | + | + | + | - |
| 140 E | 140 | - | + | - | - |
| 141 A | 141 | + | + | + | - |
| 141 B | 141 | - | + | - | - |
| 142 A | 142 | - | + | - | - |
| 142 B | 142 | + | + | + | - |
| 142 C | 142 | + | + | - | - |
| 143 | 143 | + | + | + | - |
| 144 A | 144 | + | + | - | - |
| 144 B | 144 | + | + | - | - |
| 144 C | 144 | + | + | - | - |
| 144 D | 144 | - | + | - | - |
| 145 | 145 | + | + | - | - |
| 146 A | 146 | + | + | - | - |
| 146 B | 146 | + | + | + | - |
| 147 A | 147 | - | + | - | - |
| 147 B | 147 | + | + | + | - |
| 147 C | 147 | + | + | - | - |
| 148 A | 148 | - | + | - | - |
| 148 B | 148 | - | + | - | + |
| 148 C | 148 | - | + | - | - |
| 149 | 149 | - | + | - | - |
| 150 A | 150 | - | + | - | - |
| 150 C | 150 | + | + | + | - |
| 151 A | 151 | + | + | + | - |
| 152 A | 152 | + | + | - | - |
| 152 B | 152 | + | + | + | - |
| 153 | 153 | + | + | + | - |
| 154 B | 154 | + | + | + | - |
| 154 C | 154 | + | + | + | - |
| 155 | 155 | + | + | + | - |
| 156 A | 156 | + | + | - | - |
| 156 B | 156 | + | + | - | - |
| 157 | 157 | + | + | - | - |
| 158 A | 158 | - | + | - | - |
| 159 | 159 | + | + | + | - |
| 160 | 160 | - | + | - | - |
| 162 | 162 | + | + | + | - |

| Isolat | Isolat gewonnen aus Probennr.: | Stärke | Nhe | HBL | Cereulid |
|---------------|---|---------------|------------|------------|-----------------|
| 163 A | 163 | - | + | - | - |
| 163 B | 163 | - | + | - | - |
| 163 C | 163 | - | + | - | - |
| 164 A | 164 | + | + | + | - |
| 164 B | 164 | - | + | - | - |
| 165 | 165 | - | + | - | - |
| 166 A | 166 | + | + | + | - |
| 166 B | 166 | + | + | - | - |
| 167 | 167 | - | + | - | - |
| 168 | 168 | - | + | - | - |
| 169 | 169 | + | + | + | - |
| 170 A | 170 | - | + | - | - |
| 170 B | 170 | + | + | + | - |
| 171 | 171 | + | + | - | - |
| 172 | 172 | - | + | - | - |
| 173 A | 173 | + | + | + | - |
| 173 B | 173 | + | + | - | - |
| 174 | 174 | - | + | - | + |
| 176 | 176 | + | + | + | - |
| 177 | 177 | + | + | + | - |
| 178 | 178 | + | + | + | - |
| 179 | 179 | - | + | - | - |
| 180 | 180 | - | + | - | - |
| 181 A | 181 | + | + | + | - |
| 181 B | 181 | + | + | - | - |
| 182 | 182 | + | + | + | - |
| 183 | 183 | + | + | + | - |
| 184 | 184 | + | + | - | - |
| 185 A | 185 | - | + | - | - |
| 185 B | 185 | - | + | - | - |
| 185 C | 185 | - | + | - | - |
| 185 D | 185 | - | + | - | - |
| 185 E | 185 | - | + | + | - |
| 186 | 186 | - | + | - | - |
| 188 | 188 | - | + | - | - |
| 189 A | 189 | - | + | - | - |
| 189 B | 189 | + | + | + | - |
| 189 C | 189 | + | + | + | - |
| 190 A | 190 | - | + | - | - |
| 190 B | 190 | + | + | + | - |
| 191 A | 191 | - | + | - | - |
| 191 B | 191 | + | + | + | - |
| 192 A | 192 | + | + | + | - |
| 192 B | 192 | + | + | + | - |
| 193 A | 193 | + | + | - | - |
| 193 B | 193 | + | + | + | - |
| 193 C | 193 | + | + | + | - |
| 194 A | 194 | + | + | + | - |
| 194 B | 194 | + | + | + | - |

| Isolat | Isolat gewonnen aus Probennr.: | Stärke | Nhe | HBL | Cereulid |
|---------------|---|---------------|------------|------------|-----------------|
| 194 C | 194 | + | + | - | - |
| 195 | 195 | + | + | - | - |
| 197 A | 197 | + | + | + | - |
| 197 B | 197 | - | + | + | - |
| 197 C | 197 | + | + | + | - |
| 197 D | 197 | - | + | - | - |
| 198 A | 198 | + | + | + | - |
| 198 B | 198 | + | + | + | - |
| 203 C | 203 | + | + | - | - |

Danksagung

Herrn Professor Dr. E. Märtlbauer danke ich für die Überlassung des Themas und die stets freundliche und großzügige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. M. Moravek für seine hervorragende Betreuung, die zahlreichen Anregungen und die sorgfältige Durchsicht, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich mich sehr herzlich bei Frau D. Herrmann, Frau Dr. C. Bürk, Frau B. Minich, Frau M. Lorber und Frau J. März für die technische Unterstützung und freundliche Hilfsbereitschaft bedanken. Außerdem danke ich allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Ihre Hilfe und das freundliche Arbeitsklima. Auch der Kollegin Frau C. Kreuzberger möchte ich für die moralische Unterstützung und die Aufmunterung in den letzten Monaten danken.

Mein Dank gilt auch meiner Schwester, Frau N. Langerfeld und Frau M. Stuhl für lange Telefonate und die passenden Worte zur richtigen Zeit. Danke, dass Ihr immer für mich da seid! Auch allen anderen Freunden, die an mich geglaubt haben möchte ich an dieser Stelle „Danke“ sagen.

Schließlich möchte ich hier meinen Eltern herzlich danken, ohne deren stetige und großzügige Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Danke, dass Ihr mir diese Chance ermöglicht habt!